นิพนธ์ต้นฉบับ • Original Article

การปฏิสนธินอกร่างกายของไข่มนุษย์ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

ธนิดา พงษ์ศรีทัศน์[1], กนก สีจร[1], สุพัชญ์ สีนะวัฒน์[1], พรรณี กู้เกียรติกูล[2], เพียงจิตต์ ธารไพรสาณฑ์[2], อุดม งอกสิน[2], สมปอง ทองผา[2]

[1]*หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา*

[2]*หน่วยวางแผนครอบครัว โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

In Vitro Fertilization of Human Oocytes in Srinagarind Hospital

Thanida Pongsritasana[1], Kanok Seejoin[1], Supat Sinawat[1], Punnee kukiattikool[2], Piangjit Tharnprisan[2], Udom ngoksin[2], Sompong tongpha[2],

[1]*Reproductive Biology Unit, Department of Obstetrics and Gynecology*

[2]*Family Planning Unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002*

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิของไข่มนุษย์ในห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญพันธุ์ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

รูปแบบการศึกษา: การวิจัยเชิงพรรณนา

สถานที่ทำการวิจัย: หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประชากรที่ศึกษา: ไข่มนุษย์ (human oocyte) จำนวน 476 ใบ ที่เจาะเก็บจากรังไข่ของสตรีที่ได้รับการรักษาโดยการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2536 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2547

ตัววัดที่สำคัญ: อัตราการปฏิสนธิ อัตราการแบ่งเซลล์ อัตราการย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูก

ผลการวิจัย: ไข่มนุษย์จำนวน 476 ใบ ที่ถูกรวบรวมในการศึกษาครั้งนี้ ได้จากการเจาะเก็บจากรังไข่ (oocyte retrieval) ของสตรี 89 ราย ที่ได้รับการรักษาโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย จำนวน 109 รอบ มีจำนวนไข่ที่เจาะเก็บได้เฉลี่ย 4.5 $\pm$ 2.5 ใบต่อรอบ ได้ไข่ที่สมบูรณ์ 376 ใบ (ร้อยละ79.0) ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิร้อยละ 50.6 ของไข่ทั้งหมดหรือร้อยละ 73.3 ต่อรอบการรักษา มีอัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิร้อยละ 95.0 และมีอัตราการย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูกต่อรอบที่มีการปฏิสนธิ ร้อยละ 92.2

Objective: To assess *in-vitro* fertilization rate of human oocytes at reproductive biology unit in Srinagarind Hospital

Design: A descriptive study

Setting: Reproductive biology unit, Srinagarind Hospital, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Subject: Total of 476 human oocytes undergone in-vitro fertilization at Srinagarind Hospital between May 1993 to December 2004

Results: Total of 476 human oocytes were retrieved from 109 cycles of 89 patients. The average number of oocytes obtained per retrieval was 4.5 $\pm$ 2.5. During the study period there were 376 mature oocytes collected (79.0 %). The fertilization rate detected in this study was 50.6 % of total oocytes or 73.3 % per treatment cycle. The clevage rate of the fertilized oocytes was 95.0 % and the embryo transfer rate was 92.2 % per cycles with successful fertilization.

Conclusion: This study demonstrated that *in-vitro* fertilization of human oocytes performed in Srinagarind Hospital had acceptable clevage rate and embryo transfer rate but the fertilization rate was rather low.

key words: In vitro fertilization, Fertilization rate, Embryo transfer rate

8-Thanida 220 7/22/06, 9:50
Black

สรุป: การปฏิสนธินอกร่างกายในโรงพยาบาลศรีนครินทร์มีอัตราการปฏิสนธิค่อนข้างต่ำ อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการเคลื่อนย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูกอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

คำสำคัญ: การปฏิสนธินอกร่างกาย อัตราการปฏิสนธิ อัตราการย้ายตัวอ่อน

ศรีนครินทร์เวชสาร 2549; 21(3): 220-7 • Srinagarind Med J 2006; 21(3): 220-7

บทนำ (Introduction)

การปฏิสนธินอกร่างกาย (*In-vitro* fertilization) หรือเด็กหลอดแก้ว หมายถึง วิธีการช่วยการเจริญพันธุ์ที่มีการเก็บไข่ออกมานอกร่างกายฝ่ายหญิง นำมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิของฝ่ายชายในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้น 2-3 วัน จึงนำตัวอ่อนย้ายกลับสู่โพรงมดลูกของฝ่ายหญิง เพื่อให้เกิดการฝังตัวและเจริญเป็นทารกในครรภ์ต่อไป[1] การปฏิสนธินอกร่างกายเป็นกระบวนการที่ยุ่งยาก ซับซ้อน มีขั้นตอนต่างๆ มากมาย การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในกระบวนการดังกล่าว ภายหลังจากที่คู่สมรสฝ่ายหญิงได้รับการกระตุ้นรังไข่จนมีจำนวนไข่มากเพียงพอ แพทย์จะทำการเจาะเก็บไข่โดยดูดเอาสารน้ำจากรังไข่ (follicular fluid) มาตรวจหาไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจะเลี้ยงไข่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง 2-4 ชั่วโมงแล้ว จึงทำการผสมไข่กับอสุจิ (insemination) ซึ่งใช้อสุจิจำนวน 50,000-100,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ หรือถ้าคุณภาพของอสุจิไม่ดีอาจเพิ่มปริมาณของอสุจิเป็น 500,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ[2-5] หลังจากผสมอสุจิกับไข่ 16-18 ชั่วโมง จะทำการตรวจประเมินการปฏิสนธิ โดยตรวจดูจำนวนของ pronuclei ซึ่งถ้ามีการปฏิสนธิเกิดขึ้นควรมี 2 อัน (2 PN) ถ้ามีจำนวน pronuclei 3 อัน (3 PN) หรือมากกว่าถือว่ามีการปฏิสนธิที่ผิดปกติ เมื่อเลี้ยงไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิต่ออีก 1 วัน จะมีการแบ่งเซลล์เป็น 2-8 เซลล์ ในสถาบันที่ให้การดูแลรักษาภาวะมีบุตรยากบางแห่งอาจทำการย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูกในระยะนี้ หรือบางแห่งอาจเลี้ยงตัวอ่อนต่อถึงระยะ compacting morula หรือระยะ blastocyst ในการเลือกตัวอ่อนเพื่อย้ายกลับสู่โพรงมดลูกนั้น จะเลือกตัวอ่อนที่มีขนาดของเซลล์ blastomere เท่าๆ กันและไม่มี fragmentation หรือมีในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยทั่วไปพบว่ามีอัตราการฝังตัวร้อยละ 10 ต่อการย้ายตัวอ่อน 1 ตัว แต่ถ้าย้ายตัวอ่อน 2,3 หรือ 4 ตัว จะมีโอกาสตั้งครรภ์เพิ่มขึ้น[5] จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าจำนวนไข่ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่มีค่าตั้งแต่ 2.1-20 ใบต่อรอบ [6,9-11] มีอัตราการปฏิสนธิร้อยละ 50-92[6-13] มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 90.8-94.7[13] และมีการย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูก 1-4.1 ตัวต่อรอบการรักษา[6,9,11,13]

หน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา ได้ให้บริการช่วยเจริญพันธุ์ด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 แต่ยังไม่มีการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลจากการให้บริการดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยและคณะจึงทำการศึกษาวิจัยเพื่อหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูกจากการทำการปฏิสนธินอกร่างกายในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยใช้การเก็บข้อมูลย้อนหลัง จากสมุดบันทึกการให้บริการของหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา เพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ ข้อมูลดังกล่าวจะมีประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยมีบุตรยากต่อไปในอนาคต และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยและปรับปรุงคุณภาพของการรักษาด้วยวิธีนี้ต่อไป

วิธีการ (Methods)

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study) โดยประชากรที่ศึกษาคือ ไข่มนุษย์ (human oocytes) จำนวน 476 ใบที่เจาะดูดจากรังไข่ของสตรีมีบุตรยากที่ได้รับการรักษาโดยการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างเดือนพฤษภาคม 2536 ถึงเดือนธันวาคม 2547 นำข้อมูลจากการบันทึกการให้บริการมาบันทึกในแบบบันทึกข้อมูลที่สร้างขึ้นโดยครอบคลุมข้อมูลต่างๆ ได้แก่ อายุของฝ่ายหญิง ระยะเวลาการสมรส ระยะเวลาการมีบุตรยาก สาเหตุของการมีบุตรยาก จำนวนรอบที่มารับการรักษา จำนวนไข่ที่เจาะเก็บได้ จำนวนไข่ที่มีการปฏิสนธิ จำนวนไข่ที่มีการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิ จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายกลับสู่โพรงมดลูก ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน และวิธีการเพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เชิงพรรณนา (descriptive study) โดยใช้การแจกแจงความถี่, จำนวนนับ, ค่าร้อยละ, ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Fisher's exact test, ANOVA, t- test และ

8-Thanida 221 7/22/06, 9:50
Black

Mean-whitney หาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า p น้อยกว่า 0.05

ผลการวิจัย (Results)

จากการให้บริการช่วยการเจริญพันธุ์โดยวิธีทำเด็กหลอดแก้วจำนวนทั้งสิ้น 89 ราย ในการรักษา 109 รอบ สตรีที่เข้ารับบริการมีอายุระหว่าง 23-43 ปี (เฉลี่ย 34.0 ± 4.3 ปี) ระยะเวลาการสมรส 1-21 ปี (เฉลี่ย 7.3 ± 4.2 ปี) ระยะเวลาการมีบุตรยาก 1-20 ปี (เฉลี่ย 6.6 ± 3.9 ปี) มีจำนวน 68 รอบ (ร้อยละ 62.7) ที่ไม่เคยตั้งครรภ์มาก่อนและจำนวน 41 รอบ (ร้อยละ 37.3) เคยตั้งครรภ์มาแล้ว ผู้ป่วยส่วนมากที่มารับการรักษามีสาเหตุจากฝ่ายหญิงคิดเป็นร้อยละ 89.9 สาเหตุจากฝ่ายชายร้อยละ 3.7 สาเหตุจากทั้งสองฝ่ายร้อยละ 3.7 และไม่ทราบสาเหตุร้อยละ 2.7 มีการรักษาตั้งแต่ 1 รอบ 2 รอบ และ 3 รอบ (ร้อยละ 80.9, 17.3 และ 1.8 ตามลำดับ)

จากการเจาะเก็บไข่จำนวน 109 รอบ มี 105 รอบที่สามารถเจาะเก็บไข่ได้สำเร็จ (ร้อยละ 96.3) ได้ไข่จำนวนทั้งสิ้น 476 ใบ เฉลี่ย 4.5 ± 2.5 ใบต่อรอบการรักษา น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อน ได้แก่ Ham's F-10 with 10% maternal serum (10% MS), Universal IVF-medium (MediCult, Denmark), FertiCult IVF-medium (FertiPro, Belgium) และ IVF-20 medium (Scandinavian IVF Sciencs, Vitrolife, Sweden) เมื่อผสมอสุจิกับไข่มีการปฏิสนธิจำนวนทั้งสิ้น 241 ตัว (ร้อยละ 50.6) โดยเฉลี่ย 2.2 ± 2.1 ใบต่อรอบและมีการปฏิสนธิที่ผิดปกติ (3 PN) จำนวน 3 ใบ ใน 3 รอบ (ร้อยละ 0.6) โดยได้ทำการเพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อนระยะ 2 pronuclei (2 PN)ใน single well dish หรือใน 4-well dish (ร้อยละ 79.4) และเพาะเลี้ยงใน microdroplet under oil (ร้อยละ 20.6)

เมื่อพิจารณาปัจจัยที่อาจมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของไข่ ซึ่งได้แก่ (1) อายุของคู่สมรสฝ่ายหญิง (2) สาเหตุของภาวะมีบุตรยาก (3) ชนิดของน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อนและ (4) วิธีการเพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อน การศึกษานี้พบว่า อัตราการปฏิสนธิของไข่ในแต่ละกลุ่มอายุของคู่สมรสฝ่ายหญิงมีค่าใกล้เคียงกัน (p = 0.108) ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อพิจารณาสาเหตุของภาวะมีบุตรยาก พบว่า ไข่จะมีอัตราการปฏิสนธิสูงสุดในคู่สมรสที่มีบุตรยากแบบไม่ทราบสาเหตุ (unexplained infertility) (ร้อยละ 77.8) และมีอัตราการปฏิสนธิของไข่ต่ำที่สุด (ร้อยละ 18.2 และ 20.0) ในคู่สมรสที่ประสบปัญหาภาวะมีบุตรยากจากหลายปัจจัย (combined factors) และจากสาเหตุฝ่ายชาย (male infertility) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาผลของชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อนที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของไข่ การศึกษานี้บ่งชี้ว่ามีอัตราการปฏิสนธิของไข่สูงที่สุด (ร้อยละ 100) ในไข่ที่ถูกเลี้ยงในน้ำยา FertiCult IVF medium ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการเพาะเลี้ยงใน conventional medium เช่น Ham's F 10 with 10 % maternal serum นั้นจะมีอัตราการปฏิสนธิที่ต่ำ (ร้อยละ 46.6) ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาผลของการเพาะเลี้ยงไข่ต่ออัตราการปฏิสนธิของไข่พบว่า ไข่ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงใน microdroplet under oil มีอัตราการปฏิสนธิที่สูงกว่าไข่ที่ถูกเลี้ยงแบบ open system ใน single well หรือ 4-well dish (ร้อยละ 54.6 VS ร้อยละ 49.6 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.746) ดังแสดงในตารางที่ 4

จากไข่ที่มีการปฏิสนธิจำนวนทั้งสิ้น 241 ใบใน 77 รอบ มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น 74 รอบ คิดเป็นร้อยละ 97.4 และพบว่า มีการแบ่งเซลล์ทั้งสิ้น 229 ใบ อัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ (clevage rate) คิดเป็นร้อยละ 95.0 เมื่อพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของไข่ พบว่า อายุของคู่สมรสฝ่ายหญิง ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง และวิธีการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ไม่มีผลชัดเจนต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

ในจำนวนไข่ที่มีการปฏิสนธิ 241 ใบ มีการเจริญเป็นตัวอ่อนที่สมบูรณ์ 211 ตัว (ร้อยละ 87.6) และได้เคลื่อนย้ายกลับสู่โพรงมดลูก 188 ตัว เฉลี่ย 1.8 ± 1.6 ตัวต่อรอบการรักษา อัตราการเคลื่อนย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูก (embryo transfer rate) คิดเป็นร้อยละ 92.2 ของรอบที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น หรือร้อยละ 65.1 ของรอบการรักษาทั้งหมด ระยะของตัวอ่อนที่ได้ทำการย้ายกลับคือระยะ 2 เซลล์ 4 เซลล์ และ 8 เซลล์ คิดเป็นร้อยละ 7.4, 55.9 และ 36.7 ตามลำดับ ส่วนตัวอ่อนที่ไม่ได้ย้ายกลับพบว่า หยุดการเจริญที่ระยะ 2 PN จำนวน 9 ตัว (ร้อยละ 20.0) มีการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติคือขนาดของเซลล์ไม่เท่ากันและมี fragmentation จำนวน 9 ตัว (ร้อยละ 20.0) มีการปนเปื้อนจำนวน 4 ตัว (ร้อยละ 8.9) และมีตัวอ่อนเหลือจากการเคลื่อนย้าย 23 ตัว (ร้อยละ 51.1) หรือร้อยละ 10.0 ของตัวอ่อนที่ได้

วิจารณ์ (Discussion)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผู้มารับบริการรักษาภาวะมีบุตรยากโดยการทำเด็กหลอดแก้วมีอายุเฉลี่ยสูงกว่างานวิจัยอื่น[10,14] จากการศึกษาพบว่า ในกลุ่มที่ฝ่ายหญิงมีอายุมากกว่า 40 ปี พบว่าไข่ที่เจาะเก็บได้แต่ละรอบมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มอายุอื่นๆ ซึ่งในบางรายมีเพียง 1-2 ใบเท่านั้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Trouson A พบว่านอกจากกระตุ้นไข่ได้น้อยแล้วยังพบไข่ที่ผิดปกติได้บ่อย[15] ผู้มารับบริการส่วนมากมีสาเหตุมาจากฝ่ายหญิงร้อยละ 89.9 โดยส่วนใหญ่ท่อนำไข่อุดตัน 2 ข้าง (tubal occlusion) ร้อยละ 64.2 และเป็นภาวะมีบุตรยากแบบปฐมภูมิ คือ ไม่เคยมีการตั้งครรภ์มาก่อน (primary infertility) ร้อยละ 62.7

8-Thanida 222 7/22/06, 9:50
Black

ตารางที่ 1 อัตราการปฏิสนธิของไข่โดยแยกตามช่วงอายุของคู่สมรสฝ่ายหญิง

อายุ(ปี)	จำนวนไข่		จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ		อัตราการปฏิสนธิ (%)	P value
	N	%	N	%		
20-25	31	6.5	16	3.4	51.6	0.108
26-30	72	15.1	38	8.0	52.8	
31-35	218	45.8	117	24.6	53.7	
36-40	142	29.8	59	12.4	41.6	
41-45	13	2.7	11	2.3	84.6	
รวม	**476**	**100**	**241**	**50.6**	**50.6**	

ตารางที่ 2 อัตราการปฏิสนธิของไข่โดยแยกตามสาเหตุการมีบุตรยาก

สาเหตุ	จำนวนไข่ (N)	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (N)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
1. Male infertility	5	1	20.0
2. Endometriosis	24	16	66.7
3. Peritoneal pathology	60	32	53.3
4. Tubal pathology	338	174	51.5
5 Combined factors	22	4	18.2
6. Unexplained infertility	9	7	77.8
7. Others	13	4	30.8
รวม	**476**	**241**	**50.6**

ตารางที่ 3 อัตราการปฏิสนธิของไข่โดยแยกตามชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง

ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง	จำนวนไข่ (N)	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (N)	อัตราการปฏิสนธิ (%)	P value
1. Ham's F10 with 10% maternal serum	247	115	46.6	0.175
2. Ham's F10 with 10% maternal serum + Universal IVF medium (MediCult)	77	35	45.5	
3. Ham's F10 with 10% maternal serum + FertiCult IVF medium	69	34	49.3	
4. Ham's F10 with 10% maternal serum + IVF-20 medium (Vitrolife)	44	30	68.2	
5. Universal IVF medium (MediCult)	33	21	63.6	
6. Fertipro IVF medium (Ferticult)	6	6	100	
รวม	**476**	**241**	**50.6**	

8-Thanida 223 7/22/06, 9:50
Black

และเคยตั้งครรภ์มาแล้ว ร้อยละ 37.3 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของโรงพยาบาลศิริราช คือร้อยละ 65 และ 35 ตามลำดับ[16]

จากไข่ที่เจาะได้ทั้งหมด 476 ใบ มีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ 100 ใบ คิดเป็นร้อยละ 21.0 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Marrs RP และคณะ[7] ที่ได้ไข่ไม่สมบูรณ์ ร้อยละ 27 ผลการศึกษาพบว่ามีอัตราการปฏิสนธิใกล้เคียงกับบางรายงาน[9] แต่ถ้าไม่นำไข่ที่ไม่สมบูรณ์มาคำนวณ อัตราการปฏิสนธิจะใกล้เคียงกับหลายงานวิจัย[10,14,17] แต่จะค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นที่มีอัตราการปฏิสนธิมากกว่าร้อยละ 65[6,8,13,14] จากตารางที่ 1 พบว่าอัตราการปฏิสนธิในแต่ละช่วงอายุไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.108) ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ว่าอัตราการปฏิสนธิลดลงตามอายุ ในช่วงอายุ 41-45 ปี มีอัตราการปฏิสนธิที่สูงมากอาจเนื่องมาจากจำนวนไข่มีน้อยซึ่งไม่น่าจะเป็นตัวแทนที่ดีได้ นอกจากนั้นอัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ที่มีการปฏิสนธิโดยแยกตามช่วงอายุ (ตารางที่ 5) ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย (p = 0.075) สำหรับฝ่ายชายที่มีอายุแตกต่างกันพบว่า ไม่มีความแตกต่างในการปฏิสนธิหรือการเจริญแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน[13] โดยปกติจะใช้อสุจิจำนวนประมาณ 50,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งจากงานวิจัยอื่นจะใช้อสุจิ 20,000-50,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง 30-50 ไมโครลิตร หรืออาจใช้มากถึง 200,000-1,000,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ[7,17] ทำให้โอกาสที่จะเกิดการปฏิสนธิมีมากกว่า ในการเตรียมตัวอสุจิส่วนมากจะใช้วิธีปั่นล้างและให้ตัวอสุจิว่ายขึ้นมาส่วนบนผิวน้ำยา (swim-up) ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ใช้วิธี percoll gradient centrifugation ที่สามารถแยกเอาตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติออกมาจากเซลล์อื่นๆได้ดีกว่าและทำให้มีการปฏิสนธิดีกว่า[18] ส่วนอัตราการปฏิสนธิที่แยกตามสาเหตุของการมีบุตรยากพบว่า อัตราการปฏิสนธิของผู้มารับบริการที่มีสาเหตุจากภาวะ endometriosis จะสูงกว่าสาเหตุจาก tubal pathology ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่งานวิจัยอื่นๆ พบว่า ภาวะ endometriosis จะมีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฝังตัวของตัวอ่อนและอัตราการตั้งครรภ์ลดลง[14,19] เนื่องจากในผู้ป่วยมีบุตรยากที่มีสาเหตุมาจากภาวะ endometriosis จะมีความบกพร่องของการเจริญเติบโตของฟองไข่ และระดับฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญของฟองไข่ อย่างไรก็ดีในการศึกษาครั้งนี้จำนวนไข่ในกลุ่มนี้มีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีสาเหตุจาก tubal pathology ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิระหว่างผู้ป่วยที่มีภาวะ endometriosis กับ tubal pathology ได้ สำหรับกลุ่มที่มีความผิดปกติที่ฝ่ายชายนั้นพบว่าอัตราการปฏิสนธิจะต่ำกว่ากลุ่มที่มีความผิดปกติที่ฝ่ายหญิง 2-3 เท่าซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่น[15]

อัตราการปฏิสนธิของไข่โดยแยกตามชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.175) แต่เมื่อทำการทดสอบทางสถิติด้วย Mann-whitney ระหว่างการใช้ Ham's F10 with 10% maternal serum ที่มีอัตราการปฏิสนธิ 46.6 กับการใช้ Ham's F10 with 10% maternal serum ร่วมกับ IVF-30 medium (Scandinavian IVF Sciences, Sweden; Vitrolife) ที่มีอัตราการปฏิสนธิร้อยละ 68.2 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.04) แต่เมื่อทดสอบระหว่างการใช้ Ham's F10 with 10% maternal serum กับการใช้ universal IVF-medium (MediCult, Denmark) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.337) จากการศึกษานี้พบว่าน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนส่วนมากจะใช้ Ham's F10 with 10 % maternal serum ซึ่งการใช้น้ำยา Ham's F10 ที่มี HEPES (N2-Hydroxyethyl piperazine N-2-ethanesulphonic acid) เป็นบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของน้ำยาให้คงที่ แต่ HEPES สามารถเปลี่ยน ion channel activity ที่ผนังเซลล์ไข่ได้ ดังนั้นน้ำยาเพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อนจึงไม่ควรใช้ HEPES[11] นอกจากนั้นการเติมซีรั่มยังมีข้อเสียคือ ในซีรั่มมีองค์ประกอบที่ไม่แน่นอนเพราะมีความแตกต่างในแต่ละบุคคลแต่มีข้อดีคือราคาถูก ซึ่งน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้สารอื่นมาทดแทนซีรั่มมีราคาแพงมาก ในซีรั่มมีสารอาหาร มีฮอร์โมน มี growth factors มีเอนไซม์และโปรตีนที่สามารถขจัดสารพิษได้ อีกทั้งยังช่วยเพิ่ม buffering capacity ของน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนและช่วยเคลือบภาชนะทำให้ตัวอ่อนไม่ติดกับภาชนะและสายย้ายตัวอ่อนอีกด้วย[5] มีรายงานวิจัยที่ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของซีรั่มพบว่า มีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการย้ายตัวอ่อนร้อยละ 60 และ 76 ตามลำดับ[17] ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ และมีบางงานวิจัยที่พบว่า อัตราการปฏิสนธิ อัตราการเจริญแบ่งเซลล์ที่ปกติ อัตราการตั้งครรภ์รวมทั้งอัตราการเกิด ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีโปรตีนหรือไม่มีโปรตีนในการทำการปฏิสนธินอกร่างกายมนุษย์[20] นอกจากนั้นอัตราการปฏิสนธิของไข่จากวิธีการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 วิธีก็แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าร้อยละ 79.6 มีการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดโดยใส่น้ำยาเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตรต่อไข่ 1 ใบในแต่หลุมของ single well หรือ 4-well dish และหยดตัวอสุจิลงไปผสมกับไข่ 2-3 ชั่วโมงหลังเจาะเก็บไข่ ซึ่งบางแห่งจะผสมหลังจากเจาะเก็บไข่ 4-10 ชั่วโมง[17] การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดอาจทำให้คุณสมบัติของสารอาหารเพาะเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น ความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเพาะเลี้ยงเปลี่ยนแปลงเมื่อนำออกจากตู้เพาะเลี้ยงนานเกิน 10 นาทีขึ้นไป ซึ่งเป็นสาเหตุให้การเจริญของตัวอ่อน

8-Thanida 224 7/22/06, 9:50
Black

ตารางที่ 4 อัตราการปฏิสนธิของไข่โดยแยกตามวิธีการเพาะเลี้ยง

วิธีเพาะเลี้ยง	จำนวนไข่ (N)	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (N)	อัตราการปฏิสนธิ (%)	P value
1. Single well or 4-well dish	379	188	49.6	0.746
2. Microdroplet under oil	97	53	54.6	
รวม	**476**	**241**	**50.6**	

ตารางที่ 5 อัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ที่มีการปฏิสนธิโดยแยกตามช่วงอายุของคู่สมรสฝ่ายหญิง

อายุ (ปี) (N)	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (N)	จำนวนไข่ที่แบ่งเซลล์ (%)	อัตราการแบ่งเซลล์	P value
20-25	16	15	93.8	0.075
26-30	38	34	89.5	
31-35	117	114	97.4	
36-40	59	55	93.2	
41-45	11	11	100	
รวม	**241**	**229**	**95.0**	

ตารางที่ 6 อัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ที่มีการปฏิสนธิโดยแยกตามชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง

ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (N)	จำนวนไข่ที่แบ่งเซลล์ (N)	อัตราการแบ่งเซลล์ (%)	P value
1. Ham's F10 with 10% maternal serum	115	114	99.1	0.250
2. Ham's F10 with 10% maternal serum + Universal IVF medium (MediCult)	35	33	94.3	
3. Ham's F10 with 10% maternal serum + FertiCult IVF medium	34	27	79.4	
4. Ham's F10 with 10% maternal serum + IVF medium (Vitrolife)	30	28	93.3	
5. Universal IVF medium (MediCult)	21	21	100	
6. FertiCult IVF medium	6	6	100	
รวม	**241**	**229**	**95.0**	

ตารางที่ 7 อัตราการแบ่งเซลล์ของไข่ที่มีการปฏิสนธิโดยแยกตามวิธีการเพาะเลี้ยง

วิธีเพาะเลี้ยง	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (N)	จำนวนไข่ที่แบ่งเซลล์ (N)	อัตราการแบ่งเซลล์ (%)	P value
1. Single or 4-well dish	188	182	96.8	0.631
2. Microdroplet under oil	53	47	88.7	
รวม	**241**	**229**	**95.0**	

8-Thanida 225 7/22/06, 9:50
Black

หยุดชะงัก หรือมีการเจริญช้า ในปัจจุบันจะเพาะเลี้ยงในระบบปิดตั้งแต่การผสมอสุจิกับไข่โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง 20-30 ไมโครลิตร และปิดทับด้วย mineral oil เมื่อมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นจะเคลื่อนย้ายไปที่น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวใหม่ที่ปิดทับด้วย mineral oil เช่นกัน อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิและอัตราการแบ่งเซลล์จากการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.746 และ p = 0.631 ตามลำดับ) ดังในตารางที่ 4 และตารางที่ 7 นอกจากนั้นความสมบูรณ์ของไข่ก็มีผลต่อการปฏิสนธิเช่นกัน สมบูรณ์ คุณาธิคมและคณะได้มีการนำไข่ที่ไม่มีการปฏิสนธิจากการทำเด็กหลอดแก้ว จำนวน 164 ใบ ไปศึกษาโครโมโซม พบว่า 111 ใบที่สามารถวิเคราะห์ได้มีความผิดปกติของโครโมโซมร้อยละ 34.2 ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นความผิดปกติที่จำนวนของโครโมโซม (aneuploidy)[21]

จากไข่ที่มีการปฏิสนธิ 241 ใบ มีการเจริญแบ่งเซลล์เป็นตัวอ่อน 229 ตัว อัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 95.0 และมีรูปร่างปกติ 211 ตัวหรือร้อยละ 87.6 ซึ่งการเจริญเป็นตัวอ่อนใกล้เคียงกับการศึกษาของ Monks NJ และคณะที่มีการพัฒนาเจริญเป็นตัวอ่อนร้อยละ 96 แต่มีรูปร่างที่ปกติร้อยละ 68[22] และการศึกษาของ Marrs RP และคณะได้ตัวอ่อนร้อยละ 80 และ 60 ใน tubal disease และ idiopathic infertility[7] ตามลำดับ การที่จะเจริญเป็นตัวอ่อนได้ดีหรือไม่นั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับน้ำยาที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนแล้ว คุณภาพของไข่และตัวอ่อนเองก็มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนที่ดีด้วย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์โดยแยกตามช่วงอายุ ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง และแยกตามวิธีการเพาะเลี้ยง มีค่าใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.075, p = 0.250, p = 0.631 ตามลำดับ) ดังตารางที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้มีตัวอ่อนที่ถูกเคลื่อนย้ายกลับสู่โพรงมดลูก 188 ตัวอ่อน หรือร้อยละ 82.1 ต่อตัวอ่อนที่แบ่งเซลล์ หรือร้อยละ 67.6 ต่อจำนวนรอบที่เจาะไข่ได้ (105 รอบ) ซึ่งมากกว่าจากการศึกษาของ Widra EA และคณะที่มีอัตราการย้ายกลับตัวอ่อนร้อยละ 60.2 ในกลุ่มที่อายุน้อยกว่า 40 ปี ส่วนกลุ่มที่อายุมากกกว่า 40 ปี มีอัตราการย้ายกลับร้อยละ 48.823

สรุป (Conclusion)

การศึกษาวิจัยนี้พบว่า อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการเคลื่อนย้ายตัวอ่อนกลับสู่โพรงมดลูกอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่อัตราการปฏิสนธิค่อนข้างต่ำ ปัจจัยที่อาจมีผลต่อการปฏิสนธิของไข่กับอสุจิได้แก่ ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน และสาเหตุของภาวะมีบุตรยาก ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพของการให้บริการทางห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง (References)

1. อร่าม โรจนสกุล. บทบาทของการปฏิสนธินอกร่างกายในการดูแลรักษาคู่สมรสที่มีบุตรยาก. ใน: อร่าม โรจนสกุล, บรรณาธิการ. การปฏิสนธินอกร่างกายทางคลินิก. กรุงเทพมหานคร: บริษัท พี. เอ. ลิฟวิ่ง จำกัด 2539: 1-14.
2. Steinkampf MP, Davis OK, Rosenwaks Z. Assisted Reproductive Technology. In: Carr BR, Blackwell RE, editors. Textbook of Reproductive medicine. 2nd ed. Stamford Connecticut: Appleton & Lange, 1999: 665-78.
3. Elder K, Dale B. Oocyte retrieval and embryo culture. In: In vitro fertilization 2nd ed. Cambrige: Cambrige University Press, 2000: 152-86.
4. Fong CY. Oocyte identification, insemination and monitoring of cleavage. In: Bongso A, Ng SC, editors. Laboratory manual on assisted reproductive technology. Department of Obstetrics & Gynaecology, National University of Singapore 1991: 32-8.
5. Vutyavanich T. Laboratory Management of ART. In: Workshop on Assisted Reproductive Technology (Basic & Advance Course) Jan 31-Feb 4-2000. Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Medicine Chaing Mai University, 2000: 11-23.
6. Edwards RG, Steptoe PC. Current status of in-vitro fertilization and implantation of human embryos. Lancet 1983; 2: 1265-9.
7. Marrs RP, Vargyas JM, Gibbons WE, Saito H, Mishell DR Jr. A modified technique of human in vitro fertilization and embryo transfer. Am J Obstet Gynecol 1983; 147: 318-22.
8. Wood C, Downing B, Trounson A, Rogers P. Clinical implications of developments in in-vitro fertilization. Br Med J 1984; 289: 978-80.
9. Preutthipan S. In vitro fertilization and embryo transfer in assisted reproduction. J Rajavithi Hospital 1992; 3: 3-11.
10. Inge GB, Brinsden PR, Elder KT. Oocyte number per live birth in IVF : were Steptoe and Edwards less wastefull ?. Hum Repro 2005; 20: 588-92.
11. สมบูรณ์ คุณาธิคม. การปฏิสนธินอกร่างกาย. ใน: สมบูรณ์ คุณาธิคม, บรรณาธิการ. ภาวะมีบุตรยาก และเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. กรุงเทพมหานคร: บริษัท พี.เอ. ลิฟวิ่ง จำกัด 2545: 177-200.

8-Thanida 226 7/22/06, 9:51
Black

12. สมพร ชินสมบูรณ์, ศรีสิริ ชาตะสิงห์, แอนนา วงษ์กุหลาบ. การปฏิบัติการเกี่ยวกับการปฏิสนธินอกร่างกาย. ใน: อร่าม โรจนสกุล, บรรณาธิการ. การปฏิสนธินอกร่างกายทางคลินิก. กรุงเทพมหานคร : บริษัท พี. เอ. ลิฟวิ่ง จำกัด 2539: 115-49.
13. Gallardo E, Simon C, Levy M, Guanes PP, Remohi J, Pellicer A. Effect of age on sperm fertility potential: oocyte donation as a model. Fertil Steril 1996; 66: 260-4.
14. Omland AK, Abyholm T, Fedorcsak P, Ertzeid G, Oldereid NB, Bjercke S, Tammbo T. Pregnancy outcome after IVF and ICSI in unexplained, endometriosis-associated and tubal factor infertility. Hum Repro 2005; 20: 722-7.
15. Trouson A., Conti A. Research in human in-vitro fertilization and embryo transfer. Br Med J (Clin Res Ed) 1982; 285: 244-7.
16. Preutthipan S, Amso N, Curtis P, Shaw RW. Effect of maternal age on clinical outcome in women undergoing *in-vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET). J Med Assoc Thai 1996; 79: 347-52.
17. Leung PC, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC, et al. Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril 1984; 41: 36-9.
18. Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I, et al. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). Fertil Steril 1998; 69: 722-6.
19. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. Fertil Steril 2002; 77: 1148-55.
20. Caro CM, Trouson A. successful fertilization, embry development and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. J In Vitro Fert Embryo Transf 1986; 3: 215-7.
21. Kunathikom S, Makemaharn O, Suksompong, Laokirkkiat P. Chromosomal analysis of "failed-fertilized" human oocytes resulting from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. J Med Asso Thai 2001; 84: 532-8.
22. Monks NJ, Turner K, Hooper MA, Kumar A, Verma S, Lenton EA. Development of embryos from natural cycle in-vitro fertilization: impact of medium type and female infertility factors. Hum Reprod 1993; 8: 266-71.
23. Widra EA, Gindof PR, Smotrich DB, Stillman RJ. Achieving multiple-order embryo transfer identifies women over 40 years of age with improved in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1996; 65: 103-8.

8-Thanida 227 7/22/06, 9:51
Black