บทความพิเศษ

การปฏิสนธินอกร่างกาย และการย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อการตั้งครรภ์

ประมวล วีรุตมเสน*

Virutamasen P. In vitro fertilization and embryo transfer. Chula Med J 1987 Sep; 31(9) : 757-767

In vitro fertilization and embryo transfer (IVF + ET) is one of the techniques used for some specifically infertile couples. Since the first IVF + ET baby was born in 1978, many studies in this area have been carried out throughout the world. In Thailand, our Human Reproduction Unit at the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, had started researches in this area since 1982. We have progressed step by step from animal experiments to finally, human IVF + ET. The first Thai IVF + ET baby was born in August 15, 1987.

This article is a review of the techniques involved in our in vitro fertilization and embryo transfer programme. They concern the selection of infertile couples for the evaluation and preparation, superovulation regimens, follicular growth monitoring and timing of ovum pick up, oocyte aspiration technique, oocyte searching technique, cell culture and in vitro fertilization technique, facilitation and monitoring of embryo growth before embryo transfer; the last is the embryo transfer technique.

Reprint requests : Virutamasen P. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. September 2, 1987.

* ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาและวิจัยของการปฏิสนธินอกร่างกายรวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาในคู่สมรสที่มีบุตรยากได้เจริญก้าวหน้าไปมากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา[1,2] การศึกษาและค้นคว้าถึงการปฏิสนธินอกร่างกายได้มีนักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมาเป็นเวลานานกว่า 100 ปี แต่ที่มีรายงานแสดงให้เห็นถึงการผสมนอกร่างกายได้สำเร็จเป็นครั้งแรกคือกระทำขึ้นในกระต่ายเมื่อปี ค.ศ. 1959 โดย M.C. Chang[3] หลังจากนั้นได้มีผู้ศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นรวมทั้งในคน สำหรับในคนสามารถผสมไข่และตัวอสุจิสำเร็จเมื่อปี ค.ศ. 1969[4] หลังจากนั้นอีกนานเกือบ 10 ปี จึงประสบความสำเร็จที่สามารถให้กำเนิดทารกได้เมื่อวันที่ 25 กรกฎาคม ค.ศ. 1978 โดยคณะแพทย์ชาวอังกฤษ หลังจากนั้นอีก 1-2 ปี คณะแพทย์ชาวออสเตรเลียจึงประสบความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อการตั้งครรภ์ในคน[5] นับจากนั้นเป็นต้นมาการศึกษา และวิจัยทางแขนงนี้ได้กระทำอย่างกว้างขวางเกือบทุกสถาบันทางการแพทย์ของภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก และคาดว่ามีทารกที่เกิดมาโดยวิธีการนี้มากกว่า 3,000 คนทั่วโลก

I) การเลือกและเตรียมคู่สมรสที่มีบุตรยากที่เหมาะสมเพื่อการปฏิสนธินอกร่างกายและการตั้งครรภ์

นับว่ามีความสำคัญและจำเป็น คู่สมรสเหล่านี้ควรจะต้องได้รับการตรวจและรักษาโดยกระบวนการที่ทำอยู่ในทางปฏิบัติการดูแลผู้ที่มีบุตรยากอย่างครบถ้วนสมบูรณ์แล้วแต่ไม่ประสบความสำเร็จและแพทย์ผู้รักษาได้พิจารณาแล้ว วิธีการนี้จะเป็นวิธีอีกวิธีหนึ่งที่อาจจะนำมาแก้ไขปัญหาการมีบุตรยากได้ สาเหตุของการมีบุตรยากได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

Table 1 Aetiology of Infertility

Causes	%
Male : Abnormal Semen	40
Female :	40
- Acquired Tubal Obstruction or Dysfunction	(50)
- Ovulatory Dysfunction	(25)
- Endometriosis	(15)
- Uterine Anomaly	(5)
- Cervical Factors	(5)
Immunological Factors	5
Uncommon Aetiologies	5

ดังนั้นการรักษาด้วยยาและการผ่าตัดโดยเฉพาะด้วยวิธีจุลศัลยกรรมควรจะพิจารณาก่อน หากการผ่าตัดผ่านพ้นไปแล้วเป็นเวลา 1 ปีแล้ว คู่สมรสนั้นยังไม่สามารถมีบุตรได้ มีผู้เสนอให้นำวิธีการนี้มาช่วยแก้ปัญหา สำหรับการเลือกข้อชี้บ่งเพื่อความเหมาะสมอาจจะแบ่งได้ดังนี้[6] (ดังตารางที่ 2)

1) สตรีที่มีปัญหาหรือพยาธิสภาพที่หลอดมดลูก เช่นหลอดมดลูกอุดตันจากการติดเชื้อหรือผ่าตัด หลอดมดลูกเคลื่อนไหวไม่ได้ปกติเนื่องจากมีพยาธิสภาพหรือพังผืดยึดเหนี่ยวรอบ ๆ หลอดมดลูก

2) Endometriosis ก่อนจะนำสตรีที่มีบุตรยากเนื่องจากปัญหานี้มาเก็บไข่เพื่อผสมนอกร่างกายจากสตรีเหล่านี้ควรจะได้รับการรักษาด้วยยาและผ่าตัดมาก่อนเพราะโดยวิธีการ 2 อย่างนี้สตรีเหล่านั้นอาจจะตั้งครรภ์เองได้

3) ปัญหาทางฝ่ายชายโดยเฉพาะมีตัวอสุจิน้อยและเคลื่อนไหวไม่ดีพอโดยที่คู่สามีภรรยาไม่ยอมรับต้องการผสมเทียมโดยใช้ตัวอสุจิของชายอื่น การทำปฏิสนธินอกร่างกายต้องการตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวดีอย่างน้อยบวก 2 และมีตัวอสุจิอย่างน้อย 2.5 ล้านตัวต่อการหลั่งน้ำอสุจิ 1 ครั้ง โดยต้องการตัวอสุจิเพียง 50,000-100,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ เพื่อการผสม

4) คู่สมรสที่มีบุตรยากโดยไม่ทราบสาเหตุหรือยังไม่มีคำอธิบายถึงปัญหาการมีบุตรยาก อาจจะนำมารักษาโดยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายได้

5) ปัญหามีภูมิต้านทานและปัญหาของเยื่อมูกปากมดลูกผิดปกติซึ่งได้รับการรักษาด้วยยาแล้วไม่ได้ผลอาจจะนำมาพิจารณาเพื่อใช้วิธีการปฏิสนธินอกร่างกายเข้าแก้ไข

Table 2 Aetiology of Infertility in Couples on the "IVF" Programe

Causes	%
- Tubal Diseases one or two tubes - blocked, dysfunction	52
- Endometriosis previously treated by medical/ treatment/surgery	18
- Semen Abnormalities oligospermia, reduced motility	15
- Poorly explained or unexplained infertility (immunological cause?)	15

ก่อนที่จะดำเนินการเพื่อให้เกิดการตั้งครรภ์ด้วยวิธีนี้ อายุของภรรยาไม่ควรเกิน 40 ปี ทั้งนี้เพราะโอกาสจะแท้งมีมากกว่าสตรีที่มีอายุน้อยกว่า[6] ในอุ้งเชิงกรานต้องไม่มีพังผืดมากจนไม่สามารถจะเก็บไข่โดยการส่องกล้อง สำหรับในต่างประเทศอาจจะเก็บไข่ผ่านทางช่องคลอด มดลูกจะต้องไม่มีความผิดปกติหรือมีพยาธิสภาพเช่น เนื้องอกของมดลูกซึ่งอาจจะมีอุปสรรคต่อการตั้งครรภ์ สตรีที่มีอายุเกิน 35 ปีควรจะต้องตรวจหน้าที่ของรังไข่โดยเฉพาะช่วงหลังไข่ตก ควรหาระดับโปรเจสเตอโรน โปรแลคตินและ FSH (Follicular Stimulating Hormone) การตรวจน้ำอสุจิมีความจำเป็น หากเป็นไปได้การทำ Zona-free hamster egg จะเป็นสิ่งที่จะต้องทำ โดยเฉพาะในรายที่มีตัวอสุจิน้อยและไม่แข็งแรงและประการสุดท้ายทั้งคู่สามีภรรยาจะต้องเข้าใจในกระบวนการดังกล่าวอย่างเข้าใจ ยอมรับความล้มเหลวของขั้นตอนต่าง ๆ ตลอดจนความสำเร็จที่จะได้รับ และต้องพึงระลึกเสมอว่าวิธีการดังกล่าวจะใช้เป็นวิธีการเลือกสุดท้ายที่อาจจะช่วยแก้ปัญหาการมีบุตรยากได้

II) การชักนำเพื่อให้มีไข่สุกหลายใบ การนำไข่ที่เจริญเติบโตด้วยการกระตุ้นของฮอร์โมนโดยธรรมชาตินับว่าเป็นสิ่งที่ดีที่สุดทั้งในด้านการผสมและการฝังตัว แต่มีอุปสรรคในการเก็บไข่เนื่องด้วยจะได้ oocyte เพียง 1 ใบ โอกาสจะล้มเหลวในการเก็บจะมีมาก การกระตุ้นให้มีไข่สุกหลายใบเพื่อให้ได้ไข่หลายใบเป็นวิธีที่ยอมรับโดยทั่วไป[7,8] สำหรับวิธีการและชนิดของยาที่ใช้กระตุ้นให้มีไข่สุกหลายใบมีหลายอย่างอาจจะแบ่งได้ดังนี้

1) ให้ Clomiphene citrate ร่วมกับ Human Chorionic Gonadotropin (hCG) โดยให้ Clomiphene citrate รับประทาน 50-150 มก./วัน เริ่มให้วันที่ 2-5 ของรอบประจำเดือนติดต่อกันเป็นเวลานาน 5 วัน แล้วให้ hCG 2500-4000 ยูนิต ในวันที่ 12 หรือ 13 ของรอบเดือนขึ้นอยู่กับขนาดของ follicle และปริมาณเอสโตรเจนต่อ follicle (โดยปกติ follicle ที่โตเต็มที่จะให้เอสโตรเจนประมาณ 450-550 พิโคกรัมต่อมล.ต่อ follicle) การให้ยาด้วยปริมาณดังกล่าวพบว่าสามารถนำ oocyte มาและผสมเพื่อการตั้งครรภ์ได้[9] จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างให้ยา Clomiphene citrate 50 มก. หรือ 150 มก.ต่อวัน เป็นเวลา 5 วัน โดยเริ่มให้ตั้งแต่วันที่ 5-9 ของรอบเดือน แล้วให้ hCG 2500 ยูนิตเมื่อ follicle มีขนาดโต 20 มม. ก่อนที่จะเก็บไข่ 36 ช.ม. พบว่าอัตราการตั้งครรภ์จะมากกว่าให้ Clomiphene citrate ด้วยปริมาณมากกว่านี้[10]

2) ให้ Clomiphene citrate ร่วมกับ Human Menopausal Gonadotropin (hMG) และ hCG โดยให้ Clomiphene citrate รับประทานวันละ 100-150 มก./วัน เริ่มวันที่ 2 หรือ 3 ของรอบประจำเดือนเป็นเวลา 5 วัน แล้วให้ hMG วันละ 2 หลอด (150 ยูนิต) เป็นเวลา 3-5 วัน เริ่มวันที่ 6 หรือ 7 ของรอบเดือน หรือให้ hMG วันละ 2 หลอด วันที่ 3,5,7,8,9,10 และ 11 ของรอบประจำเดือน จากนั้นจะให้ hCG 5000 ถึง 10000 ยูนิต ขึ้นอยู่กับขนาดของ follicle และปริมาณเอสโตรเจน จากการศึกษาพอจะสรุปได้ว่าการให้ Clomiphene citrate ร่วมกับ hMG และ hCG ให้ผลดีกว่าวิธีการกระตุ้นอย่างอื่น[2] การศึกษาของผู้เขียนขณะนี้ให้ Clomiphene citrate 100 มก./วัน เริ่มให้วันที่ 2 ของรอบเดือนเป็นเวลา 5 วัน และให้ hMG วันละ 2 หลอด (150 ยูนิต) (เช้า-เย็น) เป็นเวลา 4-6 วัน โดยเริ่มให้วันที่ 6 ของรอบประจำเดือน ดูขนาดของ follicle และปริมาณของเอสตราไดออลเป็นหลักเมื่อ follicle ใบใดใบหนึ่งโตถึง 18 มม.และ/หรือปริมาณเอสโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของวันที่ผ่านมาจะหยุดให้ hMG แล้วให้ hCG 5000 ถึง 10000 ยูนิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนของ follicle ที่โต จะให้ hCG ประมาณ 34-36 ชั่วโมงก่อนกำหนดเวลาเก็บ oocyte ดังที่แสดงในรูปที่ 1

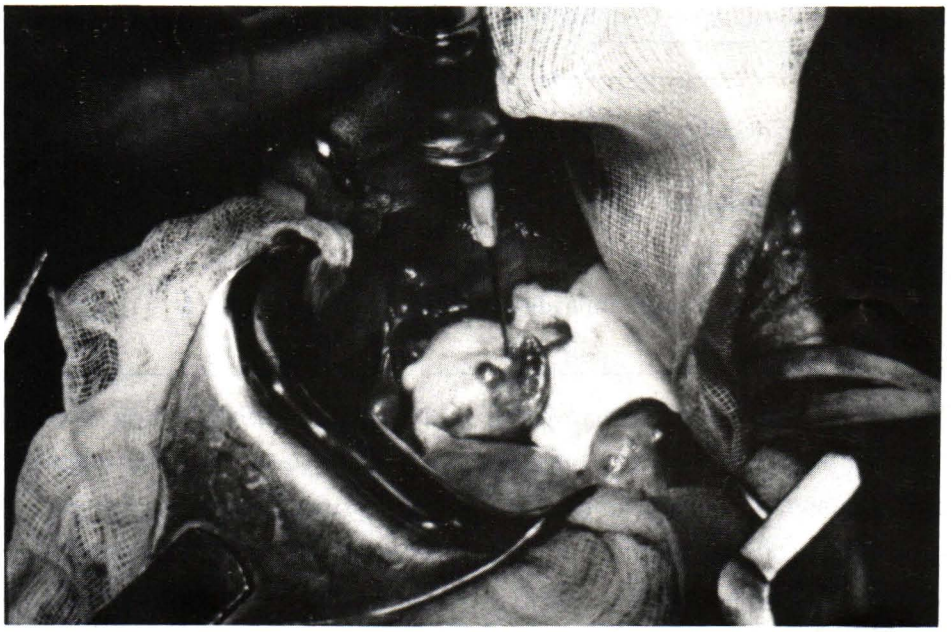

Figure 1 Mature follicles of both ovaries after clomiphene citrate/hMG stimulation and the needle puncturing on one of the follicles for oocyte aspiration.

การให้ hMG อย่างเดียวในปริมาณสูงจะทำให้ร่างกายได้รับการกระตุ้นด้วย Gonadotropin มาก โดยเฉพาะ FSH ทำให้มี follicle โตหลายใบ แต่ละ follicle ที่โตจะมีขนาดเล็กกว่าถูกกระตุ้นโดย Clomiphene citrate แต่ follicle จะแยกได้ชัดเจนกว่า และจะทำให้ช่วงเวลาหลังไข่ตกสั้น มีการทำงานของรังไข่ไม่สมบูรณ์ (Corpus luteum defect)[11] ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเกิดจากเซลล์ชนิด granulosa ถูกทำลายไปมากขณะดูดเอา oocytes ออกไป การที่มีไข่สุกหลายใบจากการให้ hMG จะทำให้เอสโตรเจนในเลือดมากเกินไป อาจจะทำให้การเจริญเติบโตและการทำงานของ corpus luteum ไม่สมบูรณ์[12] ยิ่งกว่านั้นการที่ให้ hMG ในปริมาณมากจะทำให้ Zona pellucida เปราะทำให้การฝังตัวของตัวอ่อนไม่ดี ความล้มเหลวจากการย้ายฝากตัวอ่อนจะเพิ่มสูงขึ้น

3) ได้มีผู้นำ FSH (Metrodin) ให้ร่วมกับ hMG แล้วฉีด hCG ในช่วงหลังก่อนเก็บไข่ Metrodinประกอบด้วย FSH 75 ยูนิตมี LH อยู่ประมาณ 2 ยูนิต โดยเริ่มฉีดตั้งแต่วันที่ 3 ของรอบเดือนด้วยขนาด 75-150 มิลลิยูนิต (1-2 หลอด/วัน) เป็นเวลา 5 วัน แล้วให้ hMG ด้วยขนาด 75-150 มิลลิยูนิตเป็นเวลา 3-5 วันขึ้นอยู่กับขนาดของ follicle เมื่อ follicle โต 16-17 มม. หยุดยา 50-60 ชั่วโมง แล้วให้ hCG 5000-10000 ยูนิต 36 ชั่วโมงก่อนเก็บไข่ พบว่าได้ผลดี อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลดังกล่าว

III) การเฝ้าระวังและติดตามดูการเจริญเติบโตของ follicle การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อตรวจสอบขนาดของ follicle จนกระทั่งไข่สุกหลุดออกจากรังไข่ นับว่ามีความสำคัญและจำเป็นต่อการศึกษาและวิจัยของการปฏิสนธินอกร่างกาย การดูการเจริญเติบโตของ follicle อาจจะกระทำด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทางหน้าท้องหรือกระทำผ่านทางช่องคลอด ซึ่งสะดวกกว่าและให้ความแม่นยำสูง การวัดปริมาณเอสโตรเจนควบคู่ไปกับการวัดขนาดของ follicle พบว่าสามารถพยากรณ์การเจริญเติบโตของ follicle ได้ถูกต้องและแม่นยำ[13] (รูปที่ 2)

การวัดปริมาณเอสโตรเจน (เอสตราไดออล) ในเลือดทุกวันมีความจำเป็นเพราะจะช่วยชี้ให้ทราบถึงการเจริญเติบโตของ follicle ในช่วงก่อนไข่ตก เอสโตรเจนในเลือดมากกว่าร้อยละ 90 มาจาก follicle เอสโตรเจนที่อยู่ในเลือดที่ระดับ 700 พิโคโมล/ลิตร นาน 50 ชั่วโมง สามารถทำให้เกิด LH peak ได้[14] เมื่อระดับเอสโตรเจนสูงเป็น peak แล้วไข่จะสุกหลังจากนั้น 34 ชั่วโมง (24-72 ชั่วโมง) โดยประมาณ ในขณะที่ follicle ที่เจริญเติบโตโดยธรรมชาติจะมีขนาด 17-25 มิลลิเมตร[15] แต่ถ้ากระตุ้นด้วย clomiphene

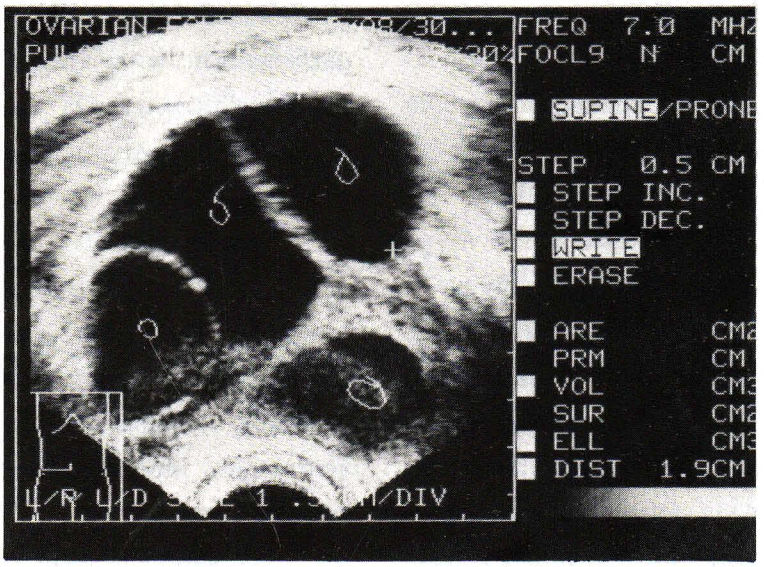

Figure 2 A demonstration of follicles and their sizes under trans-vagina ultrasonography

citrate ขนาดของ follicle จะโตประมาณ 15-23 มิลลิเมตร[16] อย่างไรก็ตามหากได้ตรวจ LH ในเลือดในช่วงเวลาไข่สุก LH จะเป็นดรรชนีอย่างดีในการกำหนดเวลาไข่ตก[17,18,19] ในรอบประจำเดือนที่ไข่สุกเองตามธรรมชาติ ระดับเอสโตรเจนจะสูงสุดระหว่าง 1100-2200 พิโคโมล/ลิตร โดยที่จะอยู่ในระดับนี้ 1-3 วันก่อนมีไข่ตก[14] เมื่อเริ่มมี LH peak ระดับเอสโตรเจนจะลดลงเหลือ 360-730 พิโคโมล/ลิตร เมื่อไข่ตกแล้วระดับเอสโตรเจนในเลือดจะเพิ่มมากอีกครั้งหนึ่งแต่จะสูงเพียงครึ่งหนึ่งของช่วงที่มีก่อนไข่สุก

สำหรับในสตรีที่ได้รับการกระตุ้นด้วย clomiphene citrate 150 มก./วัน เป็นเวลา 5 วัน พบว่าระดับเอสโตรเจนจะสูง 4200 ± 250 พิโคโมล/ลิตร แสดงว่ามีไข่สุกพร้อมกันหลายใบ โดยปกติ follicle ที่มีขนาดโตเท่ากับหรือมากกว่า 18 มม. จะสังเคราะห์เอสโตรเจนได้โดยเฉลี่ย 1700 ± 70 พิโคโมล/ลิตร (พิสัยระหว่าง 1000-2500 พิโคโมล/ลิตร)[10] แต่ถ้าให้ Clomiphene citrate ที่ปริมาณน้อยลงระดับเอสโตรเจนในเลือดจะน้อยกว่า แต่ปริมาณเอสโตรเจนต่อ follicle จะเท่ากัน

สำหรับสตรีที่ได้รับการกระตุ้นด้วย hMG follicle ที่โตขึ้นจะมีขนาดเล็กกว่าได้รับการกระตุ้นด้วย Clomiphene citrate หรือแม้แต่เจริญเติบโตเองโดยธรรมชาติ ขนาดของ follicle ที่โตเต็มที่จะมีขนาด 15-17 มม.[16] ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะ LH ที่จะต้องหลั่งมาเองโดยธรรมชาติถูกยับยั้งโดย hMG หรือเป็นเพราะอัตราส่วนของ FSH ต่อ LH ใน hMG คงที่ มีส่วนยับยั้งการเจริญเติบโตของ follicle การให้ hMG ในปริมาณมากอาจจะเร่งให้ oocyte แก่เร็วก่อนกำหนด ทำให้ปริมาณเซลล์ชนิด granulosa น้อย อาจมีผลโดยตรงทำให้น้ำใน follicle น้อยกว่าปกติ

โดยสรุปการกระตุ้นให้มีไข่สุกหลายใบด้วยวิธีต่าง ๆ มีข้อดีและข้อเสียต่างกัน แต่จุดมุ่งหมายสำคัญเพื่อให้ได้ oocyte ที่แก่พอดี และมีรังไข่สามารถสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนได้ดีภายหลังเอาไข่ออกแล้ว การเฝ้าระวังการเจริญเติบโตของ follicle ด้วยการหาระดับเอสโตรเจนร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง สำหรับการให้ hCG ก่อนเก็บไข่ด้วยปริมาณเท่าใดและเวลาใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของ follicle ที่ตอบสนองและระดับของเอสโตรเจนที่ตรวจพบ

IV) การเก็บไข่ การเก็บไข่เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญเพราะอาจจะเก็บไข่ไม่ได้เลย เนื่องจากมีพังผืดหรือมี omentum หรือมีลำไส้ปิดรังไข่ซึ่งจะพบได้บ่อยกับคนที่เคยผ่าตัดมาก่อนเช่นเป็น Endometriosis หรือปีกมดลูกอักเสบ ความล้มเหลวอาจจะเกิดจากความบกพร่องทางเทคนิคที่ไม่สามารถเก็บไข่ได้เอง หรือเป็น follicular cyst แต่ไม่ใช่ follicle ในการเก็บไข่ที่ดีควรจะต้องเจาะหน้าท้องเป็น 3 รู คือ สำหรับส่องกล้อง สำหรับใส่เครื่องมือจับรังไข่และรูสำหรับแทงเข็มผ่านหน้าท้องเพื่อเก็บไข่ เครื่องมือที่ใช้ต้องมีความสะอาดปราศจากสารเคมีเจือปน จะต้องล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 3 ครั้ง

เข็มเจาะควรใช้ขนาดกลางมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 14 มม. แรงดูดใช้ประมาณ 100-120 มม. ปรอท ถ้าแรงเกินไปอาจจะทำลายเซลล์ของ granulosa อาจจะเกิดความผิดปกติหลังไข่ตกได้ ภายหลังดูดน้ำในรังไข่แล้วจะต้องล้าง follicle ด้วยน้ำเลี้ยงเช่น Ham's F-10 อีก 1-2 ครั้งเพื่อให้ได้ oocyte มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ การดูด oocyte ด้วยเครื่องดูดจะมีประสิทธิภาพมากกว่าใช้มือดูด

ตำแหน่งการดูด follicle มีความสำคัญ ควรจะเริ่มเจาะจาก follicle ที่มีขนาดโตก่อนและเลือกตำแหน่งที่บางใกล้จะแตก (Stigma) หากเลือกตำแหน่งอื่นเกรงว่า follicle อาจจะแตกตรงตำแหน่งนี้ ขณะที่เจาะเข็มผ่านผนัง follicle ขณะดูดของเหลวจาก follicle ควรดูดด้วยแรงดูดที่สม่ำเสมอ 100-120 มม.ปรอท ถ้าแรงเกินไปจะทำให้ oocyte ชอกช้ำ เป็นผลให้การผสมล้มเหลว ขณะดูดควรหมุนเข็มรอบ ๆ follicle เบา ๆ เพื่อให้แน่ใจว่า oocyte ที่ติดอยู่บน follicle หลุดตามมา แต่ถ้าดูดแรงเซลล์ชนิด granulosa ถูกดูดออกมามากจะเป็นผลทำให้เกิดภาวะ corpus luteum defect ได้ follicle ก่อนการตกไข่จะมีเซลล์ชนิด granulosa ประมาณ 50-60 ล้านเซลล์[20] ขณะที่มีการเจาะเอา oocyte ออกมาจะมีเซลล์ชนิดนี้หลุดออกมาโดยเฉลี่ย 3 ล้านเซลล์ (6000 ถึง 12 ล้านเซลล์)[21] จึงเชื่อว่าถ้าเซลล์นี้ถูกทำลายไปมากเท่าใดโอกาสที่จะเกิด corpus luteum defect จะมีมากเท่านั้น[22]

ปัญหาการเกิด Corpus luteum defect ภายหลังเจาะไข่แล้วเป็นสิ่งสำคัญต่อการฝังตัวของตัวอ่อน การกระตุ้นให้ไข่สุกด้วย Clomiphene citrate จะทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนสูงภายหลังเก็บไข่ 3 วัน และมีระดับสูงกว่าการตกไข่ตามธรรมชาติ ซึ่งหากกระตุ้นด้วย hMG จะให้ผลตรงข้ามและหาก follicle ถูกรบกวนด้วยเข็มเจาะให้เกิดความชอกช้ำมาก ภาวะดังกล่าวจะรุนแรงยิ่งขึ้น[22] การดมยาสลบพบว่าทำให้ระดับ PRL (Prolactin) ในเลือดสูงขึ้น อาจจะเกิดเนื่องจากผู้ป่วยที่กลัวการผ่าตัด หรือเป็นเพราะยาสลบยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ระดับ PRL ในเลือดสูงจะมีผลต่อการฝังตัวอ่อนหรือไม่เป็นสิ่งที่ต้องศึกษาต่อไป

V) การตรวจหา oocytes เมื่อได้ Follicular Fluid ทั้งที่ได้โดยตรงจากการเจาะและที่ได้จากการล้าง follicle ซึ่งจะพบว่ามีเลือดปน บางท่านแนะนำให้ใส่ heparin 1 ยูนิตต่อน้ำยาที่ใช้ล้าง 2 มล. เพื่อป้องกันการจับตัวของเม็ดเลือดแดงซึ่งทำให้ยากแก่การหา oocyte เมื่อได้ Follicular Fluid ต้องรีบนำมาตรวจหา oocyte ใน laminar flow hood ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Dissecting ที่มีกำลังขยาย 80 เท่าหรือมากกว่า หรืออาจจะใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted

oocyte ที่พบอาจจะแบ่งได้เป็น

1) ชนิดที่อ่อน (Immature) oocyte ชนิดนี้จะลอยตัวอยู่กับกลุ่มเซลล์ชนิด granulosa ล้อมด้วยเซลล์ชนิด corona radiata หนาทึบหลายชั้น เป็นกลุ่มเซลล์ที่เห็นได้ชัดเจนไม่สามารถดูได้ด้วยตาเปล่าจะสามารถดูได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted oocyte ชนิดนี้จะได้จาก follicle ขนาดเล็กกว่า 10 มม.

2) ชนิดปานกลาง (Intermediate) oocyte เหล่านี้จะได้จาก follicle ขนาดโตกว่า 10 มม.ขึ้นไป oocyte ล้อมรอบด้วยเซลล์ชนิด corona radiata 3-4 ชั้น แต่มีกลุ่มเซลล์ชนิด cumulus cell mass complex มีลักษณะมูกเหนียวปนกับเซลล์ชนิด granulosa ล้อมรอบอยู่ อาจจะเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือกล้องจุลทรรศน์ชนิด Dissecting

3) ชนิดแก่เต็มที่ (Mature) oocyte เหล่านี้จะได้จาก follicle ที่มีขนาดโตตั้งแต่ 17-18 มม.ขึ้นไป จะสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่ามีลักษณะสีขาวคล้ายวุ้น รวมตัวเป็นกลุ่ม cumulus cell mass complex มีเซลล์ชนิด corona radiata ล้อมรอบ oocyte 1-2 แถว

เมื่อได้ oocyte จะต้องรีบล้างด้วยน้ำเลี้ยง Ham's F-10 2-3 ครั้ง เพื่อเอาเม็ดเลือดแดงออกแล้วนำไปใส่น้ำเลี้ยง Ham's F-10 ที่มีน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่เจาะเก็บไว้เมื่อ 36 ชั่วโมงก่อนเก็บไข่ในความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วนำไปใส่ตู้อบที่มีแก๊สผสมโดยจะปฏิบัติดังนี้

1) oocyte ที่แก่เต็มที่จะใส่ตู้อบไว้นาน 5-6 ชั่วโมงก่อนใส่ตัวอสุจิ

2) oocyte ที่แก่น้อยจะใส่ตู้อบไว้ประมาณ 12-16 ชั่วโมง

3) oocyte ที่อ่อนมากจะใส่ตู้อบไว้ 24-28 ชั่วโมงก่อนจะผสมจะต้องตรวจพบ first polar body ก่อนมิฉะนั้นโอกาสจะปฏิสนธิและแบ่งตัวมีน้อยมาก

ระยะเวลาที่เหมาะสมที่เลี้ยง oocyte ที่แก่เต็มที่ในตู้อบก่อนการผสมได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

Table 3 Appropriate incubation time before insemination[23]

Incubation time (hours)	rate of fertilization
0 – 1/2	26%
4 – 4 1/2	50%
5 – 5 1/2	89%
6 – 6 1/2	69%

VI) การเตรียมตัวอสุจิก่อนผสม น้ำเชื้อผู้ชายควรจะได้รับการตรวจอย่างน้อย 2-3 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่ามีจำนวนตัวอสุจิที่ดีพอ, ในน้ำอสุจิไม่ควรมีเม็ดโลหิตขาว ซึ่งแสดงว่ามีการติดเชื้ออยู่ในทางเดินปัสสาวะ หรือต่อมลูกหมาก เมื่อได้ไข่แล้วจึงจะเก็บเชื้ออสุจิจากสามีโดยกำหนดเวลาตามลักษณะไข่ที่ได้คือประมาณ 1-2 ชั่วโมงหลังเก็บไข่ได้โดยให้ผู้ชายหลั่งอสุจิในที่สะอาด ล้างมือและทำความสะอาดอวัยวะเพศด้วยสบู่ฆ่าเชื้อแล้วให้หลั่งน้ำเชื้ออสุจิลงใน Beaker ที่สะอาด นำน้ำเชื้ออสุจิทิ้งไว้ให้ละลายตัว ประมาณ 15-30 นาที แล้วนำไปนับ ถ้าปริมาณอสุจิมากกว่า 150 ล้าน/มล. และมีการเคลื่อนไหวดีมากกว่าร้อยละ 60 จะใช้น้ำอสุจิเพียง 0.5 มล.ไปล้าง หากปริมาณตัวอสุจิระหว่าง 60-150 ล้าน/มล. จะนำน้ำอสุจิไปใช้เพียง 1 มล. ถ้าตัวอสุจิ 20-60 ล้าน/มล. จะใช้น้ำเชื้ออสุจิ 2 มล. หากตัวอสุจิน้อยกว่า 20 ล้าน/มล. และมีการเคลื่อนไหวน้อยจะใช้เชื้ออสุจิทั้งหมด จากนั้นนำน้ำอสุจิล้างด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ Ham's F-10 ที่มีซีรั่มของภรรยาที่ได้เมื่อ 32-36 ชั่วโมงก่อนเก็บไข่หรือซีรั่มจากเลือดของสายสะดือเด็กแรกเกิด โดยทำให้มีความเข้มข้นร้อยละ 7.5-10 เติมน้ำเลี้ยงตัวอ่อน Ham's F-10 ตามที่ได้ผสมกับซีรั่มไว้แล้วลงในน้ำอสุจิตามปริมาณที่ได้กล่าวแล้ว โดยใส่น้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 3 เท่าของปริมาณน้ำเชื้ออสุจิ จากนั้นนำไปปั่นด้วยความแรง 200-500 g เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนบนเททิ้งแล้วเติมน้ำเลี้ยง Ham's F-10 อีก 2 มล. ปั่นด้วยเครื่องปั่นนาน 5 นาที เทส่วนผสมที่ตกตะกอนทิ้ง (ควรใช้ pipette ดูด) ให้เหลือส่วนใสที่อยู่เหนือส่วนที่ตกตะกอนประมาณ 0.1 มล. จากนั้นค่อย ๆ เขย่าส่วนที่ตกตะกอนให้เข้ากัน ค่อยเติมน้ำเลี้ยงเชื้อ Ham's F-10 ถ้าตัวอสุจิปริมาณมากเติมน้ำเลี้ยงเชื้อ 3 มล. ทำให้เกิดเป็นชั้นแยกจากกัน ถ้าตัวอสุจิน้อยและเคลื่อนไหวไม่ดีเติมน้ำเลี้ยงเชื้อ 1-2 มล. นำไปใส่ตู้อบ 20-30 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นดูดส่วนบนประมาณครึ่งหนึ่งใส่หลอดพลาสติคแยกใส่ตู้อบไว้ ส่วนที่เหลือเขย่าให้เข้ากันดี แล้วนำไปนับจำนวนเพื่อใช้เป็นแนวทางในการผสมกับไข่ โดยจะเติมตัวอสุจิจากน้ำเลี้ยงที่อยู่ในส่วนใส 50,000-100,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. หลังผสม 27-30 ชั่วโมง จะพบไข่ที่ถูกผสมติดอยู่กับพื้นจานทดลอง เซลล์รอบ ๆ ไข่จะกระจายออก อาจจะพบ second polar body และ pronuclei ถ้าพบแสดงว่าการผสมได้เกิดขึ้นแล้ว ย้ายไข่ที่ผสมแล้วลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นซีรั่มร้อยละ 15-20 โดยทั่วไปจะพบแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ ในเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 3) จากนั้นการแบ่งตัวจะเกิดโดยเร็ว ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4

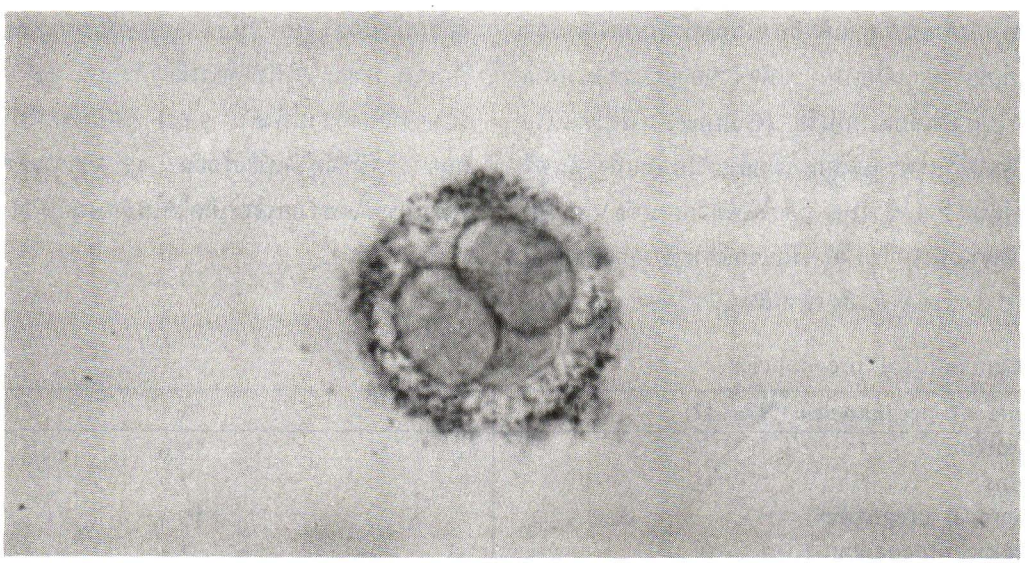

Figure 3 A demonstration of 3 cell stage-embryo 24 hours after fertilization

Table 4 Human embryo development stages after fertilization

Stage of embryo development	Time after fertilization (hour)
Pronuclei	27
2 – cells stage	27 – 43
4 – cells stage	36 – 65
8 – cells stage	45 – 73
16 – Cells stage	68 – 85
Morula	100
Blastocyst	120

การเตรียมน้ำอสุจิจากสามีที่ปริมาณตัวอสุจิน้อย แต่จำนวนน้ำอสุจิมากเช่นมากกว่า 4 มล. ต่อการหลั่ง 1 ครั้ง แต่จำนวนตัวอสุจิน้อยกว่า 20 ล้าน/มล. จะแนะนำให้หลั่งอสุจิแยกเป็น 2 ส่วน โดยจะนำส่วนแรกซึ่งมี 1-2 มล.มาใช้ ความเข้มข้นตัวอสุจิจะมากกว่า นำน้ำอสุจิที่ละลายตัวแล้วมาแบ่งในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มล. จากนั้นจะเติม Ham's F-10 2 มล. โดยทำเป็น 2 ชั้นเอียงหลอดทดลองทำมุม 45 องศาเพื่อให้มีพื้นที่ผิวของน้ำเลี้ยงมาก ทำให้ตัวอสุจิว่าย (Swimming up) ขึ้นสู่ชั้นผิวมาก ซึ่งจะมีแต่ตัวอสุจิที่แข็งแรง จากนั้นนำไปไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง โดยมีแก๊สผสมไหลผ่านตลอดเวลา จากนั้นจะนำเอาส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยง Ham's F-10 ของแต่ละหลอดทดลองมาปั่นเช่นเดียวกับวิธีดังกล่าวข้างต้น เทส่วนที่เป็นน้ำใส ทิ้งให้เหลือแต่ pellet ติดก้นแล้วเติมน้ำเลี้ยง Ham's F-10 1 มล. เขย่าให้เข้ากันดีจะมีตัวอสุจิที่ดี และพร้อมจะผสมกับไข่ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 50,000-100,000 ตัวต่อ oocyte 1 ใบ

VII) การย้ายตัวอ่อนเข้าสู่โพรงมดลูก เมื่อตรวจพบไข่ผสมได้ระยะแบ่งตัว 4 หรือ 8 เซลล์ จึงนำกลับสู่โพรงมดลูกโดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ Ham's F-10 ที่มีซีรั่มเข้มข้นร้อยละ 20 เก็บตัวอ่อนผ่านเข้าสู่สายยางพลาสติคสอดผ่าน Cannula เข้าสู่โพรงมดลูก ถ้ามดลูกคว่ำหน้าจะให้คนไข้นอนในท่า "Knee chest" ถ้ามดลูกอยู่ในท่าคว่ำหลังจะให้นอนในท่าศีรษะต่ำ จำนวนตัวอ่อนที่ใส่มีความสำคัญต่อการฝังตัว พบว่าไข่จำนวน 3 ใบจะมีโอกาสตั้งครรภ์ได้มากที่สุด[24] ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5

Table 5 Correlation of pregnancy rate and number of embryos transfered

Number of Embryo	Subject	Rate of pregnancy (%)
1	128	17 (13)
2	98	31 (32)
3	54	19 (35)
4	8	1 (13)

ภายหลังย้ายตัวอ่อนแล้วต้องนำหลอดพลาสติคตรวจสอบว่ามีตัวอ่อนค้างอยู่หรือเปล่า แล้วนำของเหลวส่วนปลายพลาสติคนำไปเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Culture) เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการติดเชื้อในโพรงมดลูก เมื่อย้ายตัวอ่อนแล้วให้สตรีนอนอยู่ในท่านั้น 2-3 ชั่วโมง แล้วให้พักอยู่บนเตียง 2 วัน จึงอนุญาตให้ทำงานเบา ๆ ได้ วันแรกที่ย้ายตัวอ่อนบางท่านแนะนำให้โปรเจสเตอโรนฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 25 มิลลิกรัมเป็นเวลา 10 วัน จากการประชุมระดับนานาชาติเมื่อปี ค.ศ. 1984 ผู้ที่ทำการเลี้ยงตัวอ่อน 58 คณะได้ทำการรักษาจากสตรีรวมทั้งสิ้น 9,641 รอบประจำเดือน ตั้งครรภ์คลอดบุตรมีชีวิตได้เพียงร้อยละ 13 จากการศึกษาบางสถาบันพบว่าการตั้งครรภ์อาจจะเกิดได้ในลักษณะต่าง ๆ ดัง ตารางที่ 6

Table 6 Outcome of pregnancies

Out come of pregnancies (N = 142)	%
Singleton	55.6
Twins	7.7
Chemical pregnancy	15.4
Ectopic pregnancy	2.1
Abortion	19.2

ปัญหาการเลี้ยงตัวอ่อนในจานทดลองเพื่อแก้ปัญหาการมีบุตรยากหรือโรคทางกรรมพันธุ์นั้น ปัจจุบันจะอยู่ที่การฝังตัวของตัวอ่อนซึ่งประสบความล้มเหลวเป็นส่วนมาก แต่หากพิจารณากับความเป็นจริงตามธรรมชาติของคู่สามีปกติในรอบเดือนหนึ่ง ๆ ประมาณร้อยละ 50 เท่านั้นที่ตั้งครรภ์ และประมาณร้อยละ 25-30 เท่านั้นที่ตั้งครรภ์และคลอดเป็นปกติ ตัวอ่อนที่เลี้ยงไม่สามารถฝังตัวได้ดีที่โพรงมดลูกน่าจะเนื่องจากระบบต่อมไร้ท่อร่วมกับการเจริญเติบโตของเยื่อบุโพรงมดลูกที่ไม่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของตัวอ่อน จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตและแบ่งตัวช่วงแรกของตัวอ่อนระหว่างในจานทดลองและธรรมชาตินั้น มีอัตราการแบ่งตัวในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน แต่หลังจากการแบ่งตัวช่วง 8 - เซลล์ไปแล้ว การแบ่งตัวในจานทดลองจะช้ากว่า จากการศึกษาและสังเกตเชื่อว่าถ้าตัวอ่อนแบ่งได้เป็น 8 - เซลล์ภายใน 55 ชั่วโมง โอกาสย้ายตัวอ่อนกลับเข้าโพรงมดลูกเพื่อให้ฝังตัวตั้งครรภ์ได้ผลดี[8] เป็นที่น่าสังเกตการนำตัวอ่อนกลับเข้าโพรงมดลูกในช่วงการแบ่ง 4 - เซลล์ หรือ 8 - เซลล์จะได้ผลดีที่สุด

เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้มีผู้พยายามที่จะเก็บไข่หรือตัวอ่อนในช่วงแบ่งตัวระยะต่าง ๆ ไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อนำไข่มาผสมหรือนำตัวอ่อนใส่กลับโพรงมดลูกในรอบเดือนต่อไป ทั้งนี้โดยหวังผลให้เยื่อบุโพรงมดลูกได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนของรังไข่ที่ได้สัดส่วนที่ดี แต่ความพยายามดังกล่าวก็ยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควรซึ่งจะต้องทำการศึกษาและวิจัยเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวต่อไป[25]

สรุป

แม้ว่าการศึกษาและวิจัยได้กระทำกันอย่างจริงจังและกว้างขวาง แต่ผลการตั้งครรภ์จนถึงคลอดจะมีเพียงร้อยละ 20-30 เท่านั้น อุปสรรคอยู่ที่การยอมรับของเยื่อบุโพรงมดลูกต่อตัวอ่อน อย่างไรก็ตามความสมบูรณ์ของตัวอ่อนอาจจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการแบ่งตัวเพื่อการเจริญเติบโต

นับตั้งแต่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการปฏิสนธิในหลอดทดลอง มีผู้ประมาณว่ามีสถาบันที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มากกว่า 300 แห่ง และมีทารกที่เกิดโดยวิธีการนี้มากกว่า 3,000 คน และเท่าที่ได้มีการติดตามความเจริญเติบโตของเด็ก ความสามารถทางสติปัญญาของเด็กเหล่านี้ พบว่ามิได้แตกต่างไปจากเด็กที่เกิดโดยธรรมชาติแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามการติดตามศึกษาถึงพฤติกรรมอื่นคงจะต้องดำเนินต่อไป

แม้ว่าในปัจจุบันมีหลายสถาบันได้นำความรู้ของการปฏิสนธิในหลอดทดลองมาประยุกต์ในทางคลินิกเพื่อการดูแลรักษาผู้ที่มีบุตรยากอย่างมีประสิทธิภาพ แต่การศึกษาและวิจัยเพื่อให้วิธีการนี้มีประสิทธิผลยิ่งขึ้นยังคงต้องมีต่อไป นักวิทยาศาสตร์ยังขาดความรู้เกี่ยวกับกลไกของการฝังตัวอ่อนโดยเฉพาะปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ของตัวอ่อนกับเซลล์ผนังของมดลูก ฮอร์โมน เอนซัยม์ และยังมีสารชีวเคมีอีกหลายอย่างที่เกี่ยวข้องต่อปฏิกิริยาดังกล่าว นอกจากนี้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนภายหลังฝังตัว การอยู่รอดของตัวอ่อนก่อนการฝังตัว สิ่งเหล่านี้เป็นความอยากรู้และความเข้าใจของผู้สนใจเป็นเป้าหมายที่ท้าทายต่อนักวิชาการเพื่อขุดคุ้ยหาความจริง ความหวังของมนุษย์ยังไม่หยุดยั้งแต่เพียงเท่านี้ จากรูปแบบของการปฏิสนธิในหลอดทดลองเป็นโอกาสที่นักวิทยาศาสตร์ได้สัมผัสและศึกษาจุดเริ่มต้นของชีวิต ซึ่งหลังแก้ปัญหาความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์โดยการกำจัด gene ที่ผิดปกติออกไปตั้งแต่เริ่มแรก ความหวังดังกล่าวจะไม่ไกลเกินกว่าความเจริญทางชีวเทคโนโลยีและความสามารถของนักวิทยาศาสตร์

ปัญหาสุดท้ายที่นักวิทยาศาสตร์ที่ทำงานวิจัยทางแขนงนี้คือ ปัญหาทางจริยธรรม ความเข้าใจของสังคมตลอดจนความเชื่อตามแนวทางของศาสนา บางประเทศถูกต่อต้านอย่างรุนแรงเช่น ประเทศออสเตรเลียทำให้การศึกษาและวิจัยทางด้านนี้ต้องหยุดลง ส่วนประเทศอังกฤษอนุญาตให้นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาตัวอ่อนได้นานถึง 14 วัน จะเห็นได้ว่าความเจริญทางวิชาการมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา จึงอยู่ในรูปของ "Dynamics" ทั้งนี้เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของคุณภาพชีวิตและสังคมที่ดีกว่า แต่ความเชื่อลัทธิและศาสนาจะอยู่ในรูปของ "Statics" ในสังคมบางกลุ่มทำให้เกิดการเผชิญหน้าในทางความคิด อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นที่ต้องสร้างความเข้าใจและปรับดุลย์ของความคิดทั้งสองประเด็นให้สอดคล้องเข้ากันได้เพื่อให้ความเจริญทางวิชาการอันยังประโยชน์ต่อชีวิตมนุษย์จะได้ก้าวต่อไปอย่างไม่หยุดยั้ง

อ้างอิง

1. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynecol 1980 Sep; 87(9) : 737-756

2. Lopata A. Concepts of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 1983 Sep; 40(3) : 289-301
3. Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature (London) 1959; Aug 8; 184 Suppl 7 : 466-467
4. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe RC. Early stage of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature (London) 1969 Feb 15; 221 : 632-635
5. Lopata A, Johnston IW, Hoult IJ, Speirs AI. Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. Fertil Steril 1980 Feb; 33(2) : 117-120
6. Quigley MM. Patient screening and selection. In : Wolf DP, Quigley MM, eds. Human in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. New York : Planum Press, 1984. 37-46
7. Quigley MM, Maklad NF, Wolf DD. Comparison of two clomiphene citrate dosage regimens for follicular recruitment in an in vitro Fertilization program. Fertil Steril 1983 Aug; 40(2) : 178-182
8. Trotnow S, Becker H, Kniewald, T et al. Luteal phase following oocyte aspiration, in vitro fertilization, and embryo transfer in clomid/hCG-stimulated cycles. Arch Gynecol 1982; 231 : 171
9. trounson AO, Leeton JF, Wood C. et al. Pregnancies in Humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory acycle. Science 1981; 212 : 681
10. Vargyas JM, Marrs RP, Kletzky OA, Mishell DR, Jr. Correlation of ultrasonic measurement of ovarian follicle size and serum estradiol levels in ovulatory patients following clomiphene citrate for in vitro fertilization. Am J Obstet Gynecol 1982 Nov 1; 144(5) : 569-573
11. Ben-Rafael Z, Dor J, Mashiach S, Lunenfeld B, Serr DM. Abortion rate in pregnancies following ovulation induced by human menopausal gonodotrophin/human chorionic gonadotropin. Fertil Steril 1983 Feb; 39(2) : 157-161
12. Olson JL, Rebar RW, Schreiber JR, Vaitukaitis JL. Shortned luteal phase after ovulation induction with human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin. Fertil Steril 1983 Mar; 39(3) : 284-291
13. Queenan JT, O'Brien GD, Bains LM, Simpson J, Collins WP, Compbell S. Ultrasound scanning of ovaries to detect ovulation in women. Fertil Steril 1980 Aug; 34(2) : 99-105
14. Fritz MA, Speroff L. The endocrinology of the menstrual cysle : the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. Fertil Steril 1982 Nov; 38(5) : 509-529
15. O'Herlihy C, DeCrespigny L, Lopata A. Hoult I, Robinson H. Preovulatory follicular size : a comparison of ultrasound and laparoscopic measurements. Fertil Steril 1980 Jul; 34(1) : 24-26
16. Buttery B, Trounson A, McMaster R, Wood C. Evaluation of diagnostic ultrasound as a parameter of follicular development in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1983 Apr; 39(4) : 458-463
17. Garcia JE, Jones GS, Wrignt GL. Prediction of the time of ovulation. Fertil Steril 1981; 36 : 308
18. Bryce RL, Shuter B, Sinosich MJ. Saunders DM. The value of ultrasound, gonadotropin, and estradiol measurements for precise ovulation prediction. Fertil Steril 1982 Jan; 37(1) : 42-45
19. Lemay A, Bastide A, Lambert R, Rioux JE. Prediction of human ovulaltion by rapid leuteizing hormone (LH) radioimmunoassay and ovarian ultrasonography. Fertil Steril 1982; Aug; 38(2) : 194-201
20. McNatty KP, Smith DM, Makins A, Osathannondh R, Ryan KJ. The microenvironment of the human Antrol follicle : interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of gronulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1979 Dec; 49(6) : 851-860
21. Garcia J, Jones GS, Acosta AA et al. Corpus luteum function after follicle aspiration for oocyte retrieval. Fertil Steril 1981; 36 : 565
22. Frydman R, Testart J, Gracomini P, Imbert MC, Martin E, Nahoul K. Hormonal and histological study of the luteal phase in women following aspiration of the preovulatory follicle. Fertil Steril 1982 Sep; 38(3) : 312-317
23. Trounson AO, Mohr LR, Wood C. et al. Effect of delayed insemination in vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. J Reprod Fertil 1982; 64 : 285

24. Richards I. IVF update. Br Med J 1986 May 3; 292(6529) : 1156
25. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazont A, Forman R, Rainhorn JD. High pregnancy rate after early human embryo freezing. Fertil Steril 1986 Aug; 46(2) : 268-272