

อัตราการปฏิสนธิโดยวิธีฉีดอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่มนุษย์

ธนิดา พงษ์ศรีทัศน์*, กนก สีจว, หลิงหลิง สาลัง, เยาวปา จงเป็นสุขเลิศ, สีนีนางู สุขเกษม
ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Fertilization Rate by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of Human Oocytes

Thanida Pongsritasana*, Kanok Seejorn, Lingling Salung, Yaowapa Chongpensuklert, Sineenart Sukasem
Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

หลักการและวัตถุประสงค์ : การฉีดอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่หรือวิธีอิกซี่ เป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วโลกว่ามีประสิทธิภาพสูงในการรักษาภาวะมีบุตรยากจากสาเหตุฝ่ายชายชั้นรุนแรง ภาวะมีบุตรยากที่ไม่ทราบสาเหตุ กรณีที่ไข่ได้รับการเพาะเลี้ยงให้มีการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ และในกรณีที่ไม่เกิดการปฏิสนธิภายหลังจากการทำเด็กหลอดแก้ว วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตั้งครรภ์จากการช่วยการปฏิสนธิด้วยวิธีอิกซี่

วิธีการศึกษา: เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาโดยเก็บรวบรวมข้อมูลแบบย้อนหลังจากหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวนไข่ทั้งหมด 1,053 ใบที่ได้จากผู้มารับบริการรักษาด้วยวิธีอิกซี่ที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2555 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม 2557 จำนวน 164 รอบ ข้อมูลจำนวนไข่ที่เก็บได้ จำนวนไข่ที่ทำอิกซี่ จำนวนไข่ที่เกิดการปฏิสนธิ จำนวนการแบ่งเซลล์ จำนวนการตั้งครรภ์ นำมาวิเคราะห์โดยใช้สถิติปัวร์ซอง (poisson) โปรแกรม STATA

ผลการศึกษา: จากผู้รับบริการที่มารับการเจาะเก็บไข่จากรังไข่เพื่อทำอิกซี่จำนวน 164 รอบการรักษา ได้ไข่รวมทั้งสิ้น 1,053 ใบ จำนวนไข่ที่เจาะเก็บได้โดยเฉลี่ย 6.5 ± 5.5 ใบต่อรอบ ในระหว่างที่ทำการศึกษาได้ทำการปฏิสนธิด้วยวิธีอิกซี่ในไข่ที่สมบูรณ์จำนวน 876 ใบของ 156 รอบ (เฉลี่ย 5.6 ± 4.9 ใบต่อรอบ) ในการศึกษาพบว่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 82.7 และ 94.5 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิของไข่ที่ผสมด้วยวิธีอิกซี่ระหว่างกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้ (ร้อยละ 74.3) กับกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้ (ร้อยละ 87.2)

Background and Objectives: The intracytoplasmic sperm injection or ICSI is high efficiency and acceptable all over the world in treatment of severe male factor infertility, unexplained infertility, in-vitro maturation of oocytes and reinjection in non fertilized oocytes of conventional IVF method. The objective of this study was to determine the fertilization rate of human oocytes, cleavage rate and pregnancy rate in ICSI method.

Methods: This study is retrospective descriptive study that was conducted by collecting data from reproductive biology unit, Srinagarind hospital, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. Total of 1,053 human oocytes from 164 cycles which undertaken for ICSI treatments at Srinagarind hospital between January 1, 2012 to May 31, 2014. The number of retrieval oocytes, sperm injected oocytes, fertilized oocytes, cleaved rate and pregnancy rate were analysed by poisson statistic and STATA program version 10.0.

Results: In 164 treatment cycles were included for ICSI procedure. Total of 1,053 oocytes were collected. The average of oocytes obtained per retrieval was 6.5 ± 5.5 . During the study period, 876 mature oocytes had been ICSI of 156 cycles (average 5.6 ± 4.9 per cycle). The fertilization rate and cleavage rate were 82.7 % and 94.5% respectively. The fertilization rate were not statistically significant different between indication group and non indication group (74.3% and 87.2 %, $p=0.1101$). The

*Corresponding author: Thanida Pongsritasana, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand E-mail : pthani@kku.ac.th

พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.1101$) อัตราการตั้งครรภ์โดยเฉลี่ยร้อยละ 13.3 โดยพบว่าอัตราการตั้งครรภ์ของกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และไม่มีข้อบ่งชี้ร้อยละ 11.8 และร้อยละ 14.9 ตามลำดับ

สรุป: อัตราการปฏิสนธิของไข่ที่ได้รับการผสมด้วยวิธีฉีดอสุจิและอัตราการแบ่งเซลล์อยู่ในเกณฑ์ดี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาคู่สมรสที่มีบุตรยากจากสาเหตุที่มีน้ำอสุจิด้อยคุณภาพ

คำสำคัญ: ไข่, อัตราการปฏิสนธิ, อัตราการแบ่งเซลล์, การฉีดอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึม

overall of pregnancy rate in ICSI was 13.3 %. The pregnancy rate of indication group and non indication group were 11.8 % and 14.9 % respectively.

Conclusion: In this study fertilization rate and cleavage rate by ICSI were good. ICSI is an alternative method to use in treatment of infertile couples due to low quality sperm.

Keywords: ICSI, Fertilization rate, Cleavage rate, Intracytoplasmic sperm injection

ศรีนครินทร์เวชสาร 2558; 30 (6): 609-617 ♦ Srinagarind Med J 2015; 30 (6): 609-617

บทนำ

ในปี ค.ศ.1992 มีรายงานความสำเร็จในการตั้งครรภ์ที่เกิดจากการปฏิสนธิด้วยวิธีฉีดอสุจิในคนเป็นครั้งแรกโดยทีมนักวิจัยจากประเทศเบลเยียม นับเป็นความก้าวหน้าครั้งสำคัญอย่างยิ่งของวิวัฒนาการด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์และยังเป็นทางเลือกที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยมีข้อบ่งชี้ในการทำอสุจิคือ ภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุมาจากฝ่ายชายชั้นรุนแรง มีจำนวนอสุจิและการเคลื่อนที่น้อยมาก รวมทั้งตัวอสุจิมีรูปร่างที่ผิดปกติ คู่สมรสที่ล้มเหลวในการปฏิสนธิจากการทำเด็กหลอดแก้วธรรมดา ภาวะมีบุตรยากที่ไม่ทราบสาเหตุ ภาวะที่มีภูมิต้านทานต่อตัวอสุจิ อสุจิที่เก็บจากอวัยวะโดยวิธีการผ่าตัด หรือความผิดปกติอื่น ๆ ที่ไม่ได้เกิดจากสาเหตุฝ่ายชาย เป็นต้น วิธีนี้ช่วยให้คู่สมรสมีโอกาสตั้งครรภ์สูงขึ้นอย่างมาก จนใกล้เคียงกับการมีบุตรยากจากสาเหตุอื่น ทั่วโลกได้ยอมรับว่าเป็นวิธีช่วยปฏิสนธิที่ดีที่สุด^{1,4}

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ได้มีการทำอสุจิเฉพาะในรายที่มีข้อบ่งชี้คือมีตัวอสุจิน้อยกว่า 5 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร การเคลื่อนที่น้อยกว่าร้อยละ 30^{5,6} หรือในรายที่เก็บไข่แล้วได้ไข่ไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 1-2 วัน หรือในรายที่ไม่เกิดการปฏิสนธิภายหลังการทำเด็กหลอดแก้วธรรมดา จากรายงานประจำปี ของหน่วยมีบุตรยากระหว่างปี พ.ศ.2550-2555 พบว่าอัตราการปฏิสนธิจากการทำอสุจีก่อนข้างต่ำเฉลี่ยร้อยละ 63.8 ซึ่งแตกต่างอย่างมากจากการปฏิสนธิด้วยวิธีการทำเด็กหลอดแก้วที่มีอัตราการปฏิสนธิมากกว่าร้อยละ 80 แต่วิธีการทำเด็กหลอดแก้วนี้สามารถเกิดการ

ปฏิสนธิที่ผิดปกติได้ เช่น มีอสุจิเข้าผสมกับไข่มากกว่า 1 ตัว ซึ่งพบได้ร้อยละ 8 ทำให้ได้ตัวอ่อนที่ผิดปกติได้ จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีการปฏิสนธิเป็นการทำอสุจิทุกรายที่มารับบริการเจาะเก็บไข่ จากข้อมูลพบว่าผลการปฏิสนธิที่ได้เป็นที่น่าพอใจ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพื่อประเมินผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตั้งครรภ์จากการทำการปฏิสนธิด้วยวิธีดังกล่าว ผลที่ได้จากการศึกษานี้จะถูกนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพการให้บริการด้านการรักษาภาวะมีบุตรยากต่อไป

วิธีการ

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง โดยประชากรที่ทำการศึกษาคือไข่มนุษย์ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ในผู้ป่วยที่มารับบริการทำอสุจิจำนวน 164 รอบการรักษา ซึ่งได้แบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ 1) กลุ่มที่มารับบริการเจาะเก็บไข่ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2555 ถึงวันที่ 4 สิงหาคม 2556 เป็นกลุ่มที่ทำการปฏิสนธิด้วยวิธีฉีดอสุจิโดยมีข้อบ่งชี้ได้แก่ ฝ่ายชายมีจำนวนและการเคลื่อนที่ของอสุจิน้อยมาก ตัวอสุจิมีรูปร่างที่ผิดปกติและล้มเหลวจากการทำการปฏิสนธิด้วยวิธีเด็กหลอดแก้วธรรมดา เป็นต้น จำนวน 72 รอบ และ 2) กลุ่มที่มารับบริการเจาะเก็บไข่ตั้งแต่วันที่ 5 สิงหาคม 2556 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม 2557 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้ทำอสุจิทุกรายจำนวนทั้งสิ้น 92 รอบ ขั้นตอนการทำอสุจิเช่นเดียวกับการศึกษาอื่น^{1,2,11} ภายหลังจากผ่านกระบวนการกระตุ้นไข่ การเก็บไข่ไข่ที่ได้จะนำมาเตรียมโดยการย่อยเซลล์ที่อยู่รอบๆเซลล์ไข่

ออกโดยใช้ recombinant human hyaluronidase 80 U/ml ใน human albumin solution (ICSI Cumulase[®], Origio, Denmark) ไข่ที่สมบูรณ์ในระยะ metaphase II (มี first polar body) จะถูกนำมาทำอิกซี่ ทำการเพาะเลี้ยงในจานที่มี fertilization medium (Sydney IVF, COOK Medical, Australia) อยู่หดยดละ 20 ไมโครลิตรที่ถูกปิดทับด้วย culture oil (NidOil[™], Nidacon, Sweden) จำนวน 2 ใบต่อหดยด เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซออกซิเจน ร้อยละ 5 และ 6 ตามลำดับ ตรวจการปฏิสนธิภายหลังทำอิกซี่ 16-20 ชั่วโมง โดยจะเห็นเป็น 2 pronuclei (2PN) และมี second polar body ภายหลังไข่ที่มีการปฏิสนธิจะเรียกว่า เอ็มบริโอ (embryo) หรือตัวอ่อน ทำการเพาะเลี้ยงต่อไปใน cleavage และ blastocyst medium (Sydney IVF, COOK Medical, Australia) สามารถย้ายกลับตัวอ่อนไปฝังตัวที่โพรงมดลูกได้ในระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 2-5 วัน หรือตั้งแต่ระยะการแบ่งเซลล์เป็น 4 เซลล์จนถึงระยะบลาสโตซิส หากไม่มีการย้ายกลับตัวอ่อนในรอบของการเก็บไข่ จะทำการแช่แข็งตัวอ่อนเก็บไว้สำหรับการย้ายกลับในรอบประจำเดือนถัดไป โดยผู้รับบริการต้องได้รับการเตรียมเยื่อบุโพรงมดลูกให้เหมาะสมต่อการฝังตัวของตัวอ่อน จึงละลายตัวอ่อนที่แช่แข็งไว้และย้ายกลับโดยวิธีฉีดเข้าไปในโพรงมดลูก ทำการย้ายกลับตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิสจำนวนไม่เกิน 2 ตัวอ่อน ระยะอื่นๆไม่เกิน 3 ตัวอ่อน ประเมินการตั้งครรภ์จากผลการตรวจเลือดระดับ beta HCG ภายหลังการย้ายกลับตัวอ่อนประมาณ 2 สัปดาห์ ในการศึกษาที่ตัววัดที่สำคัญได้แก่ จำนวนไข่ที่เก็บได้ จำนวนไข่ที่ทำอิกซี่ จำนวนไข่ที่มีการปฏิสนธิ จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งเซลล์ จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายกลับและจำนวนการตั้งครรภ์ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติปัวร์ซง (poisson) โปรแกรม STATA version 10.0 หาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยจะถือว่ามีความสำคัญเมื่อค่า p น้อยกว่า 0.05 การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่นเรียบร้อยแล้ว HE571256

ผลการศึกษา

จากการให้บริการรักษาภาวะมีบุตรยากด้วยวิธีทำอิกซี่จำนวน 164 รอบการรักษา ในระหว่างที่ทำการศึกษามีสตรีที่มาใช้บริการเจาะเก็บไข่อายุระหว่าง 20-51 ปี (เฉลี่ย 35.9 ± 5.4 ปี) ระยะเวลาการสมรส 1-28 ปี (เฉลี่ย 6.9 ± 4.9 ปี) มีจำนวน 126 รอบ (ร้อยละ 76.8) ที่ไม่เคยตั้งครรภ์มาก่อนและจำนวน

38 รอบ (ร้อยละ 23.2) เคยตั้งครรภ์มาแล้ว ไม่เคยมีบุตรจำนวน 142 รอบ (ร้อยละ 86.6) มีบุตรแล้วจำนวน 22 รอบ (ร้อยละ 13.4) คู่สมรสที่มารับการรักษามีสาเหตุของการมีบุตรยากจากฝ่ายชายได้แก่ มีจำนวนและการเคลื่อนที่ของอสุจิน้อยมากรวมทั้งตัวอสุจิมีรูปร่างที่ผิดปกติและไม่มีตัวอสุจิ ซึ่งในการศึกษานี้พบมากที่สุดร้อยละ 42.1 รองลงมาคือไม่ทราบสาเหตุร้อยละ 20.1 น้อยที่สุดคือสาเหตุจาก peritoneal pathology ในฝ่ายหญิง ร้อยละ 0.6 (ตารางที่ 1) จากการเจาะเก็บไข่ผู้มารับบริการ 164 รอบ

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้รับบริการจำนวน 164 รอบการรักษา

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน	ร้อยละ
อายุ (ปี)		
20-25	5	3.1
26-30	19	11.6
31-35	56	34.2
36-40	49	29.9
41-45	32	19.5
46 ปีขึ้นไป	3	1.8
สาเหตุของการมีบุตรยาก		
ไม่ทราบสาเหตุ	33	20.1
ฝ่ายชาย	69	42.1
Endometriosis	9	5.5
Peritoneal pathology	1	0.6
Tubal pathology	25	15.2
ทั้งสองฝ่าย	4	2.4
อื่นๆ	23	14.0
ประวัติการตั้งครรภ์		
ไม่เคยตั้งครรภ์	126	76.8
เคยตั้งครรภ์	38	23.2
ประวัติการมีบุตร		
ไม่เคยมีบุตร	142	86.6
มีบุตรแล้ว	22	13.4

ทำการเก็บไข่ได้สำเร็จจำนวน 161 รอบ (ร้อยละ 98.2) ได้ไข่จำนวนทั้งสิ้น 1,053 ใบ โดยเฉลี่ย 6.5 ± 5.5 ใบต่อรอบ พบว่าเป็นไข่ที่สมบูรณ์ในระยะเมตาเฟส 2 (metaphase II) จำนวน 876 ใบ (ร้อยละ 83.2) ไข่ไม่สมบูรณ์จำนวน 177 ใบ (ร้อยละ 16.8) และมีจำนวน 5 รอบ (ร้อยละ 3.1) ได้ไข่ไม่สมบูรณ์

ในการศึกษาที่มีการทำอิกซี่ในไข่จำนวน 876 ใบใน 156 รอบ (ร้อยละ 96.9) มีการปฏิสนธิจำนวนทั้งสิ้น 724 ใบ (ร้อยละ 82.7) โดยเฉลี่ย 5.0 ± 4.4 ใบต่อรอบ ใน 144 รอบ (ร้อยละ 92.3) ในกลุ่มอายุ 26-30 ปี มีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (ร้อยละ 87.3) รองลงมาคือกลุ่มอายุ 36-40 ปี (ร้อยละ 84.1) และในกลุ่มอายุ 41-45 ปี มีอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุด (ร้อยละ 71.6) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิในแต่ละกลุ่มอายุจากการทำอิกซี่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9550$) (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาสาเหตุของการมีบุตรยากของคู่สมรสพบว่า อัตราการปฏิสนธิจากการทำอิกซี่ที่มีสาเหตุจากภาวะ peritoneal pathology มีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (ร้อยละ 94.7) รองลงมาคือไม่ทราบสาเหตุ (ร้อยละ 88.4)

ต่ำที่สุดคือสาเหตุจากทั้งสองฝ่าย (ร้อยละ 75.0) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิจากการทำอิกซี่ในแต่ละสาเหตุพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9297$) (ตารางที่ 2) ในการเตรียมอสุจิเพื่อทำอิกซี่ในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้ได้ตรวจพบว่า มีความผิดปกติของน้ำอสุจिर้อยละ 69.0 และ 35.2 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการทำอิกซี่ในไข่ของกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้จำนวน 307 ใบ พบว่ามีการปฏิสนธิจำนวนทั้งสิ้น 228 ใบ อัตราการปฏิสนธิร้อยละ 74.3 และเมื่อพิจารณาในกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้จำนวน 569 ใบ มีการปฏิสนธิจำนวนทั้งสิ้น 496 ใบ อัตราการปฏิสนธิร้อยละ 87.2 และพบว่าอัตราการปฏิสนธิของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.1129$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการปฏิสนธิของไข่แยกตามช่วงอายุของคู่สมรสฝ่ายหญิง สาเหตุของการมีบุตรยากและอัตราการปฏิสนธิในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และไม่มีข้อบ่งชี้

	จำนวนไข่ที่ทำอิกซี่	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ	อัตราการปฏิสนธิ (ร้อยละ)	p - value
อายุ (ปี)				
20-25	29	23	79.3	
26-30	212	185	87.3	
31-35	292	238	81.5	
36-40	257	216	84.1	0.9550
41-45	81	58	71.6	
46 ขึ้นไป	5	4	80.0	
รวม	876	724	82.7	
สาเหตุของการมีบุตรยาก				
ไม่ทราบสาเหตุ	155	137	88.4	
ฝ่ายชาย	403	322	79.9	
Endometriosis	33	27	81.8	0.9297
Peritoneal pathology	19	18	94.7	
Tubal pathology	164	131	79.9	
ทั้งสองฝ่าย	8	6	75.0	
อื่นๆ	94	83	88.3	
รวม	876	724	82.7	
กลุ่ม				
มีข้อบ่งชี้	307	228	74.3	
ไม่มีข้อบ่งชี้	569	496	87.2	0.1129

จากไข่ที่มีการปฏิสนธิจำนวน 724 ใบใน 144 รอบ ทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 1 วันพบว่า มีการแบ่งเซลล์ได้ตัวอ่อนจำนวนทั้งสิ้น 684 ตัวอ่อน โดยเฉลี่ย 4.9 ± 4.2 ตัวอ่อนต่อรอบที่มีการปฏิสนธิ มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 94.5 ใน 139 รอบคิดเป็นร้อยละ 96.5 เมื่อพิจารณาปัจจัยที่อาจมีผลต่อการแบ่งเซลล์ในการศึกษานี้พบว่า สตรีที่มารับบริการรักษาด้วย

วิธีอีกชั้นนี้มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุดในกลุ่มอายุมากกว่า 46 ปี (ร้อยละ 100) และรองลงมาคือกลุ่มอายุ 41-45 ปี (ร้อยละ 96.6) และน้อยที่สุดคือกลุ่มอายุ 26-30 ปี (ร้อยละ 92.4) เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนในแต่ละกลุ่มอายุ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9977$) (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาที่สาเหตุ

ตารางที่ 3 อัตราการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนแยกตามช่วงอายุของกลุ่มสมรสฝ่ายหญิง สาเหตุของการมีบุตรยากและอัตราการแบ่งเซลล์ในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และไม่มีข้อบ่งชี้

	จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ	จำนวนการแบ่งเซลล์	อัตราการแบ่งเซลล์ (ร้อยละ)	p - value
อายุ (ปี)				
20-25	23	22	95.7	0.9977
26-30	185	171	92.4	
31-35	238	224	94.1	
36-40	216	207	95.8	
41-45	58	56	96.6	
46 ขึ้นไป	4	4	100.0	
รวม	724	684	94.5	
สาเหตุของการมีบุตรยาก				
ไม่ทราบสาเหตุ	137	130	94.9	0.9983
ฝ่ายชาย	322	306	95.0	
Endometriosis	27	23	85.2	
Peritoneal pathology	18	18	100.0	
Tubal pathology	131	124	94.7	
ทั้งสองฝ่าย	6	5	83.3	
อื่นๆ	83	78	94.0	
รวม	724	684	94.5	
กลุ่ม				
มีข้อบ่งชี้	228	212	93.0	0.9616
ไม่มีข้อบ่งชี้	496	472	95.2	

ของการมีบุตรยากกับการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนพบว่า กลุ่มที่มีสาเหตุจาก peritoneal pathology มีอัตราการแบ่งเซลล์สูงที่สุด (ร้อยละ 100.0) รองลงมาคือกลุ่มที่มีสาเหตุจากฝ่ายชาย (ร้อยละ 95.0) และน้อยที่สุดคือกลุ่มที่มีสาเหตุจากทั้งสองฝ่าย (ร้อยละ 83.3) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแบ่งเซลล์ในแต่ละสาเหตุ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9983$) (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาการแบ่งเซลล์ในกลุ่มที่มี

ข้อบ่งชี้ จากไข่ที่มีการปฏิสนธิจำนวน 228 ใบ มีการแบ่งเซลล์จำนวนทั้งสิ้น 212 ตัวอ่อน อัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 93.0 และในกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้ จากไข่ที่มีการปฏิสนธิจำนวน 496 ใบ มีการแบ่งเซลล์จำนวนทั้งสิ้น 472 ตัวอ่อน อัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 95.2 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9616$) (ตารางที่ 3) ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษานี้มีการย้ายกลับตัวอ่อนเข้าสู่โพรงมดลูกจำนวนทั้งสิ้น 168 ตัวอ่อนใน

98 รอบ เฉลี่ย 1.7 ± 0.6 ตัวอ่อนต่อรอบ มีการตั้งครรรภ์จำนวน 13 รอบ อัตราการตั้งครรรภ์คิดเป็นร้อยละ 13.3 เมื่อพิจารณาในกลุ่มที่ทำอิกซี่โดยมีข้อบ่งชี้ได้มีการย้ายกลับตัวอ่อนจำนวนทั้งสิ้น 78 ตัวอ่อนใน 51 รอบ มีการตั้งครรรภ์จำนวน 6 รอบ อัตรา

การตั้งครรรภ์ร้อยละ 11.8 ในกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้ที่มีการย้ายกลับตัวอ่อนจำนวนทั้งสิ้น 90 ตัวอ่อนใน 47 รอบ มีการตั้งครรรภ์จำนวน 7 รอบ อัตราการตั้งครรรภ์ร้อยละ 14.9 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.999$, OR = 0.762) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 จำนวนการย้ายกลับตัวอ่อน จำนวนการตั้งครรรภ์และอัตราการตั้งครรรภ์ในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และไม่มีข้อบ่งชี้

กลุ่ม	จำนวนการย้ายกลับตัวอ่อน (รอบ)	จำนวนการตั้งครรรภ์ (รอบ)	อัตราการตั้งครรรภ์ (ร้อยละ)	p-value
มีข้อบ่งชี้	51	6	11.8	>0.999
ไม่มีข้อบ่งชี้	47	7	14.9	
รวม	98	13	13.3	

*p-value ได้จาก วิธีของ Bonferroni adjust
Odd Ratios = 0.762

วิจารณ์

จากผลการศึกษารั้งนี้พบว่า อัตราการปฏิสนธิจากการทำอิกซี่เท่ากับร้อยละ 82.7 โดยพบว่าอัตราการปฏิสนธิในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้เท่ากับร้อยละ 74.3 และในกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้เท่ากับร้อยละ 87.2 ซึ่งอัตราการตั้งครรรภ์เท่ากับร้อยละ 11.8 และ 14.9 ตามลำดับ ผู้รับบริการรักษาภาวะมีบุตรยากด้วยวิธีอิกซี่มีอายุเฉลี่ย 35.9 ± 5.4 ปี ซึ่งมากกว่างานวิจัยอื่น^{7,8} ที่ได้ทำการศึกษาในกลุ่มอายุ 33.1 ± 4.4 ปี และ 32.6 ± 4.1 ปี ตามลำดับ ผู้รับบริการส่วนมากมีสาเหตุจากฝ่ายชายร้อยละ 42.1 คือมีตัวอสุจิน้อย การเคลื่อนที่ไม่ดี ผู้ที่มารับการรักษามีภาวะมีบุตรยากแบบปฐมภูมิ คือไม่เคยตั้งครรรภ์มาก่อน ร้อยละ 76.8 และเคยตั้งครรรภ์มาแล้วร้อยละ 23.2 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาเดิมคือร้อยละ 62.7 และ 37.3 ตามลำดับและสาเหตุของการมีบุตรยากก็แตกต่างจากการศึกษาเดิมเช่นเดียวกันคือมีสาเหตุจากฝ่ายชายร้อยละ 3.7 และฝ่ายหญิงร้อยละ 89.9⁹

ในการเจาะเก็บไข่ผู้รับบริการ 164 รอบ เก็บได้ไข่ทั้งสิ้น 161 รอบ และพบว่ามีจำนวน 5 รอบที่ได้ไข่ไม่สมบูรณ์ในระยะเมตาเฟส 2 ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมสำหรับการทำอิกซี่จากไข่ที่เก็บได้ทั้งหมดจำนวน 1,053 ใบ มีไข่สมบูรณ์ 876 ใบ (ร้อยละ 83.2) ไข่ไม่สมบูรณ์ 177 ใบ (ร้อยละ 16.8) เมื่อทำการปฏิสนธิด้วยวิธีอิกซี่มีอัตราการปฏิสนธิร้อยละ 82.7 ซึ่งมากกว่ารายงานการศึกษารั้งอื่น^{4,6-8,10-14} อัตราการปฏิสนธิด้วยวิธีอิกซี่ในกลุ่มอายุ 26-30 ปีมีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (ร้อยละ 87.3) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kato และคณะ¹⁵

ที่ในกลุ่มอายุน้อยกว่า 29 ปี มีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุดร้อยละ 85.4 และพบว่าอัตราการปฏิสนธิลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น แต่ในการศึกษานี้พบว่ากลุ่มที่มีอัตราการปฏิสนธิรองลงมาคือกลุ่มอายุ 36-40 ปี (ร้อยละ 84.1) มากกว่ากลุ่มอายุ 31-35 ปี (ร้อยละ 81.5) ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมุติฐานนี้ แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มอายุ 41-45 ปีมีอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุดเพียงร้อยละ 71.6 เท่านั้นซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานนี้ จากการศึกษาแล้วยังพบอีกว่าในกลุ่มอายุ 46 ปีขึ้นไป มีจำนวนไข่ที่ทำอิกซี่จำนวนน้อยมากเพียง 5 ใบ มีการปฏิสนธิ 4 ใบ ดังนั้นอัตราการปฏิสนธิที่ได้ร้อยละ 80.0 จึงไม่ควรเป็นตัวแทนที่ดีในผลของการศึกษารั้งนี้ บางรายงานพบว่ามีการปฏิสนธิผิดปกติที่เป็น 1 pronuclear (1PN) และ 3-pronuclei (3PN) ได้ร้อยละ 3 และ 4 ตามลำดับ¹³ แต่ไม่พบในการศึกษารั้งนี้ ลักษณะของไข่ที่เมื่อทำอิกซี่แล้วไม่เกิดการปฏิสนธิอาจเกิดการปฏิสนธิล่าช้าโดยจะเกิด pronuclei ในวันที่ 2 หลังการฉีดอสุจิ ทำให้ตัวอ่อนเจริญล่าช้าหรือมีความผิดปกติที่ไข่ เช่น มี polar body เล็กหรือใหญ่เกินไป มีลักษณะแบน เป็นก้อนเล็กจับกลุ่มกัน (fragmented polar body) หรือไซโตพลาสซึมมีลักษณะหยาบ มีสีคล้ำ มี vacuole ตั้งแต่ 1 อันจนถึงเกือบเต็มเซลล์ เซลล์ไข่มีช่องว่างระหว่างไซโตพลาสซึมกับ zona pellucida (perivitelline space) มากเกินไป มีการฉีกขาดของ oolemma ในระหว่างการดึงเข็มฉีดอสุจิออกทำให้ไซโตพลาสซึมแตกออกจากถุงหุ้มได้ หรืออาจมีความผิดปกติที่อสุจิ เช่น ตัวอสุจิมีรูปร่างที่ผิดปกติหรืออาจมี vacuole ในส่วนหัวของอสุจิซึ่งในระหว่างที่ทำการศึกษาไม่พบว่า

มีการบันทึกรายละเอียดของไข่ที่ปกติหรือมีความผิดปกติดังกล่าว เมื่อพิจารณาอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และไม่มีข้อบ่งชี้ (ร้อยละ 74.3 และ 87.2 ตามลำดับ) (ตารางที่ 3) พบว่าอัตราการปฏิสนธิในกลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้มากกว่ากลุ่มที่มีข้อบ่งชี้ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.1129$) ซึ่งอาจเนื่องจากในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้มีความผิดปกติที่สาเหตุฝ่ายชายถึงร้อยละ 69.0 ในขณะที่กลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้พบมีความผิดปกติที่สาเหตุฝ่ายชายเพียงร้อยละ 35.2 ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มที่มีข้อบ่งชี้ถึงสองเท่า จากการศึกษาของ Payne และ Matthews¹³ ได้ทำอิกซี่กับไข่จำนวน 3,752 ใบ มีการปฏิสนธิจำนวน 2,603 ใบ (ร้อยละ 69) มีอัตราการตั้งครรภ์ร้อยละ 32 อัตราการฝังตัวของตัวอ่อนร้อยละ 15 และพบว่ารูปร่างอสุจิที่ปกติมีความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อยกับอัตราการปฏิสนธิ ($r^2 = 0.027$, $p < 0.02$) แต่ไม่สัมพันธ์กับอัตราการฝังตัว ($r^2 = 0.003$, $p > 0.05$)

ภายหลังจากไข่มีการปฏิสนธิและมีการแบ่งเซลล์ในระยะเวลาต่อมา การประเมินตัวอ่อนจะทำทุกวันโดยปกติจะมีการแบ่งเซลล์เป็น 4 และ 8 เซลล์ในวันที่ 2 และ 3 ภายหลังจากทำอิกซี่ตามลำดับ ในการศึกษาพบว่าอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 94.5 ต่อไข่ที่เกิดการปฏิสนธิ ซึ่งน้อยกว่าการศึกษาของ Balaban⁴ ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 96.9 แต่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kato และคณะ¹⁵ ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 93.4 และมากกว่าการศึกษาของ Staessen และคณะ⁷ Van และคณะ¹¹ และ Steriteghem และคณะ¹² ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 89.5, 71.2 และ 77.0 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปัจจัยที่อาจมีผลต่อการแบ่งเซลล์พบว่า สตรีที่มาใช้บริการรักษาด้วยวิธีอิกซี่มีการแบ่งเซลล์สูงที่สุดในกลุ่มอายุมากกว่า 46 ปี (ร้อยละ 100) และรองลงมาคือกลุ่มอายุ 41-45 ปี (ร้อยละ 96.6) เนื่องจากใน 2 กลุ่มนี้มีจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งเซลล์น้อยและเป็นการศึกษาย้อนหลัง จึงไม่สามารถควบคุมจำนวนประชากรที่ศึกษาในกลุ่มนี้ได้ ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ที่ได้ไม่เป็นตัวแทนที่ดีนักเช่นเดียวกับกลุ่มที่มีการแบ่งเซลล์น้อยที่สุดคือกลุ่มอายุ 26-30 ปี (ร้อยละ 92.4) มีตัวอ่อนเพียง 23 ตัวเท่านั้น เมื่อพิจารณาที่อายุตั้งแต่ 26-45 ปี เป็นกลุ่มที่มีไข่ปฏิสนธิมากกว่า 500 ใบ พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับอัตราการปฏิสนธิที่ลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนในแต่ละกลุ่มอายุพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9977$) (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาที่สาเหตุ

ของการมีบุตรยากกับการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนพบว่า กลุ่มที่มีสาเหตุจาก peritoneal pathology ซึ่งเป็นสาเหตุของฝ่ายหญิงมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงที่สุด (ร้อยละ 100.0) เนื่องจากจำนวนประชากรไข่และตัวอ่อนที่ได้มีจำนวนน้อย ดังนั้นค่าที่ได้จึงไม่ใช่ตัวแทนที่ดีนัก ส่วนสาเหตุจากฝ่ายหญิงที่มีภาวะเยื่อโพรงมดลูกเจริญผิดที่ (endometriosis) พบว่ามีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำกว่าภาวะที่มีความผิดปกติที่ท่อนำไข่ (tubal pathology) เมื่อพิจารณาโดยการรวมจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ และจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งเซลล์ของทั้ง 3 สาเหตุดังกล่าวพบว่า จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิและจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งเซลล์รวมทั้งสิ้น 176 ใบและ 165 ตัวอ่อนตามลำดับ มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 93.8 ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการแบ่งเซลล์จากสาเหตุอื่นที่มีอัตราการแบ่งเซลล์ร้อยละ 94.0 จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ากลุ่มที่มีสาเหตุจากทั้งสองฝ่ายมีอัตราการแบ่งเซลล์ต่ำที่สุด (ร้อยละ 83.3) แต่จำนวนประชากรในกลุ่มนี้มีน้อยมาก อัตราการแบ่งเซลล์ที่ได้ อาจไม่เป็นตัวแทนที่ดีนัก อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบอัตราการแบ่งเซลล์ในแต่ละสาเหตุพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9983$) (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาการแบ่งเซลล์ของไข่ที่ปฏิสนธิในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้และไม่มีข้อบ่งชี้ (ตารางที่ 3) อัตราการแบ่งเซลล์ในกลุ่มที่มีข้อบ่งชี้ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้ (ร้อยละ 93.0 และ 95.2 ตามลำดับ) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.9616$) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาอื่น ๆ^{14,15} และในการศึกษานี้พบว่า ขั้นตอนและวิธีการทำอิกซี่เหมือนกันกับการศึกษาอื่น^{4,7,8,11} แต่แตกต่างกันที่วัสดุน้ำยาสำหรับเพาะเลี้ยงไข่และตัวอ่อน (Menezo B2 Medium, Earl's medium)^{7,11} น้ำยาสำหรับการเตรียมอสุจิ (Percoll, Pure Sperm)^{7,11} ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (ร้อยละ 5, 5 และ 90 ตามลำดับ)⁷

จากการศึกษานี้พบว่าการย้ายกลับตัวอ่อนเพียง 98 รอบเท่านั้น ส่วนรอบที่ไม่ได้ทำการย้ายกลับ (ร้อยละ 29.5 ของรอบที่มีการแบ่งเซลล์ของไข่) ได้ทำการแช่แข็งตัวอ่อนสำหรับการย้ายกลับในรอบต่อไป จากตารางที่ 4 พบว่าในกลุ่มที่ทำอิกซี่โดยมีข้อบ่งชี้มีอัตราการตั้งครรภ์น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มีข้อบ่งชี้และอัตราการตั้งครรภ์โดยเฉลี่ยน้อยกว่าการศึกษาอื่น ๆ^{4,6,7,11-13,17} อาจเนื่องมาจากในการศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลัง ทำให้จำนวนประชากรที่ศึกษาในบางกลุ่มอายุมีจำนวนน้อย และจำนวนตัวอ่อนที่ได้ย้ายกลับในแต่ละรอบน้อยกว่าในการศึกษาอื่น ๆ^{7,13} และยังเป็นการศึกษาที่ย้ายกลับตัวอ่อน

ในรอบที่มีการเจาะเก็บไข่ ซึ่งความพร้อมของเยื่อบุโพรงมดลูก อาจไม่เหมาะสมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน จึงทำให้อัตรา การตั้งครรภ์ที่ได้ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งยังมีปัจจัยอื่นๆที่รบกวน การปฏิสนธิและการตั้งครรภ์ เช่น สาเหตุของการมีบุตรยาก ระยะเวลาของการมีบุตรยาก เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการทำการ ศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต โดยทำการศึกษาในเชิงทดลอง (randomized control trial) เพื่อควบคุมปัจจัยต่างๆที่อาจมี ผลกระทบต่อการปฏิสนธิและการตั้งครรภ์

สรุป

จากการศึกษาพบว่า อัตราการปฏิสนธิของไข่ที่ได้ รับการผสมด้วยวิธีฉีดและอัตราการแบ่งเซลล์อยู่ในเกณฑ์ดี วิธีอีกที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาคู่สมรสที่มีบุตรยาก จากการที่มีน้ำอสุจิต่อคุณภาพ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.แก้วใจ เทพสุธรรมรัตน์ และ คุณน้ำเพชร พรหมภักดี นักชีวสถิติ สังกัดหน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้คำปรึกษา และวิเคราะห์ข้อมูลการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

References

1. พรพิมล ตั้งชัยสิน. การฉีดอสุจิเข้าไปในไข่. ใน: ชีระพร วุฒยวนิช, บรรณาธิการ. เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : นพบุรีการพิมพ์, 2546: 111-25.
2. สมบูรณ์ คุณาธิคม. จุลหัตถการในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. ใน : สมบูรณ์ คุณาธิคม, บรรณาธิการ. ภาวะมีบุตรยากและ เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : พี เอ ลีฟวิง, 2545: 233-55.
3. สุพัชญ์ สีนะวัฒน์, กนก สีจร, เกียรติกร โพธานันท์. วิทยาการช่วย การเจริญพันธุ์. ใน : Workshop on Reproductive Medicine and Technolog. ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น: 2543: 53-74.
4. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13: 3431-3.
5. Riedel HH, Hubner F, Ensslen SC, Bieniek KW, Grillo M. Minimal andrological requirements for in vitro fertilization. Hum Reprod 1989; 4: 73-7.

6. Chiamchanya C, Tor-udom P, Gamnarai N. Comparative study of intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization with high insemination concentration in sibling oocytes in the treatment of unexplained infertility. J Med Asso Thai 2008; 91 : 1155-60.
7. Staessen C, Camus M, Clasen K, De Vos A, Van Steirteghem A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. Hum Reprod 1999; 14: 2474-9.
8. Bhattacharya S, Hamilton MP, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, et al. Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. Lancet 2001; 357 (9274): 2075-9.
9. Pongsritasana T, Seejorn K, Sinawat S, Kukiattikool P, Tharnprisan P, Ngoksin U, et al. In vitro fertilization of human oocytes in Srinagarind hospital. Srinagarind Med J 2006; 21 : 220-7.
10. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. Hum Reprod 1999; 14 (suppl): 243-64.
11. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8 : 1061-6.
12. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993; 8 : 1055-60.
13. Payne D and Matthews CD. Intracytoplasmic sperm injection: clinical results from the reproductive medicine unit, Adelaide. Reprod Fertil Dev 1995; 7 : 219-27.
14. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, and Ellis J. Assisted reproductive technologies in Thailand: 2001-2007 results generated from the ART registry, Royal Thai college of Obstetricians and Gynaecologists. J Obstet Gynaecol Res 2011; 37 : 236-44.

15. Kato K, Takehara Y, Segawa T, Kawachiya S, Okuno T, Kobayashi T, et al. Minimal ovarian stimulation combined with elective single embryo transfer policy: age-specific results of a large, single centre, Japanese cohort. *Reprod Bio Endocrinol* 2012; 10: 35.
16. Liu DY, Bourne H and Baker HW. High fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection in patients with disorder zona pellucida-induced acrosome reaction. *Fertil Steril* 1997; 67 : 955-8.
17. Chiamchanya C, Su-angkawatin W. Study of the causes and the results of treatment in infertile couples at Thammasat Hospital between 1999-2004. *J Med Asso Thai* 2008; 91(6): 805-12.

