

Ovulasie-induksie vir *in vitro*-bevrugting in Tygerberg-hospitaal

J. P. VAN DER MERWE, T. F. KRUGER, C. J. LOMBARD, L. M. M. MULLER

Summary

The protocol for *in vitro* fertilisation (IVF) at Tygerberg Hospital is presented and the results are analysed. Indications for ovulation induction for IVF included the following: (a) irreversible tubal damage; (b) infertility due to immunological factors; (c) male factor — infertility; and (d) endometriosis.

A combination of human menopausal gonadotrophin (HMG) and clomiphene citrate (Clomid; Mer-National) and human chorionic gonadotrophin was used. Clomid is given in dosages of 100 mg for 5 days depending on the cycle length. Three doses of HMG (150 IU) are given on alternate days, starting on the second day of clomiphene treatment. If the leading follicle has not reached a mean diameter of 14 mm the day after the last HMG dose, another dose is given. This dosage is continued until the leading follicle reaches a diameter of 14 mm.

A total of 109 cycles in 100 patients was analysed. Ova were considered to be mature as soon as the dominant follicle had reached a sonographic average diameter of 18 mm, another two follicles of 16 mm average diameter being present. Serum luteinising hormone levels were determined 4-hourly from the stage when the leading follicles exceeded an average diameter of 14 mm. In this study the pregnancy rate was 21,3% per laparoscopy and 24,4% per embryo transfer.

The oestradiol levels on the 5th day of treatment have a predictive value of the length of stimulation.

S Afr Med J 1987; 71: 515 - 517.

is reeds gedoen. Die algemeenste stimulasie-metodes sluit die volgende in: (i) menslike menopousale gonadotrofiën (MMG) en menslike chorioniese gonadotrofiën (MCG);³ (ii) klomifeen-sitraat (KS) en MCG;⁶ en (iii) KS en MMG en MCG.^{5,6}

Vir die doel van superovulasie is in Tygerberg-hospitaal gebruik gemaak van KS, MMG en MCG.² Hierdie metode van ovulasie-induksie word nou geanaliseer.

Pasiënte en metodes

Eenhonderd-en-nege siklusse in 100 pasiënte is nagegaan. Die gemiddelde ouderdom van die pasiënte was 31,8 jaar met 'n verspreiding van 20 tot 40 jaar. Die pasiënte is d.m.v. die volgende indikasies vir ovulasie-induksie vir *in vitro*-bevrugting gekeur: (i) onomkeerbare buisskade; (ii) infertiliteit a.g.v. immunologiese faktore; (iii) infertiliteit van onbekende oorsaak; (iv) manlike faktor-infertiliteit; en (v) endometriose.

Al die pasiënte was ovulatories en het reëlmatige siklusse gehad. Die aanvangsdag van behandeling is bepaal deur die lengte van die menstruele siklus. Na aanleiding van McIntosh se bevindings⁸ is die volgende formule gebruik om die aanvangsdag te bepaal: sikluslengte gedeel deur twee; hiervan is 10 afgetrek en die resultaat is dan die dag van aanvang van ovulasie-induksie. 'n Voorbeeld by 'n vrou met 'n 28 dae-siklus is: $(28 \div 2) - 10 = 4$. Alle pasiënte het 100 mg KS per dag vir 5 dae ontvang. MMG in 'n dosis van 150 IE is toegedien op die tweede dag van KS-behandeling. Die dosis MMG is herhaal op alternatiewe dae vir nog twee dosisse. Indien die follikelgrootte ultrasonografies nie 'n gemiddelde deursnit van 14 mm bereik het op die dag na die laaste dag van MMG-toediening nie, is 150 IE MMG daaglik toegedien totdat die follikel 'n gemiddelde deursnit van 14 mm bereik het.⁹

MCG is toegedien sodra die dominante follikel 'n gemiddelde deursnit van 18 mm bereik het, met twee addisionele follikels van ten minste 16 mm in deursnit. Follikelaspisrasie is 36 uur hierna uitgevoer. Indien daar nie minstens twee follikels per siklus ontwikkel het nie, is die siklus gestaak.¹⁰

Ultraklankondersoek

'n Philips SDU 7000-sektorskandeerder met 3,5 mHz-klank-omsetter en klanksnelheid van 1 540 m/s is gebruik. Die 'volblaas-tegniek' soos beskryf deur Donald¹¹ is gebruik. Elke follikel is in minstens twee en waar moontlik drie vlakke gemeet. Ultrasonografiese opvolging is daaglik gedoen vanaf die derde dag van MMG-toediening. Die ondersoek word daaglik uitgevoer totdat die follikels volgroeï en ryp is.

Serumestradiolbepalings

Bloedmonsters vir serumestradiolbepalings is soggens tussen 07h30 en 09h00 versamel. Radio-immuunbepaling is uitgevoer met die dekstraanbedekte koolstofskeidingstegniek met ekstraksie.¹² Die uitslae van die ondersoek was binne 6 uur beskikbaar. Die binnelotvariasiekoëffisiënt van hierdie bepaling by Tygerberg-hospitaal is 6% en die tussenlotvariasiekoëffisiënt is 16%.

Bepaling van luteïniserende hormoon (LH)-vlakke

Vieruurlikse bloedmonsters is geneem vir serum-LH-bepalings op die dag van MCG-toediening; die laaste monster is geneem net

Omdat die swangerskapsinsidensie so afhanklik is van die verkryging van veelvuldige bevrugbare oösiëte, is die stimulasie en rypmaking van eiers en follikels een van die sleutelstappe in enige *in vitro*-bevrugtingsprogram (IVB).¹ Daar is veskeïe nadele verbonde aan follikelaspisrasie in spontane siklusse.² Feitlik alle IVB-programme maak gebruik van sikliese kunstmatige stimulasie ter verkryging van veelvuldige ova. Dit verhoog die kans op terugplasing van veelvuldige embryo's en sodende die kans op swangerskap.³

Verskillende behandelingsregimens is alreeds deur verskeie groepe gebruik.^{4,5} Vergelykende studies oor die effek van verskillende metodes van ovariale stimulasie,⁶ asook vergelykende studies van verskillende dosisse van 'n enkele middel,⁷

Departement Verloskunde en Ginekologie, Universiteit van Stellenbosch en Tygerberg-hospitaal, Parowvallei, KP

J. P. VAN DER MERWE, M.MED. (O. ET G.), L.K.O.G. (S.A.)

T. F. KRUGER, M.FARM. MED., M.MED. (O. ET G.), L.K.O.G. (S.A.), M.R.C.O.G.

C. J. LOMBARD, PH.D.

L. M. M. MULLER, M.B. CH.B., PH.D. (MED.)

voor MCG-toediening. Die doel was om 'n moontlike LH-piek te bepaal indien dit sou voorkom. Serum-LH-bepalings is gedoen deur die radio-immunessaimetode. 'n LH-piek is gesien as 'n verdubbeling is die basaalwaardes.^{8,13}

Resultate

In hierdie studie was daar 22 swangerskappe uit 109 siklusse in 100 pasiënte. Uit die 109 siklusse was 90 siklusse eerste, 15 tweede en 4 derde *in vitro*-siklusopgings.

Die aantal pasiënte wat nie voldoende gereageer het op stimulasie nie, is belangrik. In hierdie studie het 11 pasiënte in 11 siklusse (9,2% van die totaal) nie voldoende gereageer nie. Hulle is in verdere analyses nie in berekening gebring nie.

Die gemiddelde aantal ontwikkelde ova verkry, was 3,4 per siklus. Die swangerskapsyfer per laparoskopie was 20,1%. Ten einde die data statisties te analiseer is die siklusse in die volgende groepe verdeel: groep I (22) — Ova verkry, is bevrug en het verdeel en in 'n swangerskap geëindig; groep II (72) — Ova is bevrug en het verdeel, maar geen swangerskap het gevolg nie; en groep III (15) — geen bevrugting van ova het plaasgevind nie.

Tydsverloop van laaste toediening van MMG tot toediening van MCG

Sodra die follikel ultrasonografies 'n 14 mm-deursnit bereik het, is MMG-toediening gestaak en MCG is toegedien sodra die follikel 18 mm bereik het. Tye het gewissel van 36 tot 132 uur met 'n toename van 24 uur. Tye van 84 uur en langer is as 'n enkele kategorie beskou. Die drie groepe is vergelyk volgens die chi-kwadraattoets en daar was geen verskil in tydsverloop tussen die groepe nie ($P = 0,1434$).

Behandelingsduur

Die aantal dae van behandeling vanaf die eerste dag van toediening van KS tot toediening van MCG is vergelyk. Die gemiddelde behandelingsduur was soos volg: groep I — $8,5 \pm 1,5$ dae; groep II — $8,4 \pm 1,4$ dae; en groep III — $8,3 \pm 1,0$ dae. Statisties was daar nie 'n verskil tussen die drie groepe wat die gemiddelde aantal dae van behandeling betref nie (Kruskal-Wallis-toets; $P = 0,9129$).

Aantal eenhede MMG toegedien

MMG is op alternatiewe dae toegedien in dosisse van 150 IE (2 ampules). Indien die follikeldeursnit gemeet in twee vlakke nie 'n grootte van 14 mm bereik het nie, is 2 ampules daagliks toegedien totdat hierdie grootte bereik is. Die aantal eenhede MMG in groep I was 9,45 IE, in groep II 9,39 IE, en in groep III 8,93 IE. Statisties was daar nie 'n betekenisvolle verskil in die aantal eenhede MMG wat gebruik is nie (Kruskal-Wallis-toets; $P = 0,9393$).

Aantal embrio's teruggeplaas

Die aantal embrio's teruggeplaas het 'n invloed op die swangerskapsyfer. 'n Vergelyking is getref tussen groep I en groep II t.o.v. die aantal embrio's teruggeplaas. Laasgenoemde is in twee kategorieë beskou, nl. 1 — 3 embrio's en 4 — 5 embrio's.

In die onsuksesvolle groep waar terugplasing nie tot swangerskap gelei het nie, het 23,6% van die pasiënte 4 of 5 embrio's ontvang, teenoor 50% van pasiënte in die suksesvolle groep. Daar is 'n statisties betekenisvolle verband tussen swangerskapsuitsoms en die aantal embrio's teruggeplaas (chi-kwadraattoets; $P = 0,0179$) in die groep wat 1 tot 3 embrio's ontvang het teenoor die groep wat 4 tot 5 embrio's ontvang het.

Bespreking

In hierdie studie het 9,2% van pasiënte nie voldoende gerespondeer nie met ten minste een follikel van 18 mm of 2 van 16 mm in deursnit. Dit lei tot groot teleurstelling by pasiënte en druk word dikwels op die geneesheer uitgeoefen om tog voort te gaan en 'n laparoskopie en follikelaspirasie uit te voer. Dit is twyfelagtig of dit die moeite werd is om 'n laparoskopie vir 'n enkele ovum uit te voer. In verskeie studies is geen swangerskappe met 'n enkele embrioterugplasing gerapporteer nie.^{14,15}

Dit kan dikwels moeilik wees om 'n besluit te neem omdat voldoende kriteria nog nie neergelê is vir die kansellering van behandeling nie. Kansellasiesyfers van 12-29%⁶ is gerapporteer.

In hierdie studie is 'n gemiddelde van 3,4 ontwikkelde ova per siklus verkry na behandeling met 100 mg KS. In ander reekse waar 150 mg KS gebruik is, is 'n gemiddelde van $3,0 \pm 0,3$ ontwikkelde ova verkry.⁶ Waar MMG alleen gebruik is, is die gemiddelde aantal ova 3,9 en waar suiwer follikel-stimulerende hormoon gebruik is, is dit 7,4 ova per siklus.¹ Die verhoging van of die MMG- of die KS-dosis sal nie noodwendig lei tot 'n vermeerderde aantal ontwikkelde ova nie. 'n Vermeerdering in die MMG-dosis met 'n konstante KS-dosis moet nagegaan word om vas te stel of dit nie tot meer ova per siklus sal lei nie. Al drie groepe in hierdie studie het dieselfde gemiddelde aantal eenhede MMG ontvang.

Met die gebruik van MMG as ovulasie-induksiemiddel skyn 'n tydsduur van 50 - 60 uur tussen MMG- en MCG-toediening 'n hoër swangerskapsyfer te gee as 'n korter tydsduur.¹⁶ In hierdie studie het die interval van 36 - 132 uur geen uitwerking op die aantal ontwikkelde ova wat verkry is of die swangerskapsyfer gehad nie. Die behandelingsduur tot toediening van MMG vir al drie groepe in hierdie studie verskil nie statisties nie. Die lengte van $8,5 \pm 1,5$ dae kan as addisionele hulpmiddel dien om die tydstip van MCG-toediening te bepaal. Dit geld veral in pasiënte waar ultrasonografiese ondersoeke moeilik is, bv. die met erge vergroeiings en vetsug.

Dit is alreeds getoon dat die kans vir swangerskap verhoog met 'n toenemende hoeveelheid embrio's wat in die uterus teruggeplaas word.¹⁴ Vandaar die gebruik van ovulasie-induksiemiddels om die aantal preovulatoriese follikels te vermeerder. Hiperstimulasie het beperkings. Daar is die moontlike gevaar van die hiperstimulasiesindroom en die moontlikheid van 'n defek in die daaropvolgende luteale fase word genoem.¹⁴

Die gemiddelde aantal ova verkry per laparoskopiesiklus was 3,4. In hierdie studie is die aantal teruggeplaaste embrio's in twee kategorieë beskou. In die eerste kategorie, waar 1 - 3 embrio's teruggeplaas is, was daar vir elke swangerskap 5 mislukkings. In die tweede kategorie, waar 4 - 5 embrio's teruggeplaas is, was daar vir elke swangerskap slegs 1,55 mislukkings. Die kansverhouding vir 'n swangerskap in kategorie 2 is dus 3,24 in vergelyking met dié van 'n swangerskap in kategorie 1. Indien meer pasiënte 4 of meer embrio's ontvang het, sou die suksesyfer waarskynlik verhoog het. Die swangerskapsyfer per laparoskopiesiklus was 20,1%, wat gunstig vergelyk met ander behandelingsprotokolle.¹

Die outeurs wil graag die Mediese Superintendent, Tygerberghospitaal, bedank vir toestemming tot publikasie en mev. H. Krüger vir voorbereiding van die manuskrip.

VERWYSINGS

1. Jones HW, Acosta AA, Andrews MC *et al.* Three years of *in vitro* fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1984; **42**: 826-834.
2. Van Schouwenburg JAMH, Kruger TF. Induction of ovulation in phase I of the *in vitro* fertilization and embryo transfer programme at Tygerberg Hospital. *S Afr Med J* 1985; **67**: 759-761.
3. Jones HW, Jones GS, Andrews MC *et al.* The program for *in vitro* fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982; **38**: 14-21.

4. Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G. Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin/follicular maturation for oocyte aspiration: phase I + II 1981. *Fertil Steril* 1983; **39**: 167-179.
5. Lopata A. Concepts of human *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1983; **40**: 289-301.
6. Vargyas JM, Morente C, Schangold G *et al*. The effect of different methods of ovulation stimulation for human *in vitro* fertilization and embryo replacement. *Fertil Steril* 1984; **42**: 745-749.
7. Quigley MM, Maklad NF, Wolf DP. Comparison of two clomiphene citrate dosage regimes for follicular recruitment in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 1983; **40**: 178.
8. McIntosh JEA, Matthews CD, Crocker JM, Broom TJ, Cox LW. Predicting the luteinizing hormone surge; relationship between the duration of the follicular and luteal phases and the length of the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 1980; **34**: 125-130.
9. Marrs RP, Vargyas JM, Saito H, Gibbons WE, Berger T, Mishell DR. Clinical applications of techniques used in *in vitro* fertilization research. *Am J Obstet Gynecol* 1983; **146**: 477-481.
10. Quigley MM, Wolf DP, Maklad NF, Dandekar PV, Sokoloski JE. Follicular size and number in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1982; **38**: 678.
11. Donald I. Use of ultrasonics in diagnosis of abdominal swellings. *Br Med J* 1963; **2**: 1154-1155.
12. Giang NS. Radioimmunoassays of serum estrogens. *Clin Chem* 1973; **19**: 740-747.
13. Bryce RL, Shuter B, Sinosich MJ, Striel JN, Picker RH, Saunders DM. The value of ultrasound, gonadotropin and estradiol measurements for precise ovulation prediction. *Fertil Steril* 1982; **37**: 42.
14. Kruger TF, Van der Merwe JP, Stander FSH *et al*. Results of the *in vitro* fertilization and embryo transfer programme at Tygerberg Hospital, phases II and III. *S Afr Med J* 1985; **69**: 297-300.
15. Kerin JF, Warnes GM, Quinn PJ *et al*. Incidence of multiple pregnancy following human *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Lancet* 1983; **ii**: 537.
16. Jones GS. Update on *in vitro* fertilization. *Endocr Rev* 1984; **5**: 62.

The effect of secretin stimulation on duodenogastric reflux

D. DEMETRIADES

Summary

Duodenogastric reflux was studied in normal dogs under basal fasting conditions and during secretin stimulation. Secretin increased the amount of bile reflux and promoted the production of lysolecithin from lecithin.

S Afr Med J 1987; **71**: 517 - 518.

Secretin is a hormone produced by the mucosal villous epithelial cells, mainly in the duodenum and to a lesser extent the jejunum and ileum. Hydrochloric acid and the products of fat and protein hydrolysis stimulate the release of the hormone. The response of pharmacological doses of secretin on different parts of the human and canine gastro-intestinal tract are: (i) stomach-inhibition of acid secretion^{1,2} and gastric motility,³ and inhibition of gastrin release;¹ (ii) decrease of the intragastric pressure⁴ and increase of the pyloric sphincter pressure;^{3,5} (iii) stimulation of pepsin secretion;¹ (iv) duodenum — decrease in intraluminal pressure and inhibition of motility;⁴ (v) liver — increase in bile flow,⁶ no change in the composition of bile;⁶ (vi) gallbladder — no effect when given alone;⁷ and (vii) pancreas — increase in volume of secretions¹ and trypsin release.⁸

The main bile phospholipids are lecithin and lysolecithin. Lecithin is metabolised to lysolecithin by the action of the pancreatic phospholipase A in the presence of trypsin and taurocholic acid.⁹ This reaction takes place in the duodenum

and upper jejunum. Of the phospholipids in the upper small bowel 60 - 100% are found in the form of lysolecithin. Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) in high concentrations inhibits lysolecithin production by inhibiting the action of phospholipase A.¹⁰

Material and methods

Five mongrel dogs were used and each acted as its own control. Under general anaesthesia the abdomen was entered and a modified Thomas gastrostomy cannula¹¹ was inserted 8 cm proximal to the pylorus and close to the greater curvature of the stomach.

The dogs were allowed a period of 2-3 weeks to recover before any tests were conducted. They received no food but had access to water for 16 hours before the scheduled test. The animal was put in a Pavlov stand with no restraint or sedation. The cap of the gastrostomy cannula was removed and the lumen was cleaned of any food remnants. A 10-minute interval was allowed and then a urine bag containing 0,1 g of disodium EDTA was connected to the cannula. The EDTA prevented the *in vitro* formation of lysolecithin from lecithin. The gastric contents were collected over a continuous period of 6 hours. Two aliquots were taken and stored at -20°C. Immediately after the above collection another collection was done during secretin infusion. The infusion was performed continuously via a Harvard pump at a rate of 1 U/kg body weight/h. Again aliquots were taken and stored at -20°C. Each dog was subjected to a number of tests. The period between two consecutive tests ranged from 5 to 10 days.

The specimens of gastric contents were later analysed at random for lecithin and lysolecithin. These phospholipids were extracted and separated by means of thin-layer chromatography, and their concentration was estimated by phosphorus determination.^{12,13} The efficiency of this technique was assessed by application and recovery of known quantities of pure lecithin and lysolecithin to both low and high ranges. The loss was 11,9 ± 0,9 mg/dl (mean ± SEM) for lecithin and 9,9 ± 0,8 mg/dl for lysolecithin. The sum of the concentration of these two phospholipids was used as an index of the amount of bile reflux into the stomach. The results were analysed on an IBM computer. Statistical analysis was by the paired *t*-test.

Department of Surgery, University of the Witwatersrand, Johannesburg

D. DEMETRIADES, PH.D.