

Ανασκόπηση

Η in vitro ωρίμανση ωαρίων στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Δ. Λουτράδης
Ε. Κιαπέκου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ωρίμανση των ωαρίων είναι μία μακρά και σύνθετη διαδικασία, όπου συμβαίνουν πολλές διεργασίες τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες με σκοπό την ωρίμανση ωαρίων in vitro. Στην ανασκόπηση αυτή παρουσιάζουμε τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην in vitro ωρίμανση ωαρίων και αναφερόμαστε στο ρόλο των ορμονών και των αυξητικών παραγόντων στην IVF, καθώς και στη γονιμοποίηση και στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Όροι ευρετηρίου: in vitro ωρίμανση, εξωσωματική γονιμοποίηση, υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, αρχέγονα ωοθυλάκια, γοναδοτροπίνες, προλακτίνη.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από το 1978 (Steptoe and Edwards, 1978), που ανακοινώθηκε η πρώτη γέννηση υγιούς παιδιού μετά από in vitro γονιμοποίηση (IVF) έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος στις τεχνικές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αν και οι πρώτες γεννήσεις παιδιών μετά από IVF προήλθαν από κύκλους χωρίς πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, τα σύγχρονα πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης χρησιμοποιούν γοναδοτροπίνες με σκοπό τη διέγερση των ωοθηκών και την παραγωγή πολλαπλών ωρίμων ωοθυλακίων, αφού τα ποσοστά κηρίσεων σχετίζονται με τον αριθμό των εμβρύων καλής ποιότητας που προορίζονται για εμβρυομεταφορά. Όμως, κάποιες από τις γυναίκες στις οποίες χορηγούνται γοναδοτροπίνες, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών (OHSS) (Beerendonk et al, 1998). Το σύνδρομο αυτό, ενδέχεται να σχετίζεται με μετάλλαξη του υποδοχέα της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) (Smits et al, 2003). Επιπλέον, το υψηλό κόστος των φαρμακευτικών σχημάτων που χρησιμοποιούνται στα πρωτόκολλα IVF και οι γενικές ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων, έκανε επιτακτική την ανάγκη αναζήτησης άλλων τεχνικών.

Το 1935 οι Pincus και Enzman (Pincus & Enzman, 1935), αναφέρθηκαν στην ικανότητα των ανώριμων ωαρίων για αυτόματη επανέναρξη της μείωσης, μετά τον καθαρισμό τους από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν. Το 1965 η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε από τον Edwards (Edwards, 1965 a, b), ενώ ο ίδιος το 1969 περιέγραψε για πρώτη φορά γονιμοποίηση ανθρώπινων ωαρίων που ωρίμασαν in vitro (Edwards et al,

Α' Μαιευτική και Γυναικολογική
Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,
Μονάδα Υποβοηθούμενης
Αναπαραγωγής και Αναγεννητικής
Ιατρικής, ΓΝΑ «Αλεξάνδρα»

Αλληλογραφία:
Δημήτρης Λουτράδης
Α' Μαιευτική και Γυναικολογική
Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,
ΓΝΑ «Αλεξάνδρα»
Βασ. Σοφίας 80 & Λούρου, 115 28 Αθήνα
Τηλ.: 210 7770501
Fax: 210 9883834
E-mail: loutradi@otenet.gr
Κατατέθηκε: 14/3/2006
Εγκρίθηκε: 9/11/2006

1969). Έκτοτε, ανακοινώθηκαν από αρκετούς ερευνητές επιτυχείς κηύσεις και γεννήσεις παιδιών μετά από in vitro ωρίμανση ωαρίων (Cha & Chian, 1998). Η πρώτη γέννηση παιδιών (τρίδυμα) μετά από in vitro ωρίμανση ωαρίων ανακοινώθηκε από τους Cha και συνεργάτες, το 1991. Τα ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν συνελλέγησαν από ωοθήκες, κατά τη διάρκεια καισαρικής τομής στα πλαίσια προγράμματος δωρεάς ωαρίων (Cha et al, 1991). Οι γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες αποτελούν την κύρια κατηγορία ασθενών όπου έχει εφαρμοστεί κλινικά η IVM έως τώρα (Tounson et al, 1994; Chian, 2004).

Η ωρίμανση ωαρίων είναι μια μακρά και σύνθετη διαδικασία, κατά τη διάρκεια της οποίας τα ωάρια περνούν από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV, ωάρια πρόφασης I) στη μετάφαση II. Οι πυρηνικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα οδηγούν στην εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου. Οι γοναδοτροπίνες φαίνεται να παίζουν σημαντικό και αποφασιστικό ρόλο στην ωρίμανση του ωαρίου, δεν είναι όμως ικανές από μόνες τους να αρχίσουν και να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ωρίμανσης (Halpin et al, 1986; Ataya et al, 1989). Ορμόνες όπως η αυξητική ορμόνη (GH), ο IGF-1, η προλακτίνη (PRL) και η θυρεοειδοτρόπος (TSH) επηρεάζουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωαρίων (Howe E et al, 1978; Liu X et al, 1998; Zhao J et al, 2001; Kiapekou et al, 2005a; Kuzmina et al, 1996), καθώς και τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Yoshimura et al, 1991; Kiapekou et al, 2005b).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ – ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Περίπου ένα εκατομμύριο αρχέγονα ωοθυλάκια είναι παρόντα στις ανθρώπινες ωοθήκες, κατά τη γέννηση. Αυτά αποτελούνται από ένα ωοκύτταρο, σταματημένο στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και συγκεκριμένα στο στάδιο της δικτυοταινίας, το οποίο περιβάλλεται από μία στιβάδα αποπλατυσμένων κοκκωδών κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα), τα οποία είναι οι πρόδρομοι μορφές των κοκκωδών κυττάρων. Σε όλη τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας με τη μορφή συνεχούς ροής, ομάδες αρχέγονων ωοθυλακίων εμφανίζουν τάση για περαιτέρω ανάπτυξη, με αποτέλεσμα στην αρχή της εφηβείας να υπάρχουν μόνο 400.000 αρχέγονα ωοθυλάκια και στις δύο ωοθήκες, ενώ τα υπόλοιπα έχουν καταστραφεί με τη διαδικασία της ατρησίας. Από την τεράστια αυτή δεξαμενή ωοθυλακίων, στη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας, 400 περίπου θα φτάσουν έως την ωοθυλακιορρηξία.

Όταν τα ωοθυλάκια εισέρχονται στην φάση της ωρίμανσης, τα ωοκύτταρα που περιλαμβάνουν μεγάλωνουν σε μέγεθος (στον άνθρωπο η διάμετρος τους αυξάνει από 35 μm σε 120 μm), ενώ τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν πολλαπλασιάζονται και τα κύτταρα της θήκης διαφοροποιούνται. Η ωρίμανση των

ωαρίων συνοδεύεται από σημαντικό αριθμό σύνθετων κυτταρικών διαδικασιών (Gosden et al, 1995; Moor RM et al, 1998). Αυτές περιλαμβάνουν: πυρηνική και κυτταροπλασματική ανάπτυξη, παραγωγή οργανλίων, παραγωγή RNA που υποστηρίζει την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση. Η πυρηνική ωρίμανση χαρακτηρίζεται από την απόκτηση της δυνατότητας επανέναρξης της μείωσης από το ωάριο, ενώ η κυτταροπλασματική ωρίμανση σχετίζεται με την ικανότητα του ωαρίου για γονιμοποίηση καθώς και για πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η in vitro ωρίμανση των ωαρίων (in vitro maturation - IVM) είναι η διαδικασία κατά την οποία, ωάρια που βρίσκονται στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV, ωάρια πρόφασης I) συλλέγονται από ωοθυλάκια με άντρο διαμέτρου 2mm-10 mm, καλλιεργούνται, ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση (εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου) και φτάνουν στη μετάφαση II σε 24-48 ώρες. Η in vitro ανάπτυξη των ωοθυλακίων (in vitro follicular growth - IVG) είναι η διαδικασία κατά την οποία αρχέγονα ωοθυλάκια (primordial) ή ωοθυλάκια πριν το σχηματισμό του άντρου (early preantral) καλλιεργούνται με σκοπό την πλήρη ωρίμασή τους, που καθορίζεται από την εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου.

ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η ωοθυλακιογένεση περιλαμβάνει τρία στάδια: τη στρατολόγηση, που χαρακτηρίζεται από την έναρξη της ωρίμανσης των αρχέγονων ωοθυλακίων, τη βασική ωοθυλακική ανάπτυξη και την επιλογή και ωρίμανση του επικρατούντος ωοθυλακίου. Κατά την ωοθυλακική ανάπτυξη αυξάνει το μέγεθος του ωαρίου και ο αριθμός των κοκκωδών κυττάρων. Τα χρωμοσώματα, στη φάση αυτή, συνθέτουν μεγάλες ποσότητες rRNA και mRNA που θα χρησιμοποιηθούν αργότερα στη δημιουργία πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ωρίμανση του ωαρίου. Η επανέναρξη της μείωσης στα ανθρώπινα ωάρια αρχίζει με τη μεσοκυκλική αιχμή της LH, μπορεί, όμως, να γίνει και αυτόματα, αν τα ωάρια ελευθερωθούν από ωοθυλάκια με άντρο και καλλιεργηθούν in vitro (Salha et al, 1998).

Maturation Promoting Factor

Η ανίχνευση ενός μη ειδικού παράγοντα του Maturation Promoting Factor (MPF) ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση G2 στη φάση M του κυτταρικού κύκλου, αποτελεί σημαντικό βήμα στη διερεύνηση της ωρίμανσης των ωαρίων.

Η κυτταρική διαίρεση (κυτταρικός κύκλος) αποτελείται από 2 φάσεις: Τη φάση M (μίτωση - μείωση) και την ενδιάμεση φάση (G1 - S - G2). Η μετάβαση στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από πρωτεΐνες που ονομάζονται κυκλίνες. Οι κυκλίνες ελέγχουν

τον κυτταρικό κύκλο, ρυθμίζοντας κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες (CDKs). Οι κινάσες αυτές γίνονται ενεργές όταν δημιουργήσουν σύμπλεγμα με τις κυκλίνες. Το ενεργοποιημένο αυτό σύμπλεγμα διεγείρει την κυτταρική διαίρεση φωσφορυλιώνοντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες του κυττάρου.

Ο MPF είναι ένα σύμπλεγμα κυκλίνης - κινάσης (p34cdc-serine/threonine κινάση και κυκλίνη B) και ενεργοποιεί τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G2 στη φάση M του κυτταρικού κύκλου και ρυθμίζεται από την κυκλίνη B (Dunphy et al, 1988). Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης των κυττάρων οδηγεί σε αποτυχία ενεργοποίησης του MPF (Maller et al, 1985).

Πολλοί παράγοντες μεσολαβούν στον έλεγχο της επανέναρξης της μείωσης των ωαρίων και δρουν στο ωάριο μέσω των κοκκωδών κυττάρων. Τα κοκκώδη κύτταρα επικοινωνούν με το ωάριο μέσω των χασμοδεσμών (gap junctions). Υψηλά επίπεδα cAMP και υποξανθίνης στα καλλιεργητικά μέσα αναστέλλουν την επανέναρξη της μείωσης (Eppig et al, 1985; Loutradis et al, 1994). Η LH βοηθά στην επανέναρξη της μείωσης, μέσω ελάττωσης του cAMP και των πουρινών και αύξησης του MPF και της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Dekel et al, 1981).

Το c-mos ογκογονίδιο κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας του MPF. Εκφράζεται νωρίς στη διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων και εξαφανίζεται αμέσως μετά από τη γονιμοποίηση. Κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Mos, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί είτε άμεσα τον MPF, μέσω φωσφορυλίωσης της κυκλίνης B (Roy et al, 1990), είτε έμμεσα μέσω MAP κινάσης (Nebreda & Hunter, 1993).

IN VITRO ΩΡΙΜΑΣΗ ΑΝΩΡΙΜΩΝ ΩΑΡΙΩΝ

Δύο τεχνικές ωρίμανσης ωαρίων χρησιμοποιούνται σήμερα. Στην πρώτη, ωάρια που συλλέγονται από ωοθυλάκια διαμέτρου 2mm-10 mm, με ή χωρίς προηγηθείσα διέγερση των ωοθηκών, καλλιεργούνται για 24-48 ώρες, ώστε να φτάσουν στη μετάφαση II (Cha et al, 1998). Σημαντικός, όμως, αριθμός ωαρίων φτάνουν στη μετάφαση II, μετά από καλλιέργεια 23-25 ωρών, αφού όλα τα ωάρια που συλλέγονται δε βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ωρίμανσης. Επομένως, για την αποφυγή παραμονής των ωαρίων αυτών στην μετάφαση II για 20-30 ώρες πριν την γονιμοποίηση και, επειδή τα ωάρια που φτάνουν πρώτα στη μετάφαση II είναι πιο πιθανό να αναπτυχθούν έως το στάδιο της βλαστοκύστης (Barnes et al, 1995), ο χρόνος καλλιέργειας των ωαρίων έχει μειωθεί στις 28-36 (Smith et al, 2000). Ο στόχος της δεύτερης τεχνικής ωρίμανσης, που ακόμη δεν έχει οδηγήσει στην πλήρη ωρίμανση των ωαρίων, είναι η καλλιέργεια in vitro αρχέγονων ωοθυλακίων καθώς και ωοθυλακίων πριν το σχηματισμό του άντροου (Hovatta et al, 1997).

Οι τεχνικές καλλιέργειας που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα έως τώρα είναι: καλλιέργεια τμήματος

ωοθηρικού ιστού και καλλιέργεια μεμονωμένων ωοθυλακίων. Σε καλλιέργειες ωοθηρικού ιστού, τα αρχέγονα ωοθυλάκια φτάνουν έως το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου (ωοκύτταρο που περιβάλλεται από δύο τουλάχιστον στιβάδες κοκκωδών κυττάρων), ενώ σε καλλιέργειες μεμονωμένων αρχέγονων ωοθυλακίων, τα κύτταρα εκφυλίζονται άμεσα (Hovatta et al, 1997). Τα δευτερογενή ωοθυλάκια όταν καλλιεργούνται, φτάνουν στο στάδιο του ωοθυλακίου με πρώιμο άντρο και μετά εκφυλίζονται, ενώ τα ωοθυλάκια με μικρό άντρο φτάνουν στο στάδιο του ωοθυλακίου με πλήρως αναπτυγμένο άντρο σε περιορισμένο όμως αριθμό (Hovatta et al, 1999).

Καλλιεργητικά μέσα

Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες σε αρκετά ζωικά είδη που έχουν οδηγήσει στα βέλτιστα καλλιεργητικά μέσα για την in vitro ωρίμανση ωαρίων, στον άνθρωπο δοκιμάζονται ακόμη διάφορα καλλιεργητικά μέσα και χρησιμοποιείται η εμπειρία που υπάρχει από τις μεθόδους καλλιέργειας άλλων τύπων κυττάρων. Σύνθετα καλλιεργητικά μέσα, όπως το ιστικό καλλιεργητικό μέσο 199 (tissue culture medium 199, TCM-199), το Ham's-F10 και το μέσο Chang με προσθήκη HEPES, καθώς και αρκετά άλλα, έχουν δοκιμαστεί έως τώρα.

Ανεξάρτητα από το καλλιεργητικό μέσο που χρησιμοποιείται στην in vitro καλλιέργεια ανώριμων ωαρίων, είναι γενικώς αποδεκτό ότι η παρουσία κοκκωδών κυττάρων είναι ενεργητική για την in vitro ωρίμανση αυτών (Cha and Chian, 1998). Επιπλέον, η προσθήκη γοναδοτροπινών FSH και LH στα καλλιεργητικά μέσα φαίνεται πως βελτιώνει τα ποσοστά ωρίμανσης ωαρίων in vitro και ακολούθως τα ποσοστά εμβρυϊκής ανάπτυξης (Andereiz et al, 2000). Οι LH και HCG φαίνεται πως αυξάνουν στον ίδιο βαθμό τα ποσοστά in vitro ωρίμανσης ανώριμων ωαρίων (Hreinsson et al, 2003). Τα καλλιεργητικά μέσα που χρησιμοποιούνται στην in vitro ωρίμανση ανθρώπινων ωαρίων συνήθως εμπλουτίζονται με ορό που προέρχεται από την ίδια την ασθενή για την αποφυγή μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων (Smith et al, 2000). Επιπροσθέτως, στεροειδή όπως η οιστραδιόλη και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες και ορμόνες, όπως EGF, TGF α και TGF β , IGF-1, ινσουλίνη, GH, φαίνεται πως βελτιώνουν τόσο τα ποσοστά in vitro ωρίμανσης ωαρίων, όσο και την ακόλουθη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Lorenzo et al, 1994; Brucker et al, 1991; Liu X et al, 1998; Zhao J et al, 2001; Kiapekou et al, 2005a).

Ωάρια που λαμβάνονται από ωοθήκες χωρίς διέγερση

Η πρώτη γέννηση μετά από IVM προήλθε από ανώριμα ωάρια που ελήφθησαν από ωοθήκη κατά τη διάρκεια καισαρικής τομής (Cha et al, 1991). Οι Trounson και συνεργάτες το 1994 (Trounson et al, 1994) περιέ-

γραφαν για πρώτη φορά τη γέννηση υγιούς παιδιού μετά από IVM ανώριμων ωαρίων που προήλθαν από γυναίκες με PCOS. Την επόμενη χρονιά ανακοινώθηκε μία ακόμη εγκυμοσύνη σε γυναίκα με PCOS μετά από IVM και ακολούθως ICSI (Barnes et al, 1995). Το 2000, οι Cha και συνεργάτες ανακοίνωσαν μετά από in vitro ωρίμανση ανώριμων ωαρίων, ποσοστό κήσεων 27.1% (Cha et al, 2000). Το υψηλό αυτό ποσοστό όμως, επιτεύχθηκε μετά από μεταφορά 6.3 εμβρύων ανά ασθενή κατά μέσο όρο, ενώ το ποσοστό εμφύτευσης ήταν πολύ χαμηλό (6.9%). Σύμφωνα και με άλλους ερευνητές αν και τα ανώριμα ωάρια που λαμβάνονται από γυναίκες με PCOS ενώ έχουν την ικανότητα να ωριμάζουν, να γονιμοποιούνται και να αναπτύσσονται in vitro, αντίστοιχα το ποσοστό εμφύτευσης είναι απογοητευτικά χαμηλό (Barnes et al, 1996; Trounson et al, 1998).

Ωάρια που λαμβάνονται από ωοθήκες μετά διέγερση

Η εφαρμογή ήπιας διέγερσης των ωοθηκών με FSH ή με ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (HMG), πριν την in vitro ωρίμανση των ωαρίων, αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση που προάγει τα ποσοστά ωρίμανσης ωαρίων γυναικών με ή χωρίς πολυκυστικές ωοθήκες (Wynn et al, 1998). Εντούτοις, έχει ανακοινωθεί ότι η χορήγηση 150 IU/ημέρα FSH για τρεις ημέρες, από την τρίτη ημέρα του κύκλου, δεν αυξάνει τον αριθμό των λαμβανομένων ωαρίων, δε βελτιώνει την ωρίμανση των ωαρίων, καθώς και τα ποσοστά εμβρυϊκής ανάπτυξης σε γυναίκες με φυσιολογικούς καταμήνιους κύκλους (Trounson et al, 1998; Mikkelsen et al, 1999). Οι Mikkelsen και συνεργάτες σε άλλη μελέτη τους, αναφέρουν ότι η χορήγηση FSH πριν τη συλλογή των ανώριμων ωαρίων από γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες αυξάνει στατιστικώς σημαντικά τα ποσοστά ωρίμανσης των ωαρίων καθώς και τα ποσοστά εμφύτευσης (Mikkelsen and Lindenberg, 2001). Οι Suikkari και συνεργάτες (Suikkari et al, 2000) χρησιμοποίησαν χαμηλές δόσεις FSH (37.5 IU), αρχίζοντας από την ωορρινική φάση του κύκλου μέχρι ένα ωοθυλάκιο να φτάσει σε μέγεθος τα 9-11 cm. Διαπίστωσαν αύξηση του ποσοστού ωρίμανσης των ωαρίων, καθώς και του ποσοστού γονιμοποίησης ενώ δεν παρατήρησαν καμία διαφορά μεταξύ γυναικών με κανονικούς κύκλους και με πολυκυστικές ωοθήκες.

Οι Chian και συνεργάτες το 1999 ανακοίνωσαν ότι η χορήγηση σε γυναίκες 10.000 IU χοριακής γοναδοτροπίνης (HCG), 36 ώρες πριν την ωοληψία, βελτιώνει το ποσοστό ωρίμανσης ανώριμων ωαρίων που ελήφθησαν από γυναίκες με PCOS (Chian et al, 1999). Αργότερα, οι ίδιοι συγγραφείς ανακοίνωσαν ότι η HCG όχι μόνο βελτιώνει το ποσοστό ωρίμανσης των ανώριμων ωαρίων, αλλά και επιτάχυνε τη διαδικασία της in vitro ωρίμανσης (Chian et al, 2000). Σε πολυκεντρική μελέτη που συμπεριέλαβε 1000 κύκλους με χορήγηση HCG 36 ώρες πριν την ωοληψία ανώριμων ωαρίων, αναφέρονται πο-

σοστά κήσεων της τάξης του 35% (Chian et al, 2004). Εντούτοις, το ποσοστό εμφύτευσης παραμένει χαμηλό (10%-15%). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η HCG επιδρά στα μικρά, ανώριμα ωοθυλάκια είναι ασαφής.

Κρυοκατάψυξη ανώριμων ωαρίων

Η κρυοκατάψυξη ανθρώπινου ωοθηκικού ιστού έχει συγκεντρώσει, τα τελευταία χρόνια, την προσοχή των ερευνητών. Η διατήρηση της γονιμότητας νέων γυναικών που υποβάλλονται σε θεραπεία για κακοήθεις παθήσεις, που πιθανώς να οδηγήσει σε στειρώση, αποτελεί μία από τις εφαρμογές της μεθόδου αυτής (Hovatta et al, 1996; Gosden et al, 2002). Επειδή, τα αρχέγονα ωοθυλάκια δεν ωριμάζουν σε καλλιέργειες in vitro, προς το παρόν, φυσιολογικά, η κρυοκατάψυξη μεμονωμένων αρχέγονων ωοθυλακίων δεν εφαρμόζεται.

Στον επίμυ έχει επιτευχθεί γέννηση απογόνου μετά από κρυοκατάψυξη τμήματος ωοθηκικού ιστού και εν συνεχεία αυτόλογη μεταμόσχευση αυτού (Parrot 1960). Πρόσφατα, ανακοινώθηκε μεταμόσχευση ωοθήκης και σάλπιγγας μετά από κρυοκατάψυξη και απόψυξη σε αρουραίο (Wang et al, 2002). Ο ανθρώπινος ωοθηκικός ιστός που κρυοκαταψύχεται, μετά την απόψυξή του και τη μεταμόσχευση στη δότρια, είναι λειτουργικός. Έως τώρα όμως στον άνθρωπο δεν έχει επιτευχθεί κήση μετά από κρυοκατάψυξη ωοθηκικού ιστού (Oktay et al, 2000; Hovatta, 2004).

Η in vitro ωρίμανση αρχέγονων ωοθυλακίων μετά από ψύξη ωοθηκικού ιστού και ακολούθως IVF θα αποτελέσει, στο μέλλον, την καλύτερη θεραπεία της υπογονιμότητας σε γυναίκες με πρόωμη ωοθηκική ανεπάρκεια.

Ο ΡΟΛΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΤΗΝ IN VITRO ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ

Η προλακτίνη (PRL) είναι μια ορμόνη με πολλαπλές βιολογικές δράσεις που ρυθμίζει ποικιλία φυσιολογικών διαδικασιών. Ο υποδοχέας της είναι πρωτεΐνη που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Μέχρι τώρα, έχει χαρακτηριστεί σημαντικός αριθμός ισομορφών του υποδοχέα της PRL που ποικίλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού που εξετάζεται. Οι ισομορφές του υποδοχέα της PRL αποτελούνται από μία κοινή εξωκυττάρια και διαμεμβρανική περιοχή, ενώ παρουσιάζουν διαφορετικές καρβοξυτελικές περιοχές (Boutin et al, 1988-1989; Davis and Linzer, 1989) οι οποίες προκύπτουν από το φαινόμενο της εναλλακτικής αποκοπής και επανασυναρμολόγησης (alternative splicing) των εξονίων του γονιδίου του υποδοχέα της προλακτίνης (Arden et al, 1990; Shirota et al, 1990). Στον επίμυ έχουν περιγραφεί τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα της PRL, μία μεγάλου μήκους (long, PRL-RL), καθώς και τρεις βραχύτερες σε μέγεθος ισομορφές (short, PRL-RS₁, PRL-RS₂, PRL-RS₃) (Davis & Linzer, 1989; Clarke & Linzer, 1993). Στον

αρουραίο έχουν αναγνωρισθεί τρεις ισομορφές, μία μεγάλου μήκους, μία ενδιάμεση και μία βραχεία σε μήκος ισομορφή (Bole-Feysot et al, 1998), ενώ στον άνθρωπο εκτός από τη μεγάλη και την ενδιάμεση ισομορφή έχουν πρόσφατα προσδιορισθεί και δύο βραχείες ισομορφές PRL (PRL-RSa και PRL-RSb) (Boutin et al, 1989; Kline et al, 1999; Hu et al, 2001; Bignon et al, 2003).

Ομοζυγοί επίμυες με απάλειψη του γονιδίου του υποδοχέα της PRL (knockout mice) εμφανίζουν μειωμένο αριθμό ωοθυλακιορρηξιών και μειωμένη ικανότητα αναπαραγωγής (Ormandy et al, 1997). Τα ωάρια των πειραματόζων αυτών δεν εξελίσσονται και παραμένουν στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (Bole-Feysot et al, 1998). In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη συγκεκριμένων συγγεντρώσεων προλακτίνης σε καλλιέργειες ωαρίων επιμύων, κουνελιών και αρουραίων προάγει την in vitro ωρίμασή τους, καθώς και την μετέπειτα ικανότητα ανάπτυξης εμβρύων πριν την εμφύτευση (Yohkaichiya et al, 1988; Yoshimura et al, 1989; Yoshimura et al, 1991; Karabulut et al, 1999). Πρόσφατα δείξαμε την ύπαρξη του mRNA των ισομορφών του υποδοχέα της προλακτίνης στα διάφορα στάδια πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης επιμύων (Kiapekou et al, 2005b). Επιπλέον, δείξαμε ότι το mRNA των ισομορφών του υποδοχέα της PRL εκφράζεται σε πρωτογενή ωοθυλάκια, στο ωοθυλακικό σύμπλεγμα πριν την ωοθυλακιορρηξία (COCs) και σε ωάρια πρόφασης I, στον επίμυ, ενώ σε καλλιέργειες μακράς διάρκειας πρωτογενών ωοθυλακίων επιμύων in vitro, η προσθήκη PRL (100, 200 ή 300 ng/ml) στα καλλιεργητικά μέσα αυξάνει θεαματικά τα ποσοστά πυρηνικής ωρίμανσης, γονιμοποίησης και επακόλουθης εμβρυϊκής ανάπτυξης (υπό δημοσίευση).

Η αυξητική ορμόνη (GH), επίσης, συμμετέχει στη διαδικασία της ωρίμανσης των ωαρίων. Οι Izadyar και συνεργάτες αναφέρουν αύξηση του ποσοστού in vitro ωρίμανσης COCs, καθώς και της επακόλουθης εμβρυϊκής ανάπτυξης σε βοοειδή (Izadyar et al, 1996), ενώ το mRNA της GH εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα βοοειδών καθώς και στα ωάρια που αυτά περιβάλλουν (Izadyar et al, 1999). Πρόσφατα ανακοινώθηκε η παρουσία του υποδοχέα της GH σε ωοθυλάκια αρουραίων πριν το σχηματισμό του άντρου (Zhao et al, 2000). Επιπλέον, η GH αυξάνει σε αρουραίους τα ποσοστά in vitro ωρίμανσης ωοθυλακίων με μικρό άντρο (Ara et al, 1994), ενώ προάγει την ωρίμανση πρωτογενών ωοθυλακίων επιμύων (Liu et al, 1998). Η GH ασκεί τη δράση της στα ωοθυλάκια, είτε άμεσα μέσω των υποδοχέων της είτε έμμεσα μέσω του παρόμοιου της ινσουλίνης αυξητικού παράγοντα (IGF-1) (Ara et al, 1994; Zhao et al, 2000). Σε πρόσφατη δημοσίευσή μας δείξαμε ότι η GH αλλά και ο IGF-1 όταν προστεθούν σε συγκεκριμένες συγγεντρώσεις σε καλλιέργειες ωαρίων πρόφασης I επιμύων (ωάρια πριν την ωοθυλακιορρηξία, δίχως να περιβάλλονται από κοκκώδη κύτταρα) αυξάνουν στα-

τιστικώς σημαντικά το ποσοστό της in vitro ωρίμανσης των ωαρίων (Kiapekou et al, 2005a). Η απουσία των κοκκωδών κυττάρων συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης υποδοχέων GH στα ωάρια πρόφασης I. Μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει το θετικό ρόλο του IGF-1 στην in vitro ωρίμανση ωαρίων. Πράγματι, ο IGF-1 αλλά και ο υποδοχέας του εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα αρουραίων καθώς και στα ωάρια που αυτά περιβάλλουν. Επιπλέον, η προσθήκη IGF-1 στα καλλιεργητικά μέσα αυξάνει το ποσοστό in vitro ωρίμανσης ωαρίων (Yoshimura et al, 1996). Στον άνθρωπο, ο υποδοχέας του IGF-1 είναι παρόν σε όλα τα στάδια ωοθυλακικής ανάπτυξης (από τα αρχέγονα ωοθυλάκια έως τα ωοθυλάκια πριν την ωοθυλακιορρηξία) (Zhou et al, 1993), ενώ η προσθήκη του σε καλλιέργειες ωαρίων αυξάνει και τα ποσοστά της in vitro ωρίμασής τους (Gomez et al, 1993).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πρωτόκολλα in vitro ωρίμανσης ωαρίων, είναι απλά και η διέγερση των ωοθηκών, όταν εφαρμόζεται, είναι για βραχύ χρονικό διάστημα και οι δόσεις των ορμονών που χορηγούνται μικρές. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων της κλασικής IVF, καθώς και το κόστος της θεραπείας, με την IVM μειώνονται σημαντικά. Στο μέλλον, η τεχνική της IVM πιθανώς να αντικαταστήσει την IVF σε επιλεγμένες ασθενείς όπως σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες και σε γυναίκες που υποβάλλονται σε IVF/ICSI λόγω κακής ποιότητας σπέρματος των συντρόφων τους.

Στο μέλλον, η ανάπτυξη αρχέγονων ωοθυλακίων in vitro (IVG) σε συνδυασμό με in vitro ωρίμανση (IVM) φαίνεται πως θα είναι εφικτή. Πλήρης ανάπτυξη ωοθυλακίων από το στάδιο του αρχέγονου έως και το γραφικό έως τώρα έχει επιτευχθεί μόνο στον επίμυ (Eppig & O'Brien, 1996). Στον άνθρωπο, αντίστοιχα, τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετά από in vitro καλλιέργεια φτάνουν έως το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου και στη συνέχεια εκφυλίζονται (Hovatta et al, 1997).

Η έρευνα συνεχίζεται με στόχο τη βελτίωση των τεχνικών καλλιέργειας ωαρίων, τη βελτίωση των καλλιεργητικών μέσων, και κυρίως των τεχνικών κρυοκατάψυξης ανώριμων ωαρίων αλλά και ολόκληρης της ωοθήκης. Η επιτυχής κρυοκατάψυξη θα αποτελέσει τεράστια πρόοδο στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή γιατί θα αποκαταστήσει τη γονιμότητα σε παιδιά και γυναίκες μετά από θεραπεία για κακοήθεις παθήσεις.

Summary

Loutradis D, Kiapekou E.

In-vitro ova maturation in assisted reproduction

Helen Obstet Gynecol 18(4):287-294, 2006

Ova maturation is a long and complex procedure,

throughout which a lot of activity takes place, inside the ova nucleus as well as the ova cytoplasm. During the last years, a lot of effort has been made in order to mature the ova in vitro. In our review we present the techniques used in in-vitro maturation of the ova and we refer to the part hormones and growth factors play in IVF, as well as to fertilisation and to initial embryo growth.

Key words: *IVM, IVF, ART, primary follicles, gonadotrophines, prolactin.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anderiesz C, Ferraretti AP, Magli C et al. Effect of recombinant human gonadotropins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Human Reproduction* 2000; 15:1140-1148.
2. Apa R, Lanzone A, Miceli F et al. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. *Molecular Cell Endocrinology* 1994; 106:207-212.
3. Arden KC, Boutin JM, Djiane J et al. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1990; 53:161-165.
4. Ataya K, Tadros M, Ramahi A. Gonadotrophin-releasing hormone agonist inhibits physiologic ovarian follicular loss in rates. *Acta Endocrinologica* 1989; 121, 55-60.
5. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK et al. Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction* 1995; 10:3243-3247.
6. Barnes FL, Kausche A, Tiglias J et al. Production of embryos from in vitro matured primary human oocytes. *Fertility and Sterility* 1996; 65:1151-1156.
7. Beerendonk CCM, van DOP PA, Braat DDM et al. Ovarian hyperstimulation syndrome: facts and fallacies. *Obstet Gynecol Surv* 1998 Jul; 53(7):439-49.
8. Bignon C, Binart N, Ormandy CJ et al. Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. *Journal of Molecular Endocrinology* 2003; 19:109-120.
9. Brucker C, Alexander NJ, Hodgen GD et al. Transforming growth factor- α augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 1991; 28:94-98.
10. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 1998; 19:225-268.
11. Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H et al. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988; 53:69-77.
12. Boutin JM, Edery M, Shirota M et al. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 1989; 3:1455-1461.
13. Cha KY, Koo JJ, Ham SY et al. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertility and Sterility* 1991; 10:109-113.
14. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update* 1998; 4:103-120.
15. Chian RC, Gulekli B, Buckett WM et al. Priming with human chorionic gonadotropin before retrieval of immature oocyte in women with infertility due to polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine* 1999; 341:1624-1626.
16. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T et al. Prospective randomized study of human chorionic gonadotropin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2000; 15:165-170.
17. Chian RS. In vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 8:547-552.
18. Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In vitro maturation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 8:148-166.
19. Davis JA, Linzer DH. Expression of multiple forms of the prolactin receptor. *Molecular Endocrinology* 1989; 3:674-680.
20. Clarke DL, Linzer DI. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology* 1993; 133:224-232.
21. Dekel N, Lawrence TS, Gilula NB et al. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology* 1981; 86:352-362.
22. Dunphy W, Brizuela L, Beach D. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988; 54:423-431.
23. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965; 2:926-929.
24. Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208:349-351.
25. Edwards RG, Banister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in

- vitro. *Nature* 1969; 221:632-635.
26. Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biology of Reproduction* 1985; 33:1041-1049.
 27. Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL et al. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle stimulating hormone and insulin. *Biology of Reproduction* 1998; 59:1445-1453.
 28. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction* 1996; 54:197-207.
 29. Gomez E, Tarin JJ, Peicer A. Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertility and Sterility* 1993; 60:40-46.
 30. Gosden RG, Bownes M. Molecular and cellular aspects of oocyte development. In: Grudzinskas J, Yovich J (Eds). *Gametes-The Oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995; p.23-53.
 31. Gosden RG, Mullan J, Picton HM et al. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Human Reproduction Update* 2002; 8:105-110.
 32. Halpin DMG, Jones A, Fink G et al. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *Journal of Reproduction and Fertility* 1986; 77:287-296.
 33. Hovatta O, Silye R, Krausz T et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Human Reproduction* 1996; 11:1268-1272.
 34. Hovatta O, Silye R, Abir R et al. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction* 1997; 12:1032-1036.
 35. Hovatta O, Wright C, Krausz T et al. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human Reproduction* 1999; 14:2519-2524.
 36. Hovatta O. Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004; 11S:S50-S54.
 37. Howe E, Lintern-Moore S, Moore GPM et al. Ovarian development of hypopituitary snell dwarf mice *Journal of Reproduction and Fertility* 1978; 19:959-964.
 38. Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B et al. Recombinant LH equally effective as recombinant HCG in promoting oocyte maturation in a clinical in vitro maturation programme: a randomized study. *Human Reproduction* 2003; 18:2131-2136.
 39. Hu ZZ, Meng J, Dufau ML. Isolation and characterization of two novel isoforms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:41086-41094.
 40. Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 1996; 45:372-377.
 41. Izadyar F, Zhao J, Van Tol, HTA et al. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes(COCs) during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53:398-406.
 42. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. The mechanism of growth-promoting effects of prolactin in embryogenesis--links to growth factors. *Cells, tissues, organs* 1999; 164:2-13.
 43. Kiapekou E, Loutradis D, Drakakis D et al. Effects of GH and IGF-I on the in vitro maturation of mouse oocytes. *Hormones* 2005; 4:155-160.
 44. Kiapekou E, Loutradis, Patsoula E et al. Prolactin receptor mRNA expression in oocytes and preimplantation embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 10:339-346.
 45. Kline JB, Roehrs H, Clevenger et al. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:35461-35468.
 46. Kuzmina T, Torner H, Alm H et al. How prolactin influences the maturation and further development of bovine oocytes in vitro. *Arch Anim Breed* 1996; 39(special issue):54.
 47. Liu X, Kazumichi A, Yokota H et al. Effects of growth hormone, activin and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 1998; 139:2342-2347.
 48. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC et al. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte IVM with the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 101:697-701.
 49. Loutradis D, Drakakis P, Michalas S et al. The effect of compounds altering the cAMP level on reversing the 2-cell block induced by hypoxanthine in mouse embryos in vitro. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 1994; 57:195-199.
 50. Maller JL. Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Differentiation* 1985; 16:211-221.
 51. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimu-

- lating hormone priming. *Human Reproduction* 1999; 14:1847-1851.
52. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome. A randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122:587-592.
53. Mikkelsen AL. Strategies in human in vitro maturation and their clinical outcome. *Reproductive Bio-Medicine Online* 2005; 10:593-599.
54. Moor RM, Dai Y, Lee C et al. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reproduction Update* 1998; 4:223-236.
55. Nebreda A, Hunter T. The c-mos-proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF in cell free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J* 1993; 12:1979-1983.
56. Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertility and Sterility* 2000; 73: 599-603.
57. Ormandy CJ, Camus A, Barra J et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & Development* 1997; 11:167-178.
58. Parrott DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *Journal of Reproduction and Fertility* 1960; 1:230-241.
59. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Medicine* 1935; 62:665-675.
60. Roy L, Singh B, Gautier J. The cyclin component of B2 is a substance of mos-proto-oncogene product. *Cell* 1990; 61:825-831.
61. Salsha O, Abusheika N, Sharma V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Human Reproduction Update* 1998; 4:816-832.
62. Shirota M, Banville D, Ali S et al. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* 1990; 4:1136-1143.
63. Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 h. *Fertility and Sterility* 2000; 73:541-544.
64. Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A et al. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulation hormone receptor. *New England Journal of Medicine* 2003; 349:760-766.
65. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2:366.
66. Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T et al. Luteal phase start of low-dose FSH of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Human Reproduction* 2000; 15:747-751.
67. Trounson AO, Wood A, Kausche A. In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertility and Sterility* 1994; 62:353-362.
68. Trounson AO, Alderiesz C, Jones GM et al. Oocyte maturation. *Human Reproduction* 1998; 13:52-62.
69. Yokkaichiya T, Fukaya T, Hoshiai H et al. Improvement of mouse embryo development in vitro by prolactin. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1988; 155:241-246.
70. Yoshimura Y, Hosoi Y, Iritani A et al. Developmental potential of rabbit oocyte matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biology of reproduction* 1989; 41:26-33.
71. Yoshimura Y, Nakamura Y, Yamada H et al. Possible contribution of prolactin in the process of ovulation and oocyte maturation. *Hormone Research* 1991; 35(Suppl 1):22-32.
72. Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu M et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in rabbit. *Biology of Reproduction* 1996; 55:152-160.
73. Wynn P, Picton HM, Krapez JA et al. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the number of human oocytes reaching metaphase II by in vitro maturation. *Human Reproduction* 1998; 13:3132-3138.
74. Zhao J, Van Tol HTA, Taverne MAM et al. The effect of growth hormone on pre-antral follicles in vitro. *Zygote* 2000; 8:275-283.
75. Zhao J, Taverne MAM, Van Der Weijden GC et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) stimulates the development of pre-antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* 2001; 58:287-296.
76. Zhou J, Bondy C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biology of Reproduction* 1993; 43:467-474.