



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF)
στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων (GV)

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΒΑΡΣΑΜΟΠΟΥΛΟΥ

Βιολόγος

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Γεώργιος-Σπυρίδων Ανυφαντής

Λέκτορας, Κλινικός Εμβρυολόγος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

Αναπληρωτής Καθηγητής

Ασπασία Τσέζου

Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος _____	4
Περίληψη _____	5
Abstract _____	6
Εισαγωγή _____	7
1. Ωοθυλακιογένεση _____	7
2. Μείωση _____	10
3. Ωρίμανση ωαρίων <i>in vivo</i> _____	13
4. Ωρίμανση ωαρίων <i>in vitro</i> _____	16
5. Ωρίμανση GV ωαρίων <i>in vitro</i> _____	20
6. Ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF) _____	22
Σκοπός _____	26
Υλικά και Μέθοδοι _____	26
1. Συλλογή ωαρίων _____	26
2. Επιλογή και προετοιμασία του παράγοντα LIF _____	27
3. Προσθήκη LIF και παρακολούθηση των ωαρίων _____	27
Αποτελέσματα _____	29
Συζήτηση _____	32
Βιβλιογραφία _____	35

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, στη Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας κ. Γεώργιο-Σπυρίδων Ανυφαντή, Λέκτορα του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Κλινικό Εμβρυολόγο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη εργασία, την άριστη συνεργασία μας και τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές του κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Φανή Μπουναρτζή για τη βοήθειά της. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τη συμφοιτήτρια και πολύ καλή μου φίλη Ελίνα Δραχμάνη, που ξεκινήσαμε παράλληλα τις εργασίες μας, για την ευχάριστη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης των διπλωματικών μας εργασιών.

Περίληψη

Η δυνατότητα να συλλεχθούν και να ωριμάσουν ωάρια *in vitro*, τα οποία προορίζονταν να πεθάνουν *in vivo* με ατρησία, ενδεχόμενα θα έχει πολλά κλινικά οφέλη. Μερικά ωάρια GV μπορεί να ανακτηθούν παρόλη τη χορήγηση HCG 36 ώρες πριν την ωοληψία, σε γυναίκες στις οποίες γινόταν πολλαπλή ωοθυλακική διέγερση. Αυτά μπορεί να υποστούν αυθόρμητη πυρηνική ωρίμανση *in vitro* και μετά να γονιμοποιηθούν και να αναπτυχθούν φυσιολογικά (Cha *et al.*, 1998). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF) στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων GV, τα οποία προέρχονταν από γυναίκες, στις οποίες γινόταν πολλαπλή ωοθυλακική διέγερση και για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων χορηγούνταν hCG.

Μετά τη συλλογή των ωαρίων και την απογύμνωση τους από τα κοκκώδη κύτταρα, τοποθετήθηκαν σε σταγόνα καλλιεργητικού υλικού ποσότητας 50 μl, η οποία περιείχε 49,5 μl καλλιεργητικό μέσο για ανάπτυξη εμβρύων από τη γονιμοποίηση έως το στάδιο της βλαστοκύστης και 0,5μl διαλύματος LIF 1 μg/ml. Έγινε έλεγχος των ωαρίων τη στιγμή της προσθήκης του LIF και στη συνέχεια ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να παρατηρηθεί εάν η παρουσία του LIF έχει θετική ή αρνητική επίδραση στην ωρίμανση τους. Το ίδιο συνέβη και σε δείγματα – μάρτυρες (control) τα οποία είχαν τοποθετηθεί μόνο σε καλλιεργητικό μέσο.

Διαπιστώθηκε 100% ωρίμανση στο στάδιο MII για όλα τα ανώριμα ωάρια που ανακτήθηκαν σε στάδιο GV, αλλά και MI. Αυτά που ήταν στο στάδιο GV ωρίμασαν γρηγορότερα σε σχέση με τα ωάρια – control, σημειώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα για την επίδραση του LIF είναι αντιφατικά μέσα από διάφορες μελέτες. Η διαφορά στις δόσεις του LIF που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να είναι μια εξήγηση, καθώς, οι μελέτες που έδειξαν θετική επίδραση του LIF στο σχηματισμό βλαστοκύστης χρησιμοποίησαν σχετικά υψηλότερες δόσεις του. Ακόμη, το πιθανότερο είναι πως το σηματοδοτικό μονοπάτι LIF/STAT3 είναι λειτουργικό στα κοκκώδη κύτταρα και τα ωάρια και ότι ο LIF ενεργοποιεί την STAT3 πρωτεΐνη, η οποία είναι σημαντική για την ωρίμανση των ωαρίων.

Abstract

The option of collecting and maturing oocytes *in vitro*, which were intended to die *in vivo* with atresia, has many potential clinical benefits. Some GV oocytes can be recovered despite administering hCG 36 hours before oocyte retrieval, in women undergoing multiple follicular stimulation. These oocytes can undergo spontaneous nuclear maturation *in vitro* and then be fertilized and normally develop (Cha *et al.*, 1998). The purpose of this study is to investigate the effect of leukemia inhibitory factor (LIF) in the maturation of immature GV oocytes, which were derived from women undergoing multiple follicular stimulation and where hCG was administered for the final maturation of the follicles.

After the collection of the oocytes and the denudation of the granular cells, they were placed in a 50 ml culture medium drop, which contained 49.5 µl culture medium for embryo development from fertilization to blastocyst stage, and 0,5 µl LIF solution 1 µg / ml. Oocytes were checked at the time LIF was added, and then at regular intervals, in order to see if the presence of LIF has a positive or negative effect on their maturation. The same thing happened on control - samples, which were placed in culture medium alone.

There was a 100% maturation rate at MII stage, for all immature oocytes recovered at GV and MI stage. The ones that were, originally, at GV stage, matured even faster than the control - oocytes, recording a statistically significant difference ($P < 0.05$). The results regarding the impact of LIF through various studies are inconsistent. The use of different doses of LIF may be an explanation, as studies that showed a positive effect of LIF in blastocyst formation used relatively higher doses. Furthermore, it is likely that the signal transduction pathway LIF / STAT3 is functional in the granulosa cells and oocytes and that LIF activates STAT3 protein, which is important for the maturation of oocytes.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ωοθήκες εμφανίζονται κατά την εμβρυική ανάπτυξη ως μία πάχυνση του επιθηλίου που καλύπτει τη γεννητική ταινία. Η λειτουργία τους είναι χρονικά περιορισμένη και σχετίζεται με την αναπαραγωγική περίοδο της γυναίκας. Ο ρόλος των ωοθηκών είναι διπλός, επάγουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (ωοθυλακιογένεση) αλλά είναι και ενδοκρινείς αδένες, παράγοντας τα στεροειδή της αναπαραγωγής (Μεσσήνης, 2005).

Στην ενήλικη γυναίκα, η λειτουργία των ωοθηκών είναι αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση- ωοθήκες. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (gonadotrophin releasing hormone ή GnRH) παράγεται από τα νευρικά κύτταρα του υποθαλάμου και καταλήγει μέσω των απολήξεων τους στο μίσχο της υπόφυσης. Τα γοναδοτρόφα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, παράγουν την ορμόνη ωρίμανσης του ωοθυλακίου ή θυλακιοτρόφο ορμόνη (Follicle stimulating hormone ή FSH) καθώς και την ωχρινοτρόφο ορμόνη (Luteinizing hormone ή LH). Οι γοναδοτροφίνες ασκούν τη δράση τους στις ωοθήκες και καθορίζουν τη λειτουργία αυτών (Richards *et al.*, 2010; Μεσσήνης, 2005).

Ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση - ωοθήκες αλληλορυθμίζεται μέσω θετικής ή αρνητικής ανάδρασης από τοπικά παραγόμενες ουσίες των ωοθηκών, οι οποίες διακρίνονται σε ωοθηκικά στεροειδή οιστραδιόλη (E2), προγεστερόνη (P4), ανδρογόνα καθώς και σε ωοθηκικά μη-στεροειδή ινχιμπίνη (inhibin), ακτιβίνη (activin), φολλιστατίνη (follistatin) και το παράγοντας άμβλυσης των γοναδοτροφινών (GnSAF) (Messinis, 2006).

1. Ωοθυλακιογένεση

Τα πρώτα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται στο έμβρυο στο ραχιαίο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού και μετατοπίζονται στις γεννητικές κορυφογραμμές (Smitz *et al.*, 2002). Μέσω συνεχών μιτωτικών διαιρέσεων ο αριθμός τους αυξάνεται στα 6 εκατομμύρια κατά την 20^η εβδομάδα της κύησης. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα υφίστανται ατρησία με αποτέλεσμα ο

αριθμός τους κατά την εφηβεία να περιορίζεται στις 3000-4000. Μετά την ολοκλήρωση των μιτωτικών διαιρέσεων ακολουθεί η διαδικασία της μείωσης, και ο σχηματισμός των πρώτων αρχέγονων ωοθυλακίων (Oktem *et al.*, 2010). Η δημιουργία των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων αποτελεί μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία (Tingen *et al.*, 2009).

Τα αρχέγονα ωοθυλάκια εμφανίζονται στην ωοθήκη από την 6-7^η εβδομάδα της κύησης έως τον 6^ο μήνα μετά την γέννηση. Το ωοκύτταρο τους βρίσκεται στη φάση της διπλοταινίας στην πρόφαση I, περιβάλλεται από έναν στοίχο επίπεδων κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα), και έχει διάμετρο στα 30-60μm (Μεσσήνης, 2005; Oktem *et al.*, 2010). Τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοθυλάκια, με κύριο χαρακτηριστικό την αλλαγή της μορφολογίας των κοκκωδών κυττάρων, τα οποία μετατρέπονται σε κυβοειδή, επιτρέποντας την αύξηση της διαμέτρου του ωοθυλακίου (>60μm) (εικόνα 1).

Το επόμενο στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων είναι η δημιουργία των δευτερογενών ωοθυλακίων (διάμετρο >120μm) τα οποία αποτελούνται από πολλούς στοίχους κοκκωδών κυττάρων. Τότε για πρώτη φορά εμφανίζεται η διάφανη ζώνη (Μεσσήνης, 2005). Τα κοκκώδη κύτταρα με τις κυτταροπλασματικές τους προεκβολές διαπερνούν τη διάφανη ζώνη και δημιουργούν ένα είδος επικοινωνίας με τη μεμβράνη του ωοκυττάρου, μέσω των οποίων μεταφέρονται πληροφορίες και τροφικά στοιχεία στο ωοκύτταρο.

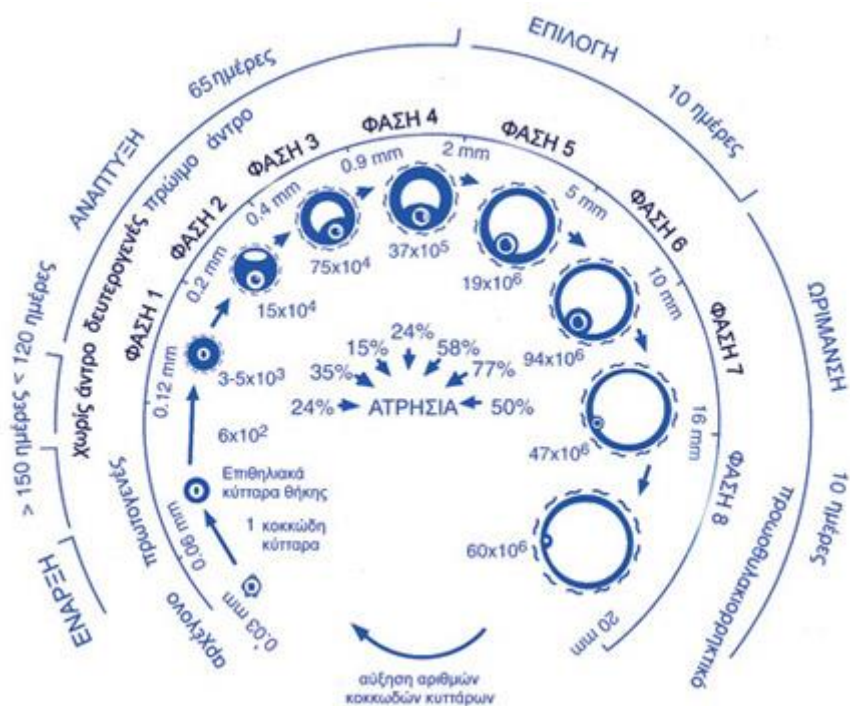
Η περαιτέρω ωρίμανση του ωοθυλακίου οδηγεί στην δημιουργία άντρου, στο οποίο εναποθέτεται το ωοθυλακικό υγρό προερχόμενο από τα κοκκώδη κύτταρα. Τα κύτταρα θήκης δημιουργούν μία στιβάδα κυττάρων (έσω και έξω θήκη) περιμετρικά της κοκκώδους στιβάδας και ενδιάμεσα τους σχηματίζεται μία μεμβράνη που ονομάζεται βασική. Κατά την πορεία της ανάπτυξης του ωοθυλακίου διακρίνονται διάφορα επιμέρους στάδια μέχρι το ωοθυλάκιο να γίνει γραφιανό ή προωοθυλακιόρρηκτικό (εικόνα 1) (Μεσσήνης, 2005). Σύμφωνα με τις μελέτες του Gougeon (1986), το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την πλήρη ανάπτυξη του ωοθυλακίου υπολογίζεται περίπου στο ένα έτος.

Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου (αρχέγονο έως δευτερογενές), δεν απαιτείται η παρουσία των γοναδοτροφινών. Μέχρι το κοιλοτικό στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων δεν είναι αναγκαία η ύπαρξη

των γοναδοτροφινών, αλλά η παρουσία τους επάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (σχήμα 1) (Kumar *et al.*, 1997). Σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακική ανάπτυξη παίζουν παράγοντες, εκκρινόμενοι τόσο από την ωοθήκη ασκώντας παρακρινή δράση [ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α (TGF- α), η αντιμυλλεριανή ορμόνη (AMH ή MIS), ο ινσουλινοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), διάφορες νευροτροφίνες, η πρωτεΐνη του ογκογονιδίου του Wilms (WT1), η πρωτεΐνη του νευροβλαστώματος (pRb), το ογκογονίδιο *myc*, ο παράγοντας των βλαστοκυττάρων (SCF) και ο αυξητικός παράγοντας των νευρικών κυττάρων (NGF)], όσο και παράγοντες του ίδιου του ωοκυττάρου με αυτοκρινή δράση, (ο αναπτυξιακός παράγοντας διαφοροποίησης (GDF-9) και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs)] (Rizk *et al.*, 2008).

Η παρουσία των γοναδοτροφινών έχει κριθεί αναγκαία στα στάδια της ανάπτυξης που ακολουθούν, από το κοιλοτικό στάδιο μέχρι το προωοθυλακιόρρηκτικό (Orisaka *et al.*, 2009). Οι γοναδοτροφίνες συμβάλλουν στη συσσώρευση, στην αύξηση του όγκου του ωοθυλακικού υγρού, στον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων καθώς και στη δημιουργία του ωοφόρου δίσκου και της ακτινωτής στεφάνου. Στα στάδια αυτά στρατολογούνται τα ωοθυλάκια που θα ωριμάσουν ενώ τα υπόλοιπα οδηγούνται σε ατρησία. Από τα ωοθυλάκια που θα στρατολογηθούν μόνο ένα το κατάλληλο που θα επιλεγεί για ωοθυλακιόρρηξία και θα αποτελέσει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο (Μεσσήνης, 2005).

Εφ' όσον ολοκληρωθεί η διαδικασία της επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου ακολουθεί η διαδικασία της ωοθυλακιόρρηξίας, κατά την οποία το ωοθυλάκιο απελευθερώνεται έπειτα από την κατάλληλη επίδραση της LH (αιχμή της LH). Η επόμενη διαδικασία που λαμβάνει χώρα είναι η ωχρινοποίηση του ραγέντος ωοθυλακίου. Η ωχρινοποίηση του ξεκινάει σταδιακά πριν την ωοθυλακιόρρηξία και συνεχίζεται με ανερχόμενη πορεία. Στη φάση αυτή λόγω της επίδρασης της LH, τα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου μετατρέπονται σε μεγάλα ωχρινικά κύτταρα ενώ τα κύτταρα της έσω θήκης σε μικρά ωχρινικά κύτταρα. Ταυτόχρονα, παρατηρείται η αύξηση της στάθμης της προγεστερόνης καθώς συνεχίζεται και η παραγωγή της οιστραδιόλης (Μεσσήνης, 2005).

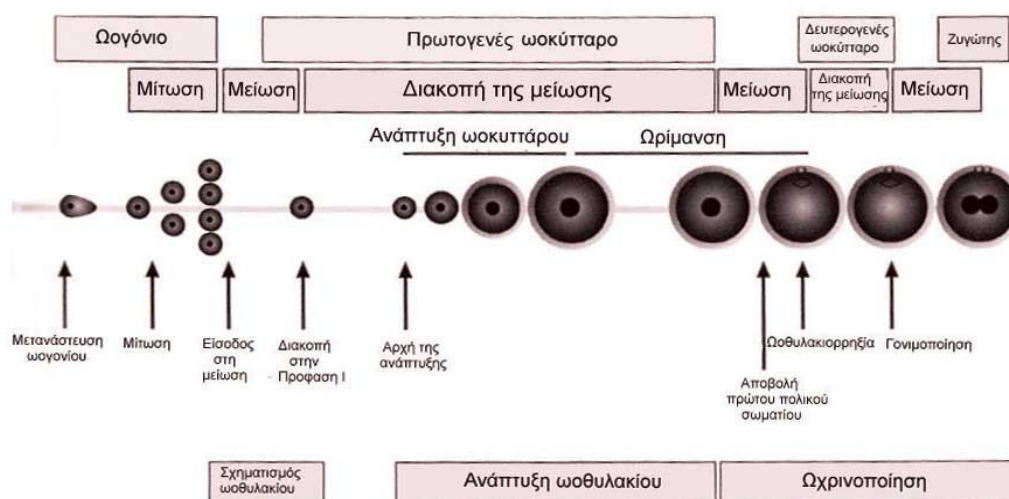


Εικόνα 1: Τα αναπτυξιακά στάδια του ωοθυλακίου (Gougeon *et al.*, 1986)

2. Μείωση

Η διεργασία της μείωσης αρχίζει περίπου την 8η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής και διακόπτεται στο στάδιο της διπλοταινίας (δηλαδή την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης), κατά το οποίο τα διπλά χρωμοσώματα έχουν διαταχθεί κατά ζεύγη. Τα ωκύτταρα πλέον καλούνται πρωτογενή ωκύτταρα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του, το πρωτογενές ωκύτταρο περιβάλλεται από ένα στρώμα επίπεδων θυλακικών κυττάρων της ωθήκης και ο σχηματισμός αυτός ονομάζεται πρωτογενές ωοθυλάκιο. Το πρωτογενές ωκύτταρο παραμένει αδρανές σε αυτό το στάδιο τουλάχιστον μέχρι την εφηβεία, αλλά ακόμη και για 40 χρόνια αργότερα (Cooper 2000). Η μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται ακριβώς πριν την ωοθυλακιορρηξία, ως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της LH και έτσι προκύπτει το δευτερογενές ωκύτταρο ή ωάριο. Στην πρώτη μειωτική διαίρεσή του πριν την ωοθυλακιορρηξία, αντίθετα με το αντίστοιχο στάδιο της

σπερματογένεσης, το κυτταρόπλασμα του πρωτογενούς ωοκυττάρου διαιρείται άνισα. Η συνέχιση της μειωτικής διαίρεσης είναι εμφανής με την κατάτμηση του βλαστικού κυστιδίου. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, τα ζεύγη των ομολόγων χρωμοσωμάτων κατανέμονται στα δύο νέα κύτταρα, τα οποία όμως είναι άνισα σε μέγεθος. Το μεγάλο κύτταρο είναι το δευτερογενές ωοκύτταρο, ή ωάριο, που παραλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, εκτός αν γονιμοποιηθεί. Το μικρό κύτταρο ονομάζεται πρώτο πολικό σωματίο, περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και τον μισό αριθμό ομολόγων χρωμοσωμάτων. Η μειωτική διαίρεση συνεχίζεται με την είσοδο του σπερματοζωαρίου και σχηματίζονται δύο νέα κύτταρα (Εικόνα 2). Ένα μεγάλο, το γονιμοποιημένο ωάριο και ένα μικρό, το δεύτερο πολικό σωματίο (Jones *et al.*, 2008).



Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση της ανάπτυξης και ωρίμανσης του ωοκυττάρου

Στάδιο βλαστικού κυστιδίου (GV)

Ένα ανώριμο ωάριο (στάδιο Πρόφασης I), χαρακτηρίζεται από την απουσία πολικού σωματίου αλλά την παρουσία βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle-GV). Στο στάδιο αυτό (GV) ο πυρήνας περιέχει 46 χρωμοσώματα. Μορφολογικά παρατηρείται ακανόνιστο σχήμα του ωαρίου, ένα σκουροχρωμο κέντρο και κοκκώδες ωόπλασμα. Ακόμη, υπάρχει ένα συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων – ωαρίου (COCS – Cumulus oocyte complexes). Το βλαστικό κυστίδιο είναι σφαιρικό και περιέχει ένα

μεγάλο, εξωκεντρικό πυρηνίσκο. Με πιο κοντινή εξέταση, ένας δεύτερος πυρηνίσκος μπορεί να εντοπιστεί. Το βλατικό κυστίδιο είναι τοποθετημένο κεντρικά στο ωόπλασμα του προφασικού ωοκυττάρου. Η διάσπασή του σηματοδοτεί τη συνέχιση της μείωσης (Veeck 1999).

Στάδιο μετάφασης I (MI)

Ένα ωάριο σε ενδιάμεσο στάδιο ωριμότητας (στάδιο της Μετάφασης I), χαρακτηρίζεται από την απουσία πολικού σωματίου και βλαστικού κυστιδίου και έχει ένα εκτεταμένο και μη συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων. Έχει ολοκληρώσει την πρόφαση της μείωσης I. Το βλαστικό κυστίδιο έχει διασπαστεί και ο πυρηνίσκος του έχει εξαφανιστεί. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, διαμορφώνεται η άτρακτος και ανασυνδυασμένα μητρικά και πατρικά χρωμοσώματα διατάσσονται προς τους πόλους. Αργότερα, στην τελόφαση, ολόκληρα τα χρωμοσώματα ταξινομούνται ανεξάρτητα είτε στο ωάριο είτε στο πολικό σωματίο (Veeck 1999). Η στάση στο στάδιο MI θα μπορούσε να συμβεί εξαιτίας προβλήματος στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που μεσολαβεί για τη μειωτική εξέλιξη ή σε οποιαδήποτε ανωμαλία της μειωτικής ατράκτου που οδηγεί σε ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου ατράκτου (SAC) (Beal *et al.*, 2010). Ακόμη, ανώμαλος σχηματισμός της μειωτικής ατράκτου έχει συσχετισθεί με στάση στο στάδιο MI (Heindryckx *et al.*, 2011).

Στάδιο μετάφασης II (MII) του ωαρίου

Έτσι χαρακτηρίζεται ένα πλήρως ώριμο και επομένως γονιμοποιήσιμο ωάριο. Το στάδιο της μετάφασης II (MII) δηλώνει την ολοκλήρωση της διαδικασίας ωρίμανσης του ωαρίου. Στο τελικό στάδιο της ωρίμανσης του ωαρίου συντελείται η πρώτη μειωτική διαίρεση του ωαρίου το οποίο βρίσκεται στο στάδιο μετάφασης II (MII) της διαδικασίας της μείωσης. Έτσι τα ζεύγη των ομολόγων χρωματοσωμάτων κατανέμονται στα δύο νέα κύτταρα, τα οποία όμως είναι άνισα σε μέγεθος. Το μεγάλο κύτταρο είναι το δευτερογενές ωοκύτταρο, ή ωάριο, που παραλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και δεν αναπτύσσεται περαιτέρω, εκτός αν γονιμοποιηθεί. Το μικρό κύτταρο ονομάζεται πρώτο πολικό σωματίο, περιέχει ελάχιστο κυτταρόπλασμα και το μισό αριθμό ομολόγων χρωματοσωμάτων (Jones *et al.*, 2008).

Ένα πλήρως ώριμο ωάριο (στάδιο Μετάφασης II), έχει ένα διευρυμένο και μη συμπαγές σύμπλεγμα κοκκιωδών κυττάρων, περιέχει 23 χρωμοσώματα και ένα πολικό σωματίο στον περιλεκιθικό χώρο καθώς και ένα καθαρό και ομογενές κυτταρόπλασμα με ομαλή κατανομή κυτταρικών οργανιδίων. Είναι ευνόητο ότι τα ανώριμα ωάρια δεν είναι δυνατόν να γονιμοποιηθούν. Διότι περιέχουν 46 χρωματοσώματα (διπλοειδή κύτταρα) οπότε με την ένωσή τους με το απλοειδές σπερματοζώαριο που έχει 23 χρωματοσώματα θα προέκυπτε ένα έμβρυο ανώμαλο με 69 χρωματοσώματα. Τα ανώριμα ωάρια σε ειδικές περιπτώσεις είναι δυνατόν να ωριμάσουν στο εργαστήριο (*in vitro maturation*) και μετά να γονιμοποιηθούν (Veeck 1999).

3. Ωρίμανση ωαρίων *in vivo*

Στην ανθρώπινη ωοθήκη, κάθε πλήρως ανεπτυγμένο ωάριο συνεχίζει την ωρίμανση ανταποκρινόμενο στις γοναδοτροφίνες. Αυτή η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί αφού τα ωάρια φτάσουν στο στάδιο της μετάφασης II (MII). Αφού τα ωάρια αρχίζουν να ωριμάζουν, τα βλαστικά κυστίδια (GV) σπάζουν και τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται (κατανομή βλαστικών κυστιδίων, GVBD). Τα χρωμοσώματα τότε βρίσκονται στο στάδιο MI που ακολουθείται από τη μετάβαση από την ανάφαση I στην τελόφαση I και τα ωοκύτταρα καταλήγουν στο στάδιο MII, έτοιμα για γονιμοποίηση (Troupson *et al.*, 2001). Το ωοκύτταρο συνθέτει διάφορα παράγωγα γονιδίων που του επιτρέπουν να επιτύχει τις αναπτυξιακές μεταβάσεις και εξειδικεύσεις που σχετίζονται με τη γονιμοποίηση και την εμβρυογένεση. Η μεταγραφή αυτών των γονιδίων παύει με τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου και δεν εκφράζονται ξανά μέχρι την επόμενη γενιά ωοκυττάρων (Song *et al.*, 2006). Αποτυχία συνέχισης της μείωσης *in vivo* μπορεί να προκύψει εξαιτίας: απουσίας ή ατελούς απότομης αύξησης της LH, διαταραχών στον μηχανισμό σηματοδότησης από τα γύρω κύτταρα του ωοφόρου δίσκου και εγγενών παραγόντων στο ωοκύτταρο (Chen *et al.*, 2010).

Η ωρίμανση ωαρίων περιλαμβάνει δυο εξίσου σημαντικές περιόδους που καθορίζουν την επάρκεια του ωαρίου. Κατά τη διάρκεια της πρώτης

περιόδου, το wάριο συνεχίζει τη μείωση και καταλήγει στο στάδιο της μετάφασης II (MII). Αυτή είναι η λεγόμενη πυρηνική ωρίμανση. Η δεύτερη περίοδος είναι το διάστημα μεταξύ της φάσης MII και της ενεργοποίησης του wαρίου μετά τη γονιμοποίηση (τελική κυτταροπλασματική ωρίμανση), η οποία επιτρέπει στα wοκύτταρα να συνεχίσουν και να ολοκληρώσουν τη μειωτική διαδικασία, να αποδιοργανώσουν και να αναδιαμορφώσουν την κεφαλή των σπερματοζωαρίων, ώστε να σχηματιστούν οι προπυρήνες και να προαχθεί η ανάπτυξη του εμβρύου. Αν και τα wάρια έχουν αποκτήσει την ικανότητα να ολοκληρώσουν την πυρηνική ωρίμανση από τα αρχικά στάδια την ωοθυλακιογένεσης, η κυτταροπλασματική ωρίμανση ολοκληρώνεται με το τέλος της ωοθυλακικής ανάπτυξης (Veeck, 1999).

Το πρώτο βήμα για την επανέναρξη της μειωτικής διαδικασίας είναι η διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης ή η κατάτμηση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD). Παρ' όλο που είναι ικανά να το κάνουν, τα wοκύτταρα που πλησιάζουν στην ολοκλήρωση της ανάπτυξης *in vivo* δεν υφίστανται GVBD μέχρι να λάβουν το κατάλληλο ορμονικό ερέθισμα. Αυτό υποδηλώνει ότι παράγοντες μέσα στο wοθυλάκιο διατηρούν το wάριο σε μειωτική στάση. Η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και άλλες πουρίνες, όπως η υποξανθίνη, η γουανοσίνη, η αδενοσίνη, η κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη – γνωστή ως αναστολέας ωρίμανσης wοκυττάρων (OMI) – και η Μυλλέριος ανασταλτική ουσία (MIS) εμπλέκονται στη διατήρηση της μειωτικής στάσης (Buccione *et al.*, 1990).

Η ανάπτυξη του wοκυττάρου και των σωματικών κυττάρων που το περιβάλλουν λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα και συντονισμένα και αυτό εξασφαλίζει την ανάπτυξη ενός ώριμου wαρίου έτοιμο για γονιμοποίηση. Διακοπή αυτής της επικοινωνίας θα οδηγήσει σε αναπτυξιακή αποτυχία του wαρίου (Erigg, 2001). Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση ότι τα σωματικά κύτταρα του wοθυλακίου ελέγχουν το wοκύτταρο και την ανάπτυξή του. Οι Pincus και Enzmann (1934) ανακάλυψαν ότι πλήρως ανεπτυγμένα wάρια που αφαιρέθηκαν από wοθυλάκια με άντρο υποβλήθηκαν σε αυθόρμητη και ανεξάρτητη από γοναδοτροφίνες συνέχιση της μείωσης σε καλλιέργεια. Συμπέραναν ότι τα σωματικά κύτταρα των wοθυλακίων διατηρούν τα wάρια σε μειωτική αδράνεια. Πρόσφατα πειράματα δείχνουν ότι το wοκύτταρο ρυθμίζει την ανάπτυξη του wοθυλακίου, όπως και τη δική του ωρίμανση, ενώ

επηρεάζει και τις λειτουργίες των γειτονικών σωματικών κυττάρων και το ποσοστό ωορρηξίας (Juengel *et al.*, 2005). Τα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη μεταγραφή του ωαρίου και προάγουν την ικανότητα των ωοκυττάρων να υποβληθούν σε γονιμοποίηση και κυτταροπλασματική ωρίμανση (Buccione *et al.*, 1990). Η συχνότητα μόνο της πυρηνικής ωρίμανσης του ωαρίου φαίνεται να αυξάνεται όσο τα ωοθυλάκια αυξάνουν σε μέγεθος. Κατά την παραγωγική φάση, το ποσοστό των ωοκυττάρων που συνεχίζουν τη μείωση είναι σημαντικά υψηλότερο στα μεγάλα ωοθυλάκια απ' ό,τι στα μικρότερα. Ωστόσο, κατά την ωχρινική φάση η συχνότητα εμφάνισης ήταν αρκετά σταθερή, ανεξάρτητα από το μέγεθος του ωοθυλακίου (Tsuji *et al.*, 1985).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων παράγοντες από τα κοκκώδη κύτταρα, όπως ο kit ligand (KITL), προωθούν την ανάπτυξη του ωαρίου, ενώ παράγοντες από το ωοκύτταρο επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των κοκκωδών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις σε συνεργασία με τις γοναδοτροφίνες και άλλους παράγοντες προωθούν τη μετάβαση σε κοιλοτικό ωοθυλάκιο (Matzuk *et al.*, 2002). Τα ωοκύτταρα που βρίσκονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι σε θέση να επηρεάζουν περισσότερο την ανάπτυξη των κοκκωδών από αυτά που έχουν αναπτυχθεί πλήρως (Latham *et al.*, 2004).

Ένα προωθυλακιορρηκτικό κύμα της LH προκαλεί μειωτική ωρίμανση *in vivo*, αλλά επειδή τα ωοκύτταρα στερούνται των υποδοχέων LH ως εκ τούτου η επαγωγή της ωρίμανσης διαμεσολαβεί από τα σωματικά κύτταρα του ωοθυλακίου. Υπάρχουν δύο υποθέσεις για να εξηγήσουν το μηχανισμό με τον οποίο οι γοναδοτροφίνες επάγουν την επανέναρξη της μείωσης *in vivo*. Η πρώτη υποστηρίζει πως η διέγερση με γοναδοτροφίνες προκαλεί κατάλυση της μεσοκυττάριας επικοινωνίας στο ωοθυλάκιο στερώντας έτσι από το ωοκύτταρο παράγοντες, όπως το cAMP, που διατηρούν τη μειωτική στάση (Larsen *et al.*, 1986; Wert *et al.*, 1989). Η δεύτερη υπόθεση είναι ότι οι γοναδοτροφίνες προάγουν ένα σήμα ωρίμανσης από τα κοκκώδη κύτταρα παρακάμπτοντας το ανασταλτικό περιβάλλον του ωοθυλακίου (Erigg *et al.*, 1987). Επίσης, η συνέχιση της μείωσης από το στάδιο της διπλοταινίας ελέγχεται από τον παράγοντα προώθησης ωρίμανσης MFP. Άρα κάποιο

ελάττωμα στο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του MPF οδηγεί στην παραγωγή GV ωαρίων, χωρίς περαιτέρω ωρίμανση (Beall *et al.*, 2010).

Η διαδικασία της ωρίμανσης είναι υπό τον έλεγχο του παράγοντα προώθησης ωρίμανσης (MPF). Σε ανώριμα ωοκύτταρα, ο MPF είναι παρόν σε μία ανενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή ως ένα σύμπλοκο της κινάσης Cdk 1 και της κυκλίνης B. Αυτή η φωσφορυλίωση ελέγχεται από την κινάση Myt1. Η αποφωσφορυλίωση του MPF επάγεται από τη φωσφατάση Cdc25. Η δραστηριότητα του MPF κορυφώνεται σε ωοκύτταρα MI και στη συνέχεια μειώνεται κατά τη μετάβαση από την ανάφαση στην τελόφαση. Στη συνέχεια, τα υψηλά επίπεδα του MPF πάλι αποκαθίστανται και τα ωοκύτταρα διατηρούνται σε αυτό το στάδιο υπό την επίδραση ενός κυτταροστατικού παράγοντα (CSF). Ο MPF είναι πλήρως υποβαθμισμένος όταν τα ωοκύτταρα γονιμοποιούνται (Smith, 2001). Η αυθόρμητη επανέναρξη της μειωτικής διαδικασίας πιστεύεται ότι προκαλείται από μια πτώση στα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) των ωαρίων. *In vivo* μειωτική στάση επιτυγχάνεται με μια διεγερτική πρωτεΐνη G (Gs) που ενεργεί στην αδενυλοκυκλάση και η δραστηριότητα αυτή δεν μπορεί να διατηρηθεί όταν τα ωάρια απελευθερώνονται από το ενδοωοθυλακικό περιβάλλον τους. Το cAMP θεωρήθηκε νωρίς ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο της μειωτικής ωρίμανσης. Φαίνεται ότι έχει διπλό ρόλο: μεσολάβηση της διεγερτικής δράσης των γοναδοτροφινών στα κύτταρα του ωοθυλακίου (τα ωοκύτταρα δεν έχουν υποδοχείς γοναδοτροφίνης) και μια ανασταλτική επίδραση στο ίδιο το ωοκύτταρο. Η μείωση του cAMP των ωαρίων ενεργοποιεί άμεσα ή έμμεσα τον MPF (Erpigg *et al.*, 2004).

4. Ωρίμανση ωαρίων *in vitro*

Η ωρίμανση ωαρίων είναι μια μακρά διαδικασία κατά την οποία το ωάριο αναπτύσσεται και γίνεται ικανό να γονιμοποιηθεί και να υποβληθεί σε εμβρυογένεση. Τα περισσότερα ωάρια στην ωοθήκη δεν αναπτύσσονται και είναι μικρά και ανώριμα ενώ μόνο ένα θα υποστεί ωορρηξία. Η δυνατότητα να συλλεχθούν και να ωριμάσουν ωάρια *in vitro* θα επιτρέψει τη διάσωση

πολλών που προορίζονταν να πεθάνουν *in vivo* με ατρησία. Τα ενδεχόμενα κλινικά οφέλη είναι πολλά. Γυναίκες που υφίστανται χημειοθεραπείες, με αποτέλεσμα την πρόκληση πρόωρης εμμηνόπαυσης, θα μπορούν να καταψύξουν ωθηκικό ιστό πριν τη θεραπεία και να διατηρήσουν τα ωάρια για μελλοντική τεκνοποίηση. Τα ωάρια αυτά θα μπορούσαν να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν *in vitro*. Ακόμη, δωρεά ωθηκικού ιστού θα μπορούσε να γίνει σε ασθενείς με πρόωρη ωθηκική ανεπάρκεια και γοναδική δυσγενεσία. Επί του παρόντος, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε IVF λαμβάνουν μεγάλες δόσεις γοναδοτροφινών για την πρόκληση πολλαπλής ωθηλακιορρηξίας με κίνδυνο να υποστούν σύνδρομο υπερδιέγερσης ωθηκών. Η ωρίμανση ωαρίων *in vitro* θα μειώσει δραστικά το ποσό των απαιτούμενων εξωγενών γοναδοτροφινών και θα αποφευχθούν τέτοιες αρνητικές συνέπειες. Έτσι, η θεραπεία θα είναι απλούστερη και λιγότερο επεμβατική, καθώς επίσης και λιγότερο δαπανηρή (Hardy *et al.*, 2000).

Δύο τεχνικές ωρίμανσης ωαρίων χρησιμοποιούνται σήμερα. Στην πρώτη, ωάρια που συλλέγονται από ωοθυλάκια μικρής διαμέτρου (2mm - 10 mm), χωρίς προηγηθείσα διέγερση των ωθηκών ή με ελάχιστη ορμονική διέγερση 3 ημερών, 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 άντρου (Hovatta *et al.*, 1997). Οι τεχνικές καλλιέργειας που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα έως τώρα είναι: καλλιέργεια τμήματος ωθηκικού ιστού και καλλιέργεια μεμονωμένων ωοθυλακίων. Σε καλλιέργειες ωθηκικού 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).

Στους κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής 15-20% των συλλεγόμενων ωαρίων είναι ανώριμα, είτε στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV) είτε στη μετάφαση I (MI). Τα περισσότερα από αυτά είναι μειωτικά ικανά και μπορούν να συνεχίσουν τη μείωση αν καλλιεργηθούν σε κατάλληλες συνθήκες (Heindryckx *et al.*, 2011). Ακόμα και τώρα, σε κάποια ζευγάρια, μπορεί όλα τα ληφθέντα ωάρια να είναι στο στάδιο του GV ή MI και να παραμένουν ανθεκτικά σε περαιτέρω ωρίμανση ακόμα και μετά από καλλιέργεια *in vitro* μεγάλης διάρκειας (Beal *et al.*, 2010). Η περίπλοκη διαδικασία της μειωτικής ωρίμανσης των ωοκυττάρων είναι υπό τον έλεγχο πολλών σημαντικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και διαφόρων μοριακών σημάτων μονοπατιών μεταγωγής που συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα προώθησης ωρίμανσης MPF, του ρυθμιστή κλειδί, που καταλύει τη μετάβαση από MI σε MII (Heindryckx *et al.*, 2011). Κάποιοι από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην *in vitro* ωρίμανση ωαρίων είναι: FSH, LH, E2, ινσουλίνη (Harvey and Kaye, 1990), αυξητικοί παράγοντες [IGFs (Gardner and Kaye, 1991), EGF (Wood and Kaye, 1989), CSF-1 (Paria and Dey, 1990; Pampfer *et al.*, 1991), PDGF, bFGF (Larson *et al.*, 1992)].

Η ωρίμανση ωαρίων *in vitro* παραμένει μια πρόκληση στα θηλαστικά και έχει μέχρι στιγμής μικρά ποσοστά επιτυχίας. Σε διάφορα είδη ζώων η αποτελεσματικότητα της *in vitro* παραγωγής εμβρύων παραμένει χαμηλή. Λίγοι βιώσιμοι απόγονοι έχουν προκύψει από τέτοια διαδικασία μετά την εμβρυομεταφορά. Ένα μόνο ζωντανό ποντίκι έχει προκύψει από IVF και εμβρυομεταφορά μετά την *in vitro* ανάπτυξη και ωρίμανση αρχέγονων ωοκυττάρων (Errig *et al.*, 1996). Η ανάπτυξη σε καλλιέργεια προκοιλοτικών ωοθυλακίων από αγελάδα, χοίρο και πρόβατο έχει επιτευχθεί σε διαφορετικό βαθμό, ενώ κανένα ωάριο από αυτά τα ωοθυλάκια δεν έχει γονιμοποιηθεί (Telfer *et al.*, 1999). Η ωρίμανση *in vitro* ανθρώπινων ωοκυττάρων αποτελεί

ιδιαίτερη πρόκληση. Τα ωοθυλάκια του ποντικού είναι μικρά, εύκολα διαθέσιμα και έχουν σύντομη διάρκεια ωρίμανσης. Από την άλλη, τα ανθρώπινα ωοθυλάκια είναι πιο δύσκολα διαθέσιμα και ο αριθμός τους μειώνεται σημαντικά με την ηλικία της γυναίκας. Ο ανθρώπινος ωοθηκικός ιστός είναι πολύ σκληρός, με ένα ινώδες στρώμα και αυτό καθιστά την απομόνωση του ωοθυλακίου δύσκολη. Το σημαντικότερο είναι ότι η ανάπτυξη του ωοθυλακίου από τα αρχέγονα στάδια μπορεί να διαρκέσει ως 6 μήνες. Μόλις ένα ανθρώπινο προωοθυλακιόρρηκτικό ωοθυλάκιο ληφθεί είναι δύσκολο να διατηρηθεί *in vitro* επειδή είναι μια πολύ μεγάλη δομή που φτάνει τα 20mm σε διάμετρο (Gougeon, 1996).

Ένας ακόμη λόγος αυτής της αναποτελεσματικότητας είναι ότι παρ' όλο που τα ωάρια είναι στο σωστό πυρηνικό στάδιο ωρίμανσης (MI) μετά την ωρίμανση *in vitro*, αρκετά από αυτά δεν έχουν επαρκή χρόνο να ολοκληρώσουν την κυτταροπλασματική ωρίμανση. Δηλαδή, δεν είχαν το χρόνο να συνθέσουν όλα τα mRNAs και τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, καθώς η σύνθεση RNA σταμάτησε με την συνέχιση της μείωσης. Για τη βελτίωση της αναπτυξιακής ικανότητας απαιτείται φυσιολογική αναστολή της αυθόρμητης πυρηνικής ωρίμανσης *in vitro* για ένα χρονικό διάστημα επαρκές ώστε να ολοκληρωθεί η κυτταροπλασματική ωρίμανση (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2012). Επίσης, αυξήσεις του ασβεστίου (Ca^{2+}) διαδραματίζουν ρόλο στη μειωτική εξέλιξη. Σε περίπτωση απουσίας αύξησης ενδοκυτταρικού ασβεστίου, η αυθόρμητη επανέναρξη της μειωτικής διαδικασίας δεν συμβαίνει *in vitro*. Η απουσία καναλιών απελευθέρωσης ασβεστίου σε ωάρια ποντικών που έφτασαν μέχρι το στάδιο του GV ή ένα στάδιο μετά, δηλαδή MI, υποδηλώνει ελάττωμα στην έκφραση ή μετάφραση των καναλιών αυτών (Lee *et al.*, 2004).

Επιπλέον, διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας για την ωρίμανση ωαρίων *in vitro* επηρεάζουν τη γονιμοποίηση και την εμβρυική ανάπτυξη. Συνήθως FSH προστίθεται σε μέσο καλλιέργειας για την *in vitro* ωρίμανση, αλλά η προσθήκη της δεν αυξάνει την πυρηνική ωρίμανση στα ωάρια αρουραίου, πιθήκου και ανθρώπου. Η προσθήκη FSH σε μέσο καλλιέργειας ωαρίων δεν αυξάνει την ικανότητα του να φτάσει στη μετάφαση II, ωστόσο μέσο ωρίμανσης με FSH αυξάνει τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη (Cha *et al.*, 1998).

Η πρόκληση της ωρίμανσης *in vitro* είναι αρχικά να παραχθεί ένα περιβάλλον που να αντανάκλα το μεταβαλλόμενο ενδοκρινικό περιβάλλον στο οποίο το ωοθυλάκιο είναι εκτεθειμένο, χωρίς να καταστραφεί το ωοκύτταρο, αλλά αντιθέτως να επιτύχει πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση (Russell *et al.*, 1998). Επιπλέον, είναι απαραίτητη η υποστήριξη για τις πολύπλοκες κυτταρικές αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα του ωοθυλακίου και τα ωάρια. Το σύστημα καλλιέργειας χρειάζεται να υποστηρίζει μια μακρά περίοδο ωρίμανσης καθώς και τη συνεχή αύξηση του ωοθυλακίου. Η απόλυτη πρόκληση είναι φυσικά να παραχθεί ένα ωοκύτταρο το οποίο είναι υγιές και ικανό αναπτυξιακά (Hardy *et al.*, 2000). Μόλις η ωρίμανση του ωαρίου ολοκληρωθεί, η γονιμοποίηση και οι συνθήκες καλλιέργειας πρέπει επίσης να είναι βέλτιστη πριν τη μεταφορά των εμβρύων στη μήτρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η εμφύτευση (Russell *et al.*, 1998).

5. Ωρίμανση GV ωαρίων *in vitro*

Όταν τα ωάρια ανακτώνται από διεγερμένες ωοθήκες πριν την αύξηση της LH, τα περισσότερα από αυτά είναι στο στάδιο GV. Ωστόσο, όταν ανακτώνται μετά τη χορήγηση χοριακής γοναδοτροφίνης (HCG) είναι συνήθως πιο ώριμα στο στάδιο MI ή προωοθυλακιορρηκτικά στο στάδιο MII. Ταυτόχρονα, μερικά ωάρια GV μπορεί να ανακτηθούν παρόλη τη χορήγηση HCG 36 ώρες πριν την ωοληψία. Αυτά μπορεί να υποστούν αυθόρμητη πυρηνική ωρίμανση *in vitro* και μετά να γονιμοποιηθούν και να αναπτυχθούν φυσιολογικά (Cha *et al.*, 1998). Η εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροφίνη HMG στο μέσο καλλιέργειας βελτιώνει τα ποσοστά ωρίμανσης και γονιμοποίησης (Prins *et al.*, 1987).

Τα ωοκύτταρα που ανακτώνται στο στάδιο GV από διεγερμένους κύκλους είναι γνωστό ότι απαιτούν σχεδόν 22 ώρες καλλιέργειας *in vitro* για να φτάσουν στο στάδιο MII. Ωστόσο, μόνο η πυρηνική ωρίμανση δεν συνιστά επιτυχημένη *in vitro* ωρίμανση. Σε προηγούμενες μελέτες, υψηλό ποσοστό GV ωαρίων από διεγερμένους κύκλους ωρίμασαν αυθόρμητα *in vitro*, αν και ενεργοποιήθηκαν και διαμόρφωσαν έστω ένα προπυρήνα σε χαμηλότερο

ποσοστό από τα ωάρια που ωρίμασαν *in vivo* (Esrich *et al.*, 2002). Αυτή η μειωμένη ικανότητα των IVM ωαρίων έχει αποδοθεί σε ελαττωματική κυτταροπλασματική ωρίμανση, η οποία μπορεί να οφείλεται σε απώλεια των κατάλληλων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ή σε έλλειψη συγχρονισμού μεταξύ πυρηνικής και κυτταροπλασματικής ωρίμανσης (Jones *et al.*, 2008). Τα ωάρια GV συνήθως καλλιεργούνται για 24 ώρες κάτω από διάφορες συνθήκες και φτάνουν στο στάδιο MII σε κάποιο άγνωστο σημείο κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, μετά το οποίο ενεργοποιούνται. Στη συνέχεια, η ενεργοποίηση των ωαρίων θα πραγματοποιηθεί σε διάφορα σημεία στο στάδιο MII (Kim *et al.*, 2000).

Η πρωτεϊνική σύνθεση χρειάζεται για τη διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) σε ανθρώπινα ωάρια γιατί το πρότυπο πρωτεϊνικής σύνθεσης διαφέρει πριν και μετά το GVBD. Μετά το GVBD, δεν ωριμάζουν όλα τα ωάρια, ούτε εξάγουν το πρώτο πολικό σωματίο. Η ικανότητα να υποβληθεί σε GVBD και να προχωρήσει από τη μετάφαση I στη μετάφαση II αποκτάται ξεχωριστά κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας *in vitro* (Kim *et al.*, 2000). Μερικά ανθρώπινα ωάρια υφίστανται GVBD όταν καλλιεργούνται *in vitro*, αλλά σταματούν την ανάπτυξη στο στάδιο της μετάφασης I (MI). Έτσι, η ικανότητα να υποβληθούν σε GVBD και η ικανότητα να προχωρήσουν μέσω της μετάφασης I στη μετάφαση II είναι ξεχωριστά γεγονότα και αποκτούνται διαδοχικά. Δεν είναι σαφές, ωστόσο, τι είναι αυτό που προκαλεί τα ωοκύτταρα να ολοκληρώσουν την ωρίμανση. Είναι ευρέως γνωστό ότι η κυτταροπλασματική ωρίμανση κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου είναι πολύ σημαντική προκειμένου να υποστηρίξει την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η πρωτεϊνική σύνθεση χρειάζεται για την πρόοδο των ωαρίων από το στάδιο του βλαστικού κυστιδίου στη μετάφαση II (Cha *et al.*, 1998).

Η αύξηση του παράγοντα προώθησης ωρίμανσης MPF και οι δραστηριότητες της πρωτεϊνικής κινάσης MARK μπορεί να είναι αναγκαία για την έναρξη της διάσπασης του GV και την εξέλιξη της μετάφασης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και της μειωτικής στάσης. Ο MPF εμφανίζει μια κυκλική δραστηριότητα που κορυφώνεται στη μετάφαση. Η μείωση στη δραστηριότητα του MPF και του MARK συμπέφτει με τη μετάφαση II και το σχηματισμό του προπυρήνα, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η διάσπαση του βλαστικού κυστιδίου και η ωρίμανση μπορεί να εξαρτάται από τη δημιουργία

αυτών των παραγόντων και την κυκλική τους δραστηριότητα (Kim *et al.*, 2000).

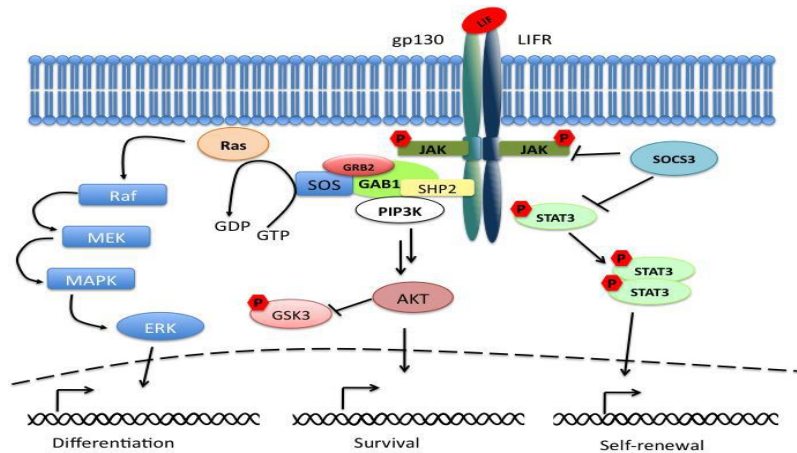
Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες πάνω στα GV ωάρια. Η Kim το 2000 εκτίμησε του κατά πόσο τα GV από διεγερμένους κύκλους μπορούν να ωριμάσουν, γονιμοποιηθούν και αναπτυχθούν *in vitro* ώστε να αποτελέσουν πηγή εμβρύων. Ο Escrich το 2010 μελέτησε τα βλαστικά κυστίδια GV με μορφολογική και μορφομετρική εξέταση και με συμπύκνωση της χρωματίνης, ενώ εκτίμησε την πυρηνική και κυτταροπλασματική τους ικανότητα. Επίσης, ο Goud το 1998 ερεύνησε την επίδραση της συμπλήρωσης του μέσου καλλιέργειας με γοναδοτροφίνες, οιστραδιόλη και επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) και την επίδραση της διατήρησης ή απομάκρυνσης των κοκκωδών κυττάρων στην πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση ωαρίων GV.

6. Ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF)

Ο ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας (LIF) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1986 από τον Metcalf και τους συνεργάτες του στο Walter και Eliza Hall Institute of Medical Research στη Μελβούρνη της Αυστραλίας. Ο LIF είναι μια πλειοτροπική κυτοκίνη της οικογένειας της ιντερλευκίνης-6, που σημαίνει ότι έχει επιδράσεις σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Είναι μία εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη με ένα εύρος μοριακού βάρους από 38 έως 67 kd, που προκύπτει από διαφορική γλυκοσυλίωση μιας πρωτεΐνης βάρους περίπου 20 kd (Hilton *et al.*, 1992). Ο LIF έχει τη δομή των τεσσάρων α-ελίκων των κυτοκινών που περιέχει έξι υπολείμματα κυστεΐνης, που είναι γνωστό ότι εμφανίζονται σε πολλούς αιμοποιητικούς παράγοντες (Lass *et al.*, 2001). Κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22q12 και περιλαμβάνει 3 εξώνια. 2 εσώνια και μια ασυνήθιστα μεγάλη (3,2 kb) 3'- μη μεταφρασμένη περιοχή (Sutherland *et al.*, 1989). Τα κύτταρα που εκφράζουν τους υποδοχείς του LIF περιλαμβάνουν νευρώνες, μεγακαρυοκύτταρα, μακροφάγα, λιποκύτταρα, ηπατοκύτταρα, οστεοβλάστες, μυοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα νεφρού και μαστού καθώς και καρκινικές

κυτταρικές σειρές που προέρχονται από αυτούς τους ιστούς (Hilton *et al.*, 1992). Κάθε θηλαστικό έχει το δικό του LIF και οι αλληλουχίες του ποντικού, του ανθρώπου, του προβάτου, του γουρουνιού και του ποντικού έχουν προσδιοριστεί (Wilson *et al.*, 2001). Είναι παρών στα κοκκώδη κύτταρα των αρχέγονων και λίγο μεταγενέστερων ωοθυλακίων, αλλά απουσιάζει από τα ωκύτταρα των αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων. Αντίθετα, ο LIF είναι παρών στα ωκύτταρα των μεταγενέστερων προκοιλοτικών και κοιλοτικών ωοθυλακίων (Eckert *et al.*, 1998).

Ο LIF δρα μέσω του συμπλόκου του υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας LIFR. Το σύμπλοκο του υποδοχέα του LIF περιλαμβάνει την αλυσίδα του υποδοχέα β (LIFR- β) και την αλυσίδα του υποδοχέα gp130. Ο LIFR- β δεσμεύει ειδικά τον LIF, αλλά με σχετικά χαμηλή συγγένεια. Μόνο όταν ο gp130 δεσμεύει τον LIF, με τον LIFR να είναι ήδη προσδεμένος, επάγεται μια διαμορφωτική αλλαγή που προκαλεί τον ετεροδιμερισμό του LIFR- β και του gp130, το οποίο δημιουργεί μια σύνδεση υψηλής συγγένειας μεταξύ υποδοχέα και συνδέτη. Ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των υποδοχέων που σχετίζονται με τις κινάσες Janus (JAKs), την φωσφορυλίωση των θέσεων σύνδεσης του υποδοχέα και τέλος την πρόσληψη της περιοχής Src ομολογίας-2 (SH2), που περιέχει πρωτεΐνες όπως η STAT3. Όταν τα μόρια της STAT3 συνδέονται με τον υποδοχέα, φωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπα τυροσίνης 705 (Tyr705) και διμερίζονται με άλλη φωσφορυλιωμένη STAT3. Τα διμερή ακολούθως, μετατοπίζονται προς τον πυρήνα σε ρυθμιζόμενο τρόπο, όπου συνδέονται με περιοχές ενίσχυσης των γονιδίων στόχων τους (Εικόνα 3). Αρνητική ρύθμιση του LIF ασκείται μέσω καταστολέων της σηματοδότησης κυτοκινών (SOCS), το οποίο ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι JAK/STAT3, του οποίου η έκφραση οδηγείται άμεσα από τη STAT3. (Aghajanova *et al.*, 2010). Παράλληλα με την ενεργοποίηση του μονοπατιού STAT3, η δέσμευση του LIF στον υποδοχέα LIFR β / gp130 οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και του μονοπατιού της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3 φωσφορικής κινάσης (PI3K) (Graf *et al.*, 2011).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση μονοπατιού LIF (Graf et al., 2011)

Ο LIF στην ανθρώπινη αναπαραγωγή

Παρόλο που οι παράγοντες που ρυθμίζουν την εμφύτευση της βλαστοκύστης έχουν πλήρως κατανοηθεί, μελέτες έχουν παρουσιάσει τον κρίσιμο ρόλο αυτοκρινών και παρακρινών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του CSF-1, της ιντερλευκίνης (IL)-1 και του LIF. Η επιτυχής εξέλιξη μιας εγκυμοσύνης βασίζεται σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των παραγόντων και άλλων πεπτιδίων ή στεροϊδών ορμονών, προκειμένου να συγχρονίσουν την προετοιμασία της μήτρας για εμφύτευση (Lass et al., 2001).

Το ωοθυλακικό υγρό παρέχει το περιβάλλον στο οποίο συμβαίνει η ωρίμανση του ωαρίου, επηρεάζοντας έτσι το δυναμικό των ωαρίων για γονιμοποίηση και ως εκ τούτου εμβρυϊκή ανάπτυξη (Arici et al., 1997). Οι συγκεντρώσεις του LIF είναι σημαντικά υψηλότερες σε προωοθυλακιόρρηκτα ωοθυλάκια απ' ό,τι σε αναπτυσσόμενα. Τα κοκκώδη κύτταρα από προωοθυλακιόρρηκτα ωοθυλάκια παράγουν σημαντικά περισσότερο LIF όταν τους χορηγείται hCG *in vitro*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η hCG διεγείρει την παραγωγή LIF (Coskun et al., 1998). Ακόμη, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του LIF στο ωοθυλακικό υγρό και την ποιότητα των εμβρύων (Arici et al., 1997).

Η επιτυχής εμφύτευση εξαρτάται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ της αναπτυσσόμενης βλαστοκύστης και του ενδομητρίου. Σε μετρήσεις που έγιναν καθ' όλη τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου βρέθηκε ότι τα επίπεδα του LIF ήταν σχετικά χαμηλά στην παραγωγική φάση, αυξάνονταν

μετά την ωορρηξία και παρέμεναν σε σχετικά υψηλά επίπεδα μέχρι το τέλος κάθε έμμηνου κύκλου, πριν από την πτώση στα αρχικά επίπεδα. Το mRNA του LIF ήταν ανιχνεύσιμο μετά την 20^η μέρα. Ο LIF είναι παρών στο μέγιστο στο ανθρώπινο ενδομήτριο όταν είναι να συμβεί η αναμενόμενη εμφύτευση, δείχνοντας τον παρακρινή ή αυτοκρινή ρόλο του στη λειτουργία του ενδομητρίου (Vogiagis *et al.*, 1996).

Ο Kojima το 1994 έδειξε ότι τα επίπεδα του LIF είναι υψηλά στο φθαρτό του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης, ενώ κατά την ίδια περίοδο στην τροφοβλάστη και τον πλακούντα τα επίπεδά του είναι ανιχνεύσιμα αλλά χαμηλά. Στη σάλπιγγα, τα επίπεδα του LIF είναι υψηλά στο τμήμα της ληκύθου, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να παίζει ένα ρόλο κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης (Keltz *et al.*, 1996).

Οι συγκεντρώσεις του LIF είναι μειωμένες σε γυναίκες με ανεξήγητη υπογονιμότητα, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας για την εμφύτευση. Ακόμη, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του ανάμεσα σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποβολές και σε αυτές με κανονική πρόοδο της εγκυμοσύνης (Laird *et al.*, 1997). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια απορρύθμιση στην παραγωγή του LIF στις υπογόνιμες γυναίκες, τόσο στην παραγωγική όσο και την εκκριτική φάση του έμμηνου κύκλου. Σε αντίθεση με τις γόνιμες γυναίκες, η πλειοψηφία των υπογόνιμων γυναικών δεν έδειξε αύξηση του LIF κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης σε συνδυασμό με μεγάλες διακυμάνσεις στην παραγωγή του κατά την παραγωγική φάση. Η δυσλειτουργία αυτή είναι πιο έντονη σε υπογόνιμες γυναίκες με πολλαπλές αποτυχίες εμφύτευσης, υποδεικνύοντας ότι η απορρύθμιση της παραγωγής του LIF στο ενδομήτριο μπορεί να είναι η αιτία της ανεξήγητης υπογονιμότητας και των πολλαπλών αποτυχιών εμφύτευσης (Hambartsoumian *et al.*, 1998).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF) στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων GV, τα οποία προέρχονταν από γυναίκες, στις οποίες έγινε πολλαπλή ωοθυλακική.

Η συλλογή των ωαρίων πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-14.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συλλογή ωαρίων

Για το πειραματικό μέρος ανώριμα ωάρια (GV και MI) συλλέχτηκαν από γυναίκες ηλικίας από 27 έως 38 ετών, οι οποίες υποβάλλονταν σε πρωτόκολλα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι ωοληψίες πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα Μάιος – Ιούνιος 2014. Στις γυναίκες αυτές γινόταν πολλαπλή ωοθυλακική διέγερση χορηγώντας ανασυνδυασμένη FSH, GnRH αγωνιστή καθώς και για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων χορηγούνταν hCG, 36 ώρες πριν την ωοληψία.

Αξίζει να επισημάνουμε ότι δόθηκε η έγγραφη συγκατάθεση των γυναικών για τη διάθεση των ανώριμων ωαρίων για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας.

2. Επιλογή και προετοιμασία του παράγοντα LIF

Το προϊόν που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Leukemia Inhibitory Factor Human, σε μορφή διαλύματος και καθαρότητας 95%, της εταιρίας Sigma-Aldrich, ανασυνδυασμένο και εκφραζόμενο στο *Escherichia coli*.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή διαλύσαμε τα συστατικά του φιαλιδίου 10μg LIF/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά άλατα (PBS) παρουσίας 1% (w/v) ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA), σε τελική συγκέντρωση όχι λιγότερο από 1 μg/ml.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του LIF για τη βελτίωση ανάπτυξης βλαστοκύστεων. Ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 5, 7.5, 10, και 20 ng/mL, παρατηρήθηκε πως η προσθήκη 10 ng/mL LIF προκαλούν μικρή αύξηση στο βαθμό σχηματισμού βλαστοκύστης, που όμως είναι μη σημαντική (Jurisicova *et al.*, 1995). Αυτή ήταν η συγκέντρωση του LIF που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη..

Σύμφωνα με τον τύπο $C_A V_A = C_T V_T$, όπου:

C_A = η συγκέντρωση του LIF στο διάλυμα

V_A = ο όγκος διαλύματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί

C_T = η επιθυμητή συγκέντρωση του LIF στη σταγόνα καλλιέργειας σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα

V_T = ο όγκος της σταγόνας καλλιέργειας,

βρήκαμε ότι η σταγόνα καλλιέργειας πρέπει να περιέχει 0,5 μl LIF και 49,5 μl καλλιεργητικού υλικού.

3. Προσθήκη LIF και παρακολούθηση των ωαρίων

Μετά την ωοληψία τα ληφθέντα ωάρια καθαρίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε 750 μl καλλιεργητικού υλικού για τη γονιμοποίηση για περίπου δυο ώρες σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (37°C και 5% CO₂). Στη συνέχεια με χρήση υαλουρονιδάσης και με τη μηχανική πίεση της πιπέτας έγινε η απογύμνωση των ωαρίων από τα κοκκώδη κύτταρα και ο έλεγχος αν πρόκειται για ώριμα (MII) ή ανώριμα ωάρια. Τα ανώριμα ωάρια διαχωρίστηκαν σε δυο κατηγορίες: εκείνα χωρίς πολικό σωματίο και χωρίς εμφανή πυρηνική δομή (MI) και εκείνα χωρίς πολικό σωματίο και με εμφανή

δομή βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle - GV). Τα ανώριμα ωάρια τοποθετήθηκαν σε σταγόνα καλλιεργητικού υλικού ποσότητας 50 μ l, η οποία περιείχε 49,5 μ l καλλιεργητικό μέσο για ανάπτυξη εμβρύων από τη γονιμοποίηση έως το στάδιο της βλαστοκύστης (Continuous Single Culture™ Complete της εταιρείας Irvine Scientific) και 0,5 μ l διαλύματος LIF 1 μ g/ml.

Σε μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης παρατηρήθηκε η επίδραση του LIF στην ωρίμανση των ωαρίων. Είναι γνωστό μέσω της χρήσης τεχνολογίας time-lapse ότι σε ανώριμα ωάρια τα οποία βρίσκονται σε καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό σε κατάλληλες συνθήκες γίνεται GVBD $6,4 \pm 0,4$ ώρες κατά μέσο όρο μετά την απομάκρυνση των κοκκωδών κυττάρων και εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου στις $20,7 \pm 0,5$ κατά μέσο όρο ώρες (Esrich *et al.*, 2012). Έγινε έλεγχος των ωαρίων τη στιγμή της προσθήκης του LIF και στη συνέχεια ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να παρατηρηθεί εάν η παρουσία του LIF έχει θετική ή αρνητική επίδραση στην ωρίμανση τους. Το ίδιο συνέβη και σε δείγματα – μάρτυρες (control) τα οποία είχαν τοποθετηθεί μόνο σε καλλιεργητικό μέσο.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) φαίνονται οι ώρες που παρατηρούνταν τα ωάρια μετά την προσθήκη του παράγοντα LIF. Ως ώρα μηδέν ορίζεται η πρώτη παρατήρηση και είναι τη στιγμή που τοποθετούνταν τα ωάρια στο καλλιεργητικό μέσο. Έπειτα, για τις υπόλοιπες παρατηρήσεις υπολογίζεται το διάστημα που μεσολάβησε από την ώρα 0.

Πίνακας 1: Χρονικά διαστήματα παρατηρήσεων μετά την προσθήκη του LIF

GV/MI + LIF	1	2	3	4	5	6	7	8
Ώρες παρατήρησης	0	+4	+8	+10	+18	+20	+22	+24

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά την πραγματοποίηση των ωοληψιών συλλέχτηκαν ανώριμα ωάρια από 7 διαφορετικές γυναίκες. Τα βασικά στοιχεία τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2). Στην παρένθεση του μέσου όρου των ηλικιών αναγράφεται ο μέσος όρος των περιστατικών από τα οποία πάρθηκαν μόνο GV ωάρια.

Πίνακας 2: Δημογραφικά στοιχεία των περιστατικών που μελετήθηκαν.

	1	2	3	4	5	6	7	Μέσος όρος
Ηλικία	34	27	35	37	38	27	36	33,4 (34,2)
BMI	-	18,59	22,31	24,35	24,35	18,59	-	21,63
Πρωτόκολλο	short	short	short	short	short	short	short	-
Ωάριο	GV	GV	GV	GV	GV	MI	MI	-

Μετά τη λήψη των ωαρίων, τοποθετήθηκαν σε σταγόνα καλλιεργητικού υλικού ποσότητας 50 μl, η οποία περιείχε 49,5 μl CSCC και 0,5μl LIF, με σκοπό να παρατηρηθεί αν ο LIF επηρεάζει την ωρίμανση τους. Ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν 5 δείγματα – control, τα οποία ωρίμασαν μόνα τους *in vitro* σε καλλιεργητικό υλικό χωρίς την προσθήκη κάποιου παράγοντα. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) καταγράφονται τα βασικά στοιχεία των γυναικών, τα ωάρια των οποίων χρησιμοποιήθηκαν ως control.

Πίνακας 3: Δημογραφικά στοιχεία των περιστατικών-control που μελετήθηκαν.

	1	2	3	4	5	Μέσος όρος
Ηλικία	33	37	37	27	36	34,6
BMI	34,02	23,44	23,44	17,72	19	23,52
Πρωτόκολλο	long	short	short	short	short	-
Ωάριο	GV	GV	GV	GV	GV	-

Στη συνέχεια, μετρήθηκαν οι ώρες που πέρασαν από τη στιγμή που προστέθηκε ο παράγοντας LIF στα GV ωάρια μέχρι αυτά να ωριμάσουν στο στάδιο της μετάφασης II (MII). Οι ώρες αυτές συγκρίθηκαν με τις ώρες που

χρειάστηκαν ώστε τα GV που χρησιμοποιήθηκαν ως control να ωριμάσουν επίσης σε MII. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4).

Πίνακας 4: Διάρκεια ωρίμανσης ωαρίων από GV σε MII (σε ώρες).

	1	2	3	4	5	Μέσος όρος
LIF	20,5	20,5	20,5	19	19	19,9
control	23	24	24	-	-	23,67

Μετά από t-test που πραγματοποιήθηκε, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$)/(P -value=0,0030) μεταξύ της διάρκειας που χρειάστηκαν τα ωάρια ώστε να ωριμάσουν από το στάδιο GV στο στάδιο MII, με και χωρίς παράγοντα. Είναι προφανές πως ο παράγοντας LIF προκαλεί γρηγορότερη ωρίμανση των GV ωαρίων σε MII σε σχέση με τα control.

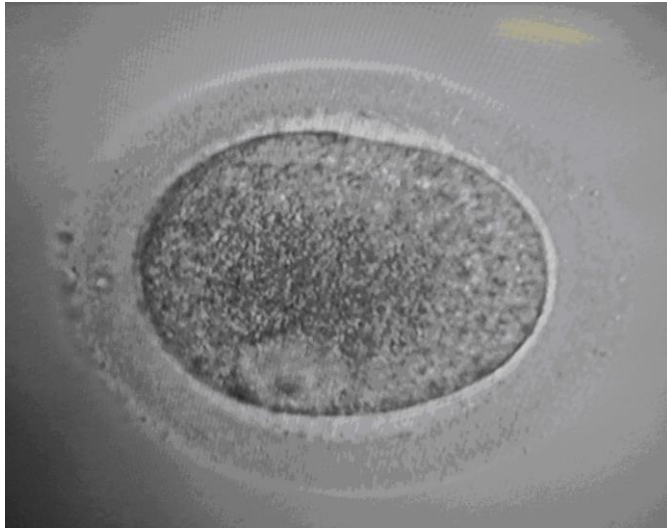
Ακόμη, τα ωάρια που συλλέχτηκαν στο στάδιο της μετάφασης I (MI) έφτασαν και αυτά στο στάδιο MII με την προσθήκη του παράγοντα LIF. Άρα, το ποσοστό επιτυχίας στην ωρίμανση των δειγμάτων ήταν 100%. Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό ωρίμανσης στα ωάρια – control ήταν 60%, καθώς κάποια από αυτά έφτασαν από GV μόνο μέχρι το στάδιο MI.

Στις παρακάτω εικόνες (4-6) παρουσιάζεται η ωρίμανση ενός ωαρίου από το στάδιο GV σε MI και MII αντίστοιχα με την προσθήκη του παράγοντα LIF.

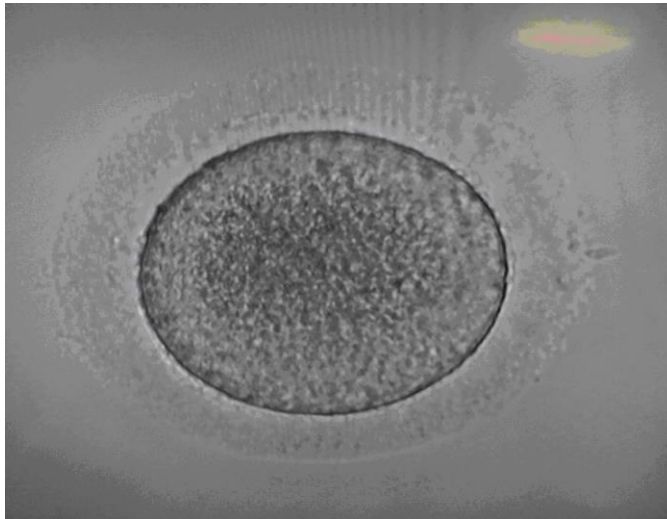
Στην εικόνα 4, φαίνεται ωάριο με ακανόνιστο σχήμα, σκουρόχρωμο κέντρο και κοκκώδες ωόπλοσμα, όπως και το βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle-GV), με το μεγάλο, εξωκεντρικό πυρηνίσκο του.

Στην εικόνα 5, το βλαστικό κυστίδιο έχει ήδη διασπαστεί και ο πυρηνίσκος του έχει εξαφανιστεί, ενώ το πολικό σωματίδιο δεν έχει σχηματιστεί.

Στην εικόνα 6, το ωάριο έχει πλήρως ωριμάσει και έχει εκβάλει το πολικό σωματίδιο.



Εικόνα 4: Ωάριο στο στάδιο GV



Εικόνα 5: Ωάριο στο στάδιο MI



Εικόνα 6: Ωάριο στο στάδιο MII

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η επίδραση του leukemia inhibitor factor (LIF) στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων. Ανώριμα ωάρια GV και MI που ανακτήθηκαν μετά από ωοληψίες τοποθετήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο με LIF. Διαπιστώθηκε 100% ωρίμανση στο στάδιο MII για όλα τα ωάρια, ενώ αυτά που ήταν στο στάδιο GV ωρίμασαν γρηγορότερα σε σχέση με τα ωάρια – control, σημειώνοντας στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$).

Η επίδραση του LIF στην *in vitro* ανάπτυξη ωαρίων έχει μελετηθεί ευρέως, αλλά τα αποτελέσματα είναι συχνά αντιφατικά. Πρόσφατη έρευνα σε ποντίκια συμφωνεί με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας, καθώς έδειξε πως η καλλιέργεια GV ωαρίων σε μέσο που περιείχε LIF βελτίωσε την πυρηνική ωρίμανση και αύξησε το ποσοστό κατάτμησης του βλαστικού κυστιδίου και μετάβασης στο στάδιο MII ήταν υψηλότερο από τα ωάρια – control (Mohammadi Roushandeh *et al.*, 2010). Ίδιο αποτέλεσμα είχε αντίστοιχη μελέτη που έγινε σε πρόβατα (Ptak *et al.*, 2006). Επίσης, ωοκύτταρα ποντικού ωριμάζουν καλύτερα με την επίδραση του LIF, αλλά και με τα ταυτόχρονη παρουσία FSH. Ο συνδυασμός και των δύο οδηγεί σε μεγαλύτερα ποσοστά ανάπτυξης εμβρύων και ζώντες γεννήσεις (De Matos *et al.*, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις παραπάνω έρευνες η καλλιέργεια των ωαρίων με LIF έγινε παρουσία των κοκκωδών κυττάρων τους που μπορεί να συνετέλεσε θετικά στην ωρίμανσή τους παρουσία του παράγοντα. Αυτό αποδεικνύεται σε μελέτη του Dang-Nguyen (2013), όπου εξετάστηκε η επίδραση ανασυνδυασμένου παράγοντα (pLIF) στην *in vitro* ωρίμανση ωαρίων χοίρων. Τρεις διαφορετικές ομάδες ωαρίων με τα κοκκώδη τους κύτταρα ωρίμασαν με pLIF, το οποίο προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο κατά τη διάρκεια των πρώτων 22 ωρών, των τελευταίων 22 ωρών ή και των 44, συνολικά, ωρών που διήρκησε η *in vitro* ωρίμανση. Τα ωοκύτταρα και των τριών ομάδων έδειξαν αυξημένους ρυθμούς πυρηνικής ωρίμανσης μέχρι το στάδιο της μετάφασης II (MII) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου χωρίς pLIF. Όταν τα κοκκώδη κύτταρα αφαιρέθηκαν στις 22 ώρες τα απογυμνωμένα ωάρια καλλιεργήθηκαν με pLIF, το οποίο όμως δεν έδειξε καμία επίδραση στο ρυθμό ωρίμανσης. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της

συγκεκριμένης εργασίας, όπου τα κοκκώδη κύτταρα όλων των ωαρίων είχαν απομακρυνθεί πριν την καλλιέργεια με τον παράγοντα LIF.

Ο μεγαλύτερος όγκος μελετών αφορά την επίδραση του LIF στην ωρίμανση βλαστοκύστεων και εμβρύων. Ο LIF αύξησε σημαντικά το σχηματισμό και την ποιότητα ανθρώπινων βλαστοκύστεων *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να παίζει ευεργετικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου *in vivo* σε αυτό το στάδιο (Dunglison *et al.*, 1996). Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρθηκαν για το πρόβατο (Fry *et al.*, 1992). Ακόμη, έχει αναφερθεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη εμβρύων ποντικού (Robertson *et al.*, 1991; Lavranos *et al.*, 1995; Kauma *et al.*, 1995) και βοοειδών (Fry *et al.*, 1992; Marquant-Le Guienne *et al.*, 1993; Fukui *et al.*, 1994).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχει πληθώρα μελετών που παρουσιάζει τη μηδαμινή επίδραση του LIF στην ωρίμανση ωαρίων και βλαστοκύστεων. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στο ποσοστό ωρίμανσης βλαστοκύστεων και ανάπτυξης εμβρύων ανάμεσα στην ομάδα που καλλιεργήθηκε με την προσθήκη LIF και την ομάδα ελέγχου (Jurisicova *et al.*, 1995; Plachot *et al.*, 1996; Haidari *et al.*, 2008). Επίσης, στατιστικά μη σημαντική διαφορά με την προσθήκη του παράγοντα, παρατηρήθηκε στην ωρίμανση ωαρίων προβάτων (Ptak *et al.*, 2005), αλλά και βλαστοκύστεων ποντικού (Fedorcsak *et al.*, 2003) και βοοειδών (Sirisathien *et al.*, 2003; Vejlsted *et al.*, 2005). Ακόμη, έχει αναφερθεί πως η συμπλήρωση με LIF στο μέσο καλλιέργειας δεν ενισχύει το σχηματισμό βλαστοκύστης, ωστόσο, έχει ευεργετική επίδραση στην ποιότητα της αναπτυσσόμενης βλαστοκύστης (Rungsiwiwut *et al.*, 2008).

Η παρατήρηση ότι ο LIF προωθεί την ωρίμανση, οδήγησε στην υπόθεση ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι LIF/STAT3 είναι λειτουργικό στα κοκκώδη κύτταρα και τα ωάρια και ότι ο LIF ενεργοποιεί την STAT3 πρωτεΐνη με τους υποδοχείς LIF. Εξέταση των προϊόντων μεταγραφής και των πρωτεϊνών των συστατικών του σηματοδοτικού μονοπατιού του LIF, αποκάλυψε ότι τα μόρια αυτά είναι παρόντα τόσο στα κοκκώδη κύτταρα όσο και στα ωάρια. Ακόμη, η ποσότητα της STAT3 είναι αυξημένη σε όλα τα ωάρια που υπόκεινται ωρίμανση *in vitro*, και ακόμη περισσότερο όταν στο καλλιεργητικό μέσο υπάρχει LIF, πράγμα που σημαίνει ότι η ενεργοποίηση της STAT3 είναι σημαντική για την ωρίμανση των ωαρίων και ότι η αύξηση

της από το LIF προκαλείται από την JAK κινάση στα ωκύτταρα. Ακόμη, επειδή ο LIF διεγείρει την ενεργοποίηση των μονοπατιών της πρωτεϊνικής κινάσης MARK, της κινάσης PI3K και της φωσφατάσης SHP2, θα μπορούσε να διερευνηθεί και ο δικός τους ρόλος στην ωρίμανση ωαρίων *in vitro* (Dang-Nguyen *et al.*, 2013).

Συμπερασματικά, σημειώνεται διάσταση απόψεων στο κατά πόσο η προσθήκη του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας (LIF) στο μέσο καλλιέργειας έχει οποιαδήποτε επίδραση στην ανάπτυξη αρχικά των ωαρίων και μετέπειτα βλαστοκύστεων και εμβρύων. Ο λόγος για αυτήν την διαφορά δεν είναι σαφής. Ωστόσο, η διαφορά στις δόσεις του LIF που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να είναι μια εξήγηση. Οι μελέτες που έδειξαν θετική επίδραση του LIF στο σχηματισμό βλαστοκύστης χρησιμοποίησαν σχετικά υψηλότερες δόσεις του LIF (Lavranos *et al.*, 1995; Marquant-Le Guienne *et al.*, 1993; Fry *et al.*, 1992), σε σύγκριση με τις μελέτες που δεν έδειξαν καμία επίδραση (Jurisicova *et al.*, 1995; Plachot *et al.*, 1996). Η διαφορά αυτή πρέπει να αποσαφηνιστεί. Εκτενέστερη έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και η, όσο το δυνατόν, χρήση ανθρώπινων ωαρίων θα διαλευκάνει την πραγματική επίδραση του LIF στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων, την εμβρυογένεση και την πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

Aghajanova L. 2004. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 1034:176–183.

Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones EE. 1997. Leukemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod* 12:1233–9.

Barnes FL, Crombie A, Gardner DK. 1995. Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction* 10:3243-3247.

Beall S, Brenner C, Segars J. 2010. Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs. *Fertil Steril*; 94(7):2507-13.

Bilodeau-Goeseels S, Magyara N. 2012. The Control of Meiotic Arrest and Resumption in Mammalian Oocytes. INTECH Open Access Publisher.

Buccione, R., Schroeder, A. C., and Eppig, J. J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43, 543–547.

Cha K-Y, Chian RC. 1998. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 4: 103-20.

Chen ZQ, Ming TX, Nielsen HI. 2010. Maturation arrest of human oocytes at germinal vesicle stage *J Hum Reprod Sci.* 3(3): 153–157.

Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. 2000. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

- Coskun S, Uzumcu M, Jaroudi K, Hollanders JMG, Parhar RS, Al-Sedairy ST. 1998. Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth. *Am J Reprod Immunol* 40:13–8.
- Dang-Nguyen TQ, Haraguchi S, Kikuchi K, Somfai T, Bodó S, Nagai T. 2013. Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Reprod Dev* 81(3):230-9.
- De Matos DG, Miller K, Scott R, Tran CA, Kagan D, Nataraja SG, Clark A, Palmer S. 2008. Leukemia inhibitory factor induces cumulus expansion in immature human and mouse oocytes and improves mouse two-cell rate and delivery rates when it is present during mouse in vitro oocyte maturation. *Fertil Steril* 90(6):2367-75.
- Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. 1996. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod.* 11(1):191-6.
- Eckert, J., Niemann, H. 1998. mRNA expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 957-965.
- Epigg, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829–838.
- Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A, Escribá MJ. 2012. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril.* 98(5):1147-51.

- Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escribá MJ. 2010. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril.* 15;93(8):2557-64.
- Fedorcsak P, Storeng R. 2003. Effect of leptin and leukemia inhibitory factor on preimplantation development and STAT3 signaling of mouse embryos in vitro. *Biol Reprod* 69:1531–8.
- Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. 1992. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of ovine embryos. *Biol Reprod* 46:470–474.
- Fry RC, Purdon TL, Squires TJ, Parr RA. 1992. The development of bovine embryos cultured in media containing hLIF. *Proc Aust Soc Reprod Biol* 24:92 abstr.
- Fukui Y, Matsuyama K. 1994. Development of bovine embryos matured and fertilized in vitro in media containing human leukemia inhibitory factor. *Theriogenology* 41: 199 abstr.
- Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. 1998. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Human Reproduction* 13(6):1638-44.
- Gougeon A. 1986 . Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1(2):81-87.
- Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates, facts and hypotheses. *Endocrine Rev* 17: 121-54.
- Graf U, Casanova E.A., Cinelli P. 2011. The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) — Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel).* 2(1): 280–297.

- Haidari K, Salehnia M, Rezazadeh Valojerdi M. 2008. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. *Fertil Steril* 90(6):2389-97.
- Hambartsoumian E. 1998. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 39:137–43.
- Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RM. 2000. In vitro maturation of oocytes. *Br Med Bull* 56(3):588-602.
- Heindryckx B, Lierman S, Combelles CM, Cuvelier CA, Gerris J, De Sutter. 2011. Aberrant spindle structures responsible for recurrent human metaphase I oocyte arrest with attempts to induce meiosis artificially. *Human Reproduction*, Vol.26, No.4 pp. 791–800.
- Hilton DJ. LIF: lots of interesting functions. 1992. *Trends Biochem Sci* 17:72–6.
- Hovatta O, Silye R, Abir R et al. 1997. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction* 12:1032-1036.
- Hovatta O, Wright C, Krausz T et al. 1999. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human Reproduction* 14:2519-2524.
- Jones KT. 2008. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 14(2):143-58.

- Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O. 2008. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod* 23:1138–44.
- Juengel, J. L., McNatty, K. P. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update* 11, 143–160.
- Juriscova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. 1995. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil Steril* 64:999 –1002.
- Kauma SW, Matt DW. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development in vitro. 1995. *J Assist Reprod Genet* 12:153– 6.
- Kim BK, Lee SC, Kim KJ, Han CH, Kim JH. 2000. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril* 74:1153–8.
- Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T. 1994. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 50:882–7.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N and Matzuk MM. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 15:201-204.
- Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. 1997. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod* 12:569–74.

- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. 1986. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol* 113:517-521.
- Lass A, Weiser W, Munafò A, Loumaye E. 2001. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril.* 76(6):1091-6.
- Latham, K. E., Wigglesworth, K., McMenamin, M., and Eppig, J. J. 2004. Stage-dependent effects of oocytes and growth differentiation factor 9 on mouse granulosa cell development: Advance programming and subsequent control of the transition from preantral secondary follicles to early antral tertiary follicles. *Biol. Reprod.* 70, 1253–1262.
- Lavranos TC, Rathjen PD, Seamark RF. 1995. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *J Reprod Fertil* 105:331– 8.
- Lee J, Yoon S, Bae I. 2004. Studies on Ca²⁺-channel distribution in maturation arrested mouse oocyte. *Mol Reprod Dev* 69:174–185.
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., and Eppig, J. J. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science* 296, 2178–2180.
- Messinis IE. 2006. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Upd.*12:557-571.
- Mohammadi Roushandeh A, Haji Hosseini H, Niknafs B, Halabian R, Mehdipour A, Habibi Roudkenar M. 2010. Effects of leukemia inhibitory factor on gp130 expression and rate of metaphase II development during in vitro maturation of mouse oocyte. *Iranian Biomedical Journal* 14 (3): 103-107.
- Oktem O, Urman B. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod.* 25(12):2944-2954.

- Orisaka M, Tajima K, Tsang BK and Kostuji F. 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovar Res.* 2:9.
- Pincus, G., and Enzmann, E. V. (1934). Can mammalian eggs undergo normal development in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20, 121–122.
- Plachot M, Godard A, Geenan V. 1996. Secretion of leukaemia inhibitory factor by human endometrium alone and in co-cultures with embryos. *Hum Reprod* 11(Suppl 1):185– 6.
- Prins G.S., Wagner, C. and Weidel, L. 1987. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil. Steril.*, 47, 1035–1037.
- Ptak G, Lopes F, Matsukawa K, Tischner M, Loi P. 2006. Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization in vitro via an influence on the oocyte. *Theriogenology* 65(9):1891-9.
- Richards JS, Panga SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Implic.* 120(4):963-972.
- Rizk B RBM, Garcia- Velasco JA, Sallam HN and Makrigiannakis A. 2008). *Infertility and Assisted Reproduction.* Cambridge university press. Chap 2. pp10-24.
- Robertson SA, Lavranos TC, Seamark RF. In vitro models of the maternal fetal interface. In: Wessmann T G, Nisbett-Brown E, Gill TJ (eds). 1991. *The Molecular and Cellular Immunobiology of the Maternal Fetal Interface.* Oxford University Press, New York, 191-206.
- Rungsiwiwut R, Rungarunlert S, Numchaisrika P, Pruksananonda K, Techakumphu M, Virutamasen P. 2008. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on the quality of in vitro produced mouse blastocysts and

subsequent derivation of embryonic stem (ES) cells. *J Med Assoc Thai.*; 91(5):608-14.

Russell JB. 1998. Immature oocyte retrieval combined with in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod*; 13 Suppl 3:63-70.

Smith GD. Control of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation. In: Wolf DP, Zelinski-Wooten M, editors. 2001. *Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals*. Totowa: Humana Press. pp. 53–65.

Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S. 2000. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 h. *Fertility and Sterility* 73:541-544.

Smitz JEJ, Cortvrindt RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reprod Reviews*. 123:185-202.

Song JL, Wong JL, Wessel GM. 2006. Oogenesis: single cell development and differentiation. *Dev Biol*. 300(1):385-405.

Sutherland GR, Baker E, Hyland VJ, Callen DF, Stahl J, Gough NM. 1989. The gene for human leukemia inhibitory factor (LIF) maps to 22q12. Department of Histopathology, Adelaide Children's Hospital, Australia. *Leukemia*, 3(1):9-13.

Telfer E, Webb R, Moor R, Gosden R. 1999. New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. *Antm Set* 68: 285-98.

Tingen C, Kim A and Woodruff TK. 2009. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod*. 15(12):795-803.

Trounson A, Anderiesz C, Jones G. 2001. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*. 121:51–75.

Tsuji K, Sowa M, Nakano R. 1985. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biology of Reproduction* 32, 413-417.

Vejlsted M, Avery B, Gjørret JO, Maddox-Hyttel P. 2005. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. *Mol Reprod Dev* 70:445–54.

Vogiagis D, Marsh MM, Frey RC, Salamonsen LA. 1996. Leukemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 148:95–102.

Wert SE, Larsen WJ. 1989. Meiotic resumption and gap junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complex. *Gamete Res* 22:143-162.

Ελληνόγλωσσα

Μεσσήνης ΙΕ. 2005. Επιτομή: Μαιευτική & Γυναικολογία. MD communications. Αθήνα. Κεφ 1-4. Σελ 15-50.