



Büyüme Faktörlerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkisi

Sibel BULGURCUOĞLU , Bilge ÖZSAIT , Erkut ATTAR

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD
Reproduktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Abstract

Growth Factors in Gametogenesis and Embryogenesis

Growth factors have a critical role in cell proliferation, regeneration and differentiation in gametogenesis, embryogenesis, puberty and other developmental stages of organisms. Growth factors synthesized at different embryogenic stages and by reproductive tract and ovarian cells acts with interacting cytokines and hormones. These molecules triggers intracellular signal pathways interacting with cell surface receptors and has direct or indirect a role in cellular process via otocrin, paracrine and endocrine mechanisms. Recent studies have shown that *in vitro*embriyo development and survival is lower when compared with *in vivosystems* which may be caused by the poor *in vitro* conditions. To overcome these problems and improve the success rates of IVF-ET treatments culture systems were supported with specific growth factors and significantly positive results were achieved. *In vitro*maturasyon and coculture studies in animals and human one or more factors or hormones added in *in vitro*condition and improvement were seen in oocyte and embriyo development which have important roles in infertility treatment. These factors which have complex control mechanisms take part in oocyte, preimplantation embriyo development and cell differentiation processes and should be studied in detail in order to describe the molecular mechanisms which lay behind.

Key words: gametogenesis, embryogenesis, growth factors, molecular mechanisms, IVF-ET

Özet

Organizmada gamet, embriyo oluşumu, puberte ve gelişimin diğer aşamalarında hücre proliferasyonu, rejenerasyon ve farklılaşma gibi temel olayların sürdürülmesinde büyüme faktörleri kritik öneme sahiptir. Overyen somatik hücreler, farklı embriyo gelişim aşamaları ve dışı üreme yollarında sentezi olan büyüme faktörleri reproduktif sistemde hormonlar ve sitokinlerle birlikte görev yapmaktadır. Spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak intrasellüler sinyal yollarını tetikleyen bu moleküller otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalarla direkt ya da indirekt olarak hücresel olayları gerçekleştirir. Günümüzde *in vitro*çalışmalara bakıldığında insan embriyolarının gelişimi ve ömrünün, *in vivo*ya göre ortamın yetersizliğine bağlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durumla ilgili olarak olumsuzluğu ortadan kaldırmak ve IV-ET tedavisinde başarıyı artırmak amacı ile *in vitro*kültür ortamlarına spesifik büyüme faktörlerinin eklenmesi yoluna gidilmiş ve önemli ölçüde olumlu ilerlemeler kaydedilmiştir. Gerek hayvan gerekse insanlarda yapılan *in vitro*matürasyon ve "coculture" çalışmalarında *in vitro*ortama eklenen bir ya da birden fazla büyüme faktörü ve hormonun özellikle oosit ve embriyo matürasyonunu ve gelişimini olumlu yönde etkilediği, bunun da infertilite açısından önem taşıdığı bilinmektedir. Karmaşık bir işleyiş yapısına sahip olan ve oosit, preimplantasyon embriyo gelişimi, farklılaşma gibi süreçlerde etki gösteren bu moleküllerin yapısı ve fonksiyonunun anlaşılması için detaylı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: gametogenez, embriyogenez, büyüme faktörleri, moleküler mekanizmalar, IVF-ET

I. Gametogenez

Canlı organizmalarda üreme süreci, anne ve babaya ait kromozomların birleşmesiyle kendi genetik özelliklerini kazanan *zigot* ile başlar. Oluşan diploid kromozoma sahip *zigot* formunun arka arkaya geçirdiği mitoz bölünmeler *embriyo* denilen ilk canlı taslağının oluşumu ile devam eder.

embriyonik gelişimin ilk aşamalarında, somatik ve germ hücre soyları birbirinden ayrılır. Germ hücreleri, embriyonik gelişim sırasında farklılaşmamış gonadlara göç ederek, mitoz ve mayoz bölünme süreçlerine girer. Germ hücrelerinin olgunlaşması ve kromozom sayılarının indirgenmesi sürecine dişilerde *oogenez*, erkeklerde ise *spermatogenez* adı verilir. Sonuç olarak, gelişimin devamlılığında mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri temel oluşturur (1).

Yazışma adresi: Dr. Erkut Attar

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Reproduktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, PK 30, Çapa 34272, İstanbul, Türkiye

Tel: +90-212-6352676

Faks: +90-212-6352675

E-posta:attar@superonline.com

Ökaryotik hücrelerde her hücre bölünmesi, DNA sentezinin olduğu ve yaklaşık 8 saat süren bir sentez fazıyla (S) başlar. Bunu yaklaşık 4 saat süren G₂ (G₂) fazı izler. Bu fazda kromozom yapısı diploiddir. Ardından yaklaşık 1 saat süren mitoz fazı (M) gelir. Bu fazda kromozomların görünür hale



geldiği profaz ve mitotik içiğin oluştuğu metafaz evreleri gerçekleşir. Bunu sürekli bir değişimin olduğu interfaz izler (G1). Bu evrelerin dışında her hücre tipinde görülmeyen ancak, üreme hücrelerinde izlenen G0 fazı vardır. Hücre siklusunun bütün fazları hücre-bölünme siklus genlerinin (cdc) bir grubu tarafından kodlanan özgün proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinler özellikle, G1'den S'ye ve G2'den M'ye geçiş sırasında etkindir (1,2).

Erkek üreme hücrelerinin oluştuğu spermatogenezin ilk hücresi, diploid kromozoma sahip *spermatogonium*'dur. Pubertenin başlangıcında spermatogonium, testislerdeki seminifer tübülde proliferasyon olarak, *spermatosit* oluşumuna doğru farklılaşır. Oluşan primer spermatositin mayoz bölünme geçirmesiyle iki adet *sekonder spermatosit* oluşur. Geçirilen 2. bir mayoz bölünme sonrasında da dört adet *spermatid* hücresi oluşur. Spermatid geçirdiği matürasyon aşamasından sonra *spermatozoa* halini alır. İnsanlarda birinci mayozun başlangıcından primer spermatosite kadar olan farklılaşma ve olgun spermatosit oluşumu yaklaşık altı hafta sürer. Bir spermatozoanın matürasyonu ancak dişi üreme kanallarında tamamlanabilmektedir (1).

Dişi üreme hücrelerinin oluştuğu oogenezi süreci, düzenlenmesi ve sonucu bakımından spermatogenezden farklıdır. İlk dişi üreme hücresi olan *oogonia* yumurtalıklarda tekrarlayan mitozlarla çoğalıp *primer oosite* dönüşür. Primer oosit, spermlerden farklı olarak etrafı folikül hücreleri ile çevrili olarak primordial folikül içinde gelişir. Oositin içinde bulunduğu bu ortam oositin büyüme ve gelişimi için gereken faktörleri içerir; ve aynı zamanda çevresinde bulunan bağ dokusuyla olan bağlantısını da gerçekleştirir. Folikül hücreleri daha sonra artarak granuloza hücreleri adını alır. Oositler büyüme ve gelişimlerini ovaryumlardaki bu foliküler ortamlarda tamamlayarak olgunlaşır. Olgunlaşan oositler döllenebilme ve embriyonik gelişime devam edebilme yeteneği kazanır. Primordial foliküllerde bulunan oositler birinci mayoz bölünmenin profazındaki diploten aşamasında durur. Ovilasyon oluncaya kadar, hücre siklusunun G0 olarak adlandırılan dinlenme aşamasında bekler. Diploten aşamasındaki oositlerin, büyüme ve gelişimleri sırasında mayozun yeniden tamamlanması için nükleer lokalizasyon ve hücre siklus regülatör proteinlerinde progresif artışlara ve bunu izleyen translasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlara gereksinim vardır (3-7). Matürasyon olarak adlandırılan bu aşama, hücrenin nükleer ve sitoplazmik bölümlerindeki değişimlerin tümünü kapsar. Oosit ancak bu aşamaları geçtikten sonra fertilizasyona hazır hale gelebilmektedir. Oositin nükleer matürasyonu esnasında mayoz yeniden başlar ve Metafaz II'ye geçiş olur (8). Bu sırada uzun süre foliküler süreç içerisinde bekleyen oositler hem mayozu yeniden başlatabilme yeteneği, hem de mayotik matürasyonu tamamlamayı sağlayacak protein ve RNA yükünü kazanırlar. Bu aşamadan önce preantral foliküllerde bekleyen oositler, mayozu yeniden başlatabilme yeteneğine sahip değildir. Ancak bu aşamadan sonra, henüz olgunlaşmamış oosit nükleusunun bozunması (germinal vezikülün dağılması) ile Metafaz I'i tamamlayarak Anafaza girişi yapar; ve Metafaz II'ye ulaşarak bu aşamada tekrar durur (9). Sitoplazmik matürasyonda ise; oositin fertili-

zasyon ve erken embriyo gelişimi (preimplantasyon) için hazırlanması ve mayotik ilerleme ile doğrudan ilgisi olmayan diğer matürasyon olayları gerçekleşir (10,11). Bu aşamada oositin sitoplazması ve organellerinin iç yapısında değişiklikler gerçekleşir (9).

Bu şekilde inhibitör bir folliküler ortamda bekleyen oositlerde, foliküllerdeki *in vivo* luteinizan hormon (LH) artışına bağlı olarak bir "pozitif sinyal" gelişir. Bu sinyal folliküler inhibisyonu ortadan kaldırarak, primer oositin sitoplazmasının asimetrik olarak bölünüp, farklı büyüklükte iki hücre oluşturmaya yol açar (12-14). Büyük olan *sekonder oosit* (Metafaz II), küçük olan ise *kutup cisimciği* (polar cisimcik) olarak adlandırılır. Bu haliyle oosit artık tam olarak fertilizasyon için hazır durumdadır. Fertilizasyon gerçekleştikten sonra embriyonun arka arkaya geçirdiği mitoz bölünmeleri devam eder ve ikinci *kutup cisimciği* atılır.

Oosit Gelişiminin Düzenlenmesi

Oosit gelişiminin düzenlenmesi ve kontrolü; hem lokal (parakrin) hem de over dışı (endokrin) faktörleri kapsayan kompleks bir süreçtir. Oosit gelişiminin düzenlenmesinde, hormonların yanı sıra (LH, FSH), büyüme faktörleri, sitokinler, inhibin/aktivin gibi faktörler de kritik önem taşır (15-17). Reprodüktif sistemde, hormonlar ve büyüme faktörleri yakın ilişki içerisinde. Büyüme faktörleri overlerde somatik hücreler tarafından, embriyonun değişik bölünme aşamaları da embriyo tarafından ve dişi üreme kanallarına ait hücreler tarafından sentezlenebilmektedirler (8,18-20).

Organizmada, tek bir yumurta hücresinden embriyo oluşumu ve puberte dahil gelişimin pek çok evresinde sürekli bir büyüme faktörü salımı mevcuttur. Bu faktörlere, hücre proliferasyonu, rejenerasyon ve farklılaşma gibi temel olaylarda ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre siklusunun M fazında, büyüme faktörleri ve sitokinler etki göstermektedir. Bununla birlikte diğer fazlarda da etkili olan faktörlerin varlığı da bilinmektedir. Son yıllarda G1 fazına girmiş hücrelerin pek çok seçeneğe sahip olduğu, örneğin oositte de olduğu gibi; uygun büyüme faktörlerinin varlığında G0 fazına girdikleri bildirilmektedir. Eğer bu aşamada büyüme faktörlerinin miktarı uygun değilse, bu hücreler diğer hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Buna ek olarak, G1 fazındaki hücrelerde programlanmış hücre ölümü de gerçekleşebilmektedir (21).

Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, genellikle 6-30 kDa büyüklüğünde geniş bir regülatör molekül grubudur. Bunlar özgün hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak intraselüler sinyal yollarını tetikler. Otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalarla etki gösterirler. Bu mekanizmaların harekete geçmesi çoğunlukla hücre bölünmesiyle sonuçlanır (22). Büyük bir aile olan bu moleküller de kendi içinde gruplara bölünmüştür. Reseptörleri intrinsik tirozin-kinaz aktivitesine sahiptir (23). Son yıllarda reseptörlerin bir bölümünün serin/treonin-kinaz aktivitesi gösterdiği de tespit edilmiştir (TGF-ailesi gibi) (24).



Büyüme faktörlerinin özellikle *in vitro* kültür şartlarındaki etkileri genel olarak saptanmıştır ancak, *in vivo* işleyişi hakkında bilinenler azdır. *In vivo* ortamda, stimülatör ve inhibitör etkilerinin olduğu bilinen bu moleküllerin, oosit ve embriyo gelişiminden, yara iyileşmesi, kemik rejenerasyonu, anjiyogenezin de olduğu birçok konuyla olan ilişkisine tam olarak açıklık getirilememiştir (22). Karmaşık bir işleyiş ve geniş alt gruplara sahip büyüme faktörlerinin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkileri, daha önceki yıllarda ve günümüzde pek çok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmalar; hem oosit ve embriyo gelişiminin anlaşılması, hem de büyüme faktörlerinin fonksiyon ve işleyişinin açıklanması bakımından yol gösterici olmuştur. Oosit ve erken embriyo gelişimiyle ilgili olarak üzerinde durulanlar; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- α), insülin büyüme faktörü (IGF-I, II), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), büyüme farklılaşma faktörü (GFG-9) şeklinde sıralanır.

Epidermal Büyüme Faktörleri (EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF); 6 kDa ağırlığında bir peptid olup, mitojenik bir potansiyele sahiptir. Hücrelerin çoğunda proliferasyonu uyarır. EGF, proteolitik bir bölünme ürünü olan 128 kDa ağırlığında tirozin kinaz aktivitesi gösteren, bir hücre-yüzey reseptörü ile işlev görmektedir. Bu reseptör aynı zamanda TGF- β 'nin mitojenik etkisinde de görev yapar (25).

Fare preimplantasyon embriyolarında yapılan bir çalışmada; maternal orijinli EGF'nin blastosistin tüm hücrelerinde, embriyonik EGF'nin ise sadece iç hücre kütlesi (inner cell mass- ICM) ve trofoektoderm hücrelerde olduğu saptanmıştır (26).

Büyüme faktörlerinin *in vivo* etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi, *in vitro* kültür çalışmalarıyla mümkün olmuştur. Oosit inhibitör ortamdan çıkarılıp, *in vitro* ortama konulduğunda, kendiliğinden tam olmayan bir şekilde germinal vezikülün dağılmasına kadar olgunlaşabilmektedir (27). Bununla birlikte, *in vitro* olarak kendiliğinden gelişen oositlerin, *in vivo* gelişenlere göre polar cisimcik oluşturma, dölleme ve gebelik oranlarının daha düşük olduğu gözlenmiştir (28,29). Bu olayların oluşabilmesi için gerekli olan sitoplazmik matürasyon, *in vitro* gelişen oositlerde yetersiz kalabilmektedir (30,31). Buradan yola çıkarak, *in vitro* gelişen oositlerin sitoplazmik matürasyonu için pozitif bir sinyalin gerekli olduğu düşünülmüş ve bunun için EGF kullanımı denenmiştir. EGF'nin folikül ve kümülüs hücreleriyle çevrelenmiş fare oositlerinde, germinal vezikülün dağılması sürecini stimüle ettiği gösterilmiştir (13,32). Bununla birlikte EGF, peptid kalıntılarının fosforilasyonu ve sitoplazmik olgunlaşma için gerekli olan kinaz aktivasyonunu da uyarmaktadır. Tüm bunlar *in vitro* ortama eklenen EGF'nin, *in vivo* LH tarafından indüklenen pozitif sinyali taklit ettiğini göstermektedir (14). Sonuç olarak; tirozin-kinaz aktivasyonu ile oosit matürasyonunu kontrol etmede fizyolojik bir öneme sahiptir (35).

Yapılan bir araştırmada, oosit kümülüs hücreleri ile birlikte ve kümülüs hücreleri olmadan *in vitro* kültüre edilmiş ve bunlardan kümülüs hücresi ile birlikte kültüre edilen oositlerde I. kutup cisimciğinin oluşumu gözlenmiştir (14). Bu durumun kümülüs hücrelerindeki aktif EGF salgılaması ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca granüloza ve kümülüs hücrelerinin, EGF ile birlikte diğer büyüme faktörlerini salgıladığı ve bunların da oosit gelişimi için gerekli sinyaller olduğu da bilinmektedir (31,36).

Kutup cisimciğinin oluşması ve Metafaz II'de bekleme süreci için sitoplazmik matürasyon şarttır. Yeterli sitoplazmik olgunlaşma, peptid kalıntılarının fosforilasyonu, gen ekspresyonu ve transkripsiyon için kalsiyuma bağlı kinaz aktivasyonu gereklidir. Bir oositin ilk kutup cisimciği oluştuğunda, fertilizasyon ve preimplantasyon gelişimi için gerekli tüm ribonükleik asit transkriptlerini de içeriyor durumdadır (36). Buna göre sitoplazmik matürasyonun durumunu tayin etmek için I. kutup cisimciğinin oluşumunu izlemek önemlidir. EGF'nin tirozin-kinaz fosforilasyonu, kalsiyuma bağlı tirozin-kinaz aktivasyonu ile gerçekleşir. Sonuç olarak yapılan insan ve hayvan deneylerinde; EGF'nin sitoplazmik ve nükleer matürasyon üzerine doğrudan pozitif etki yaptığı gösterilmiştir (14). Bu bulgular; IVF veya cerrahi olarak elde edilmiş, matür olmayan germinal vezikül oositlerinin *in vitro* gelişimi için EGF'nin kullanılmasının uygun olabileceği yönünde klinik önem taşımaktadır. Bu şekilde immatür oositlerin matür hale getirilmesi; ovülasyon indüksiyonunun getirdiği maliyet, komplikasyon ve zahmetten kaçınılması da mümkün olabilmektedir.

Reproduktif kanal veya preimplantasyon embriyo kaynaklı EGF gibi birçok büyüme faktörü embriyonik gelişimi otokrin/parakrin yollarla etkilemektedir (37). Bununla birlikte, EGF oositte foliküler gelişimi sağlarken, embriyoda da blastosist başına düşen hücre sayısını artırarak mitojenik etki ve farklılaştırma etkisi de gösterebilmektedir (38,39).

Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- α , β)

Önemli büyüme faktörlerinden biri olan TGF, kendi aralarında alt gruplara ayrılmış geniş bir ailedir (TGF- α , β). TGF- β ; EGF ile aynı reseptörle reaksiyona giren 50 amino asitli bir peptiddir. Erken embriyo gelişiminde etkilidir (40).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, fertilize olmuş oositte, blastosiste maternal kaynaklı transkriptler olarak TGF- β ve ancak fertilizasyondan sonra ise TGF- α 'nın varlığı belirlenmiştir (26). Bu faktörlerin genel olarak memeli embriyolarının büyüme ve farklılaşmasında etkisi vardır. Preimplantasyon evredeki fare embriyolarında, bunların bir grubuna ait mRNA'lar tespit edilmiş ve ayrıca tekli yerine grup halinde yapılan fare embriyo kültürlerinde müşterek bir ilişkinin olduğu gözlenmiştir (37). Tekli embriyo kültüründe bu ilişkiler TGF- β ya da EGF'nin eklenmesiyle artma göstermiştir (41).

Yine insan *in vitro* kültürlerinde, TGF- β ve IGF-II üretiminin özellikle fertilizasyondan 5 gün sonra yani moruladan blastosiste geçiş sırasında çarpıcı şekilde olduğu ortaya konulmuştur (41).



TGF- β ; 112 amino asitten oluşan aynı büyüklükte iki alt ünite içeren 25 kDa ağırlığındaki peptidlerdir (42,43). Bu grubun üyelerinin reseptörleri diğerlerinden farklı olarak serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir ve bu nedenle sinyal transdüksiyonunu farklı etkiler. Çeşitli hücrelerde; hücreyel göç, proliferasyon ve farklılaşma stimülasyonu ile birlikte inhibisyonunu da gerçekleştirebilen multifonksiyonel bir peptiddir. Ekstraselüler matriks formasyonu ve hücre yüzey moleküllerinin oluşmasında görev alır (44). İnhibin ve “müllerian inhibiting substance” gibi büyüme üzerine inhibitör etki göstermektedir (41). Memeli ovaryumlarında, TGF- β 'nın bilinen 5 formundan 3'ünün (TGF- β 1, - 2, - 3) mRNA'ları saptanmıştır (45). İntraovarian regülatör proteinler olarak TGF- β 'ların potansiyel rolleri vardır. Thompson ve arkadaşları, teka ile interstitial hücrelerde *in vivo* TGF- β 1'in lokalizasyonunu bulmuşlar fakat granülosa hücrelerinde tespit edememişlerdir (46).

TGF- β ve TGF- β 'nın anjiyogenik etkilerinin olduğu da bilinmektedir (47). Bu faktörlerin uterus kapillerlerinde yüksek oranda bulunması blastosist implantasyonuna zıt etki yapmaktadır (48). TGF- β , embriyo uterus kavitesine ulaştığında önemli miktarda üretilerek, desidualizasyonu stimüle eder (41). Blastosist oluşumunda TGF- β 1, epitel hücre tabakalarında “tight junction”ların kurulması ve trofoektoderm hücrelerinin embriyonik farklılaşmasında da etki gösterir (49). Blastosist oluşumu ve ilerlemesi için, spesifik büyüme faktörlerinden daha çok, bu faktörlerin kombinasyonuna ihtiyaç duyulur. Yine EGF ile birlikte “zona hatching” oranını artırabilmesi de, bu büyüme faktörünün trofoektoderm hücrelerinde plazminojen etki göstermesiyle mümkün olabilmektedir (50). Ayrıca TGF- β 1 ve reseptörleri preimplantasyon sürecinde embriyo ile reproduktif kanal arasındaki etkileşimde rol oynar (51).

Ayrıca TGF- β testiste, sertoli hücre üretimi ve spermatogonial büyümede de etkilidir. Testis fonksiyonunun sürekliliğinde büyüme inhibisyonu önem taşır. Bu nedenle büyüme inhibitörlerinin varlığı testis fonksiyonunun kontrolü için gereklidir. Multifonksiyonel regülatör bir molekül olan TGF- β 1, EGF ile birlikte indüklenmiş hücre proliferasyonunu inhibe ederek etki gösterir. TGF- β yine testiste hücre farklılaşmasının ilerlemesi, ekstraselüler matriks üretiminin stimülasyonu ve kemotaksisin ilerlemesini de sağlar (52).

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-I, II)

İnsan *in vitro* fertilizasyon (IVF) çalışmaları yaklaşık 20 yıldır sürmektedir. IVF başarısızlıklarının en önemli nedeni olarak, implantasyondan önceki embriyo gelişiminin durması (arrest) gösterilmektedir. Bu noktadan yola çıkılarak, kültür ortamlarının embriyo gelişim sürecine uygun şekilde modifiye edilerek kullanılması yaygınlaşmıştır. Pek çok memeli türünde suboptimal kültür şartlarının gelişimsel durmaya yol açtığı gözlenmiştir (53).

Maternal ve embriyo kaynaklı büyüme faktörlerinin, *in vivo* preimplantasyonel gelişimi düzenlediği, çok sayıda hayvan

çalışmalarıyla da desteklenmektedir (54). Yine bu çalışmalarda insülin ve insülin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF-I, II) yer aldığı bilinmektedir. IGF ailesi; insülin, IGF-I, II ligandları, IGF-IR, IIR diye bilinen insülin reseptörlerinden ve en az 10 adet olan IGF-bağlayıcı proteinden oluşmaktadır (55,56).

Küçük bir peptid olan insülin, mitojenik etkiye sahip olmakla birlikte, primer olarak glukoz transportunu yürütmektedir. İnsan ve hayvan çalışmalarında IGF ailesinin üyelerinin, oositte, embriyonun erken aşamalarında, dişi üreme kanalındaki sıvıda, epitel hücrelerinde ve endometriyumda eksprese olduğu gösterilmiştir. Temel olarak çeşitli hücre tiplerinde, hücreyel mayoz ve farklılaşmayla ilgisi bulunan IGF-I, II 7 kDa ağırlığındadır (41,57-59).

Daha önce de belirttiğimiz gibi büyüme faktörleri genel olarak overyen fonksiyonun düzenlenmesinden sorumludur (60). İntraoveryen IGF sistemi, doğal folikülün gelişiminin sağlanması, integrasyonu ve dominant folikülün seleksiyonunda etkilidir (61). Pawshe ve arkadaşları su bufalolarında yaptıkları bir çalışmada; IGF-I'in granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve oositlerin matürasyonuna etki ettiğini belirtmişler ve IGF-I varlığında matür hale getirilen oositlerin bölünme oranlarında ve blastosiste gelişimlerinde önemli bir artış olduğunu saptamışlardır (62). Bu ve bunun gibi uygulamalarla memelilerde; IGF'lerin preimplantasyon embriyo gelişiminde anahtar bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (63). Büyüme faktörü ligad ve reseptör genleri, embriyonik genom aktivasyonundan önce ve sonra farklı eksprese edilir. Bununla birlikte preimplantasyon, embriyo gelişiminin çeşitli aşamalarında da değişik etki gösterir. IGF-I ve II embriyogenezin erken aşamalarında izlenirken, insülinin sekiz hücreli kompakt fare embriyolarında, blastosistlerde ve ekspande blastosistte protein sentezini uyardığı saptanmıştır (64-66).

In vitro insan embriyo kültürlerinde daha önce de belirttiğimiz gibi, TGF ve IGF-II aktivitesine ait ilk bulgular fertilizasyondan sonra moruladan blastosiste geçiş sırasında yoğun bir şekilde belirlenmiş ve sekizinci günde de iyice arttığı gözlenmiştir (41). Ve yine insülinin de bu geçiş aşamasında RNA ve DNA'yı stimüle ettiği gösterilmiştir (67,68).

Birçok memeli türünde maternal çevreden bağımsız olarak sürdürülen *in vitro* embriyo gelişimi için, ovidukt hücreleri ile “cocultür” yapılmış ve blastosist gelişim oranında önemli bir artış tespit edilmiştir (69). Su bufalolarında yapılan çalışmada, preimplantasyon aşamasındaki embriyolarda IGF-I reseptörünün varlığında ovidukt epitel hücrelerinde IGF-I ekspresyonunun parakrin mekanizmayla etki gösterdiği tespit edilmiştir (58). Ayrıca insan ve sıçanda yapılan çalışmalarda da preimplantasyon embriyo sırasında IGF transkriptleri tespit edilememişken, ovidukt ve uterus ta gözlenmiştir (70,71). Yine IGF-II ve insülin fertilize olmamış oositlerde maternal transkriptler olarak izlenmiş, fakat 2-4 hücreli embriyoda maternal mRNA harap olduğundan belirlenememiştir (72). Daha sonra sekiz hücreli aşamada zigotik transkriptler olarak yeniden sentezlendikleri bilinmektedir (58). *In vitro* embriyo kültürlerine IGF ve in-



sülin eklenmesi dikkat çekici şekilde gelişimi artırmaktadır (73). Blastosist kültürlerinde IGF-I'in etkisi, trofoektoderm ve ICM hücrelerinin sayısını belirgin olarak artırmak şeklindedir (74). Gardner ve Kaye farelerde yaptığı çalışmalarda benzer bulgular elde etmişlerdir (75). Farelerdeki gen mutasyon çalışmalarında IGF ailesinin gelişimsel önemi vurgulanmaya çalışılmış ve bununla ilgili olarak IGF-I, II ve IR genlerinin olmadığı "knockout" farelerde, neonatal letalite ile birlikte düşük doğum ağırlıkları saptanmıştır (76,77). IGF'ler tüm embriyonik ve neonatal dokularda eksprese edildiğinden fetal bir büyüme faktörü olarak da anılmaktadır.

IGF'ler aynı zamanda insan endometriyumunda da eksprese edildiğinden, hücre bölünmesi, farklılaşma ve endometriyum-trofoblast hücre ilişkileri, erken gebelik oluşumunda da etkili olabilmektedir (78).

IGF ailesinden IGF-I, tüm testis dokusunda tanımlanmış ve kendisinin sertoli hücrelerinde, reseptörlerinin ise leydig, sertoli ve germinal hücrelerde üretildiği gözlenmiştir (79-81). IGF leydig hücre steroidogenezini ve sertoli hücre transferin üretimini artırarak, hücre fonksiyonunu uyarmaktadır (82,83).

Genel olarak fare ve insan preimplantasyon embriyo gelişiminin düzenlenmesinde, embriyonik kaynaklı IGF-II ve maternal kaynaklı insülin ile IGF-I rol oynamaktadır (84). Sonuç olarak diyebiliriz ki; embriyonik gelişimin çeşitli safhalarında insülin, IGF-I, IGF-II ve reseptörleri selektif olarak eksprese edilmekte ve bunlar preimplantasyon embriyo gelişimi için kritik önem taşımaktadır.

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Büyüme faktörlerinden FGF ailesinin en az 14 farklı üyesi vardır. FGF'lerin orijinal karakterini taşıyan 2 türü önem taşımaktadır: FGF1 (asidik FGF, aFGF) ve FGF2 (bazik FGF, bFGF). İntrinsik tirozin kinaz aktivitesi gösteren 4 farklı reseptöre sahiptir (FGF R1-4). FGF özellikle iskelet ve sinir sistemi gelişimi için esas olan bir büyüme faktörüdür. bFGF ile birlikte, büyüme farklılaşma faktörü (GDF), insan oositlerinin matürasyonu ve embriyonik gelişimden sorumludur (85).

bFGF, mezodermal orijinli hücreler için mitojenik özellik taşıyan geniş bir grubu kapsar. Ve memeli overyen fonksiyonunun parakrin bir regülatörü olarak gösterilir (86). Overyen fonksiyondaki bFGF'nin potansiyel rolü; overyen gelişimin regülasyonu, anjiyogenezin kontrolü ve foliküler gelişim sırasında granüloza hücrelerinin proliferasyonu, ovülasyon ile birlikte olan plazminojen aktivatör aktivitesinin düzenlenmesi ve erken korpus luteum gelişiminin sağlanması şeklindedir (87,88). İnsan oositlerinde bFGF mRNA'sının ekspresyonu granüloza ve kümülüs hücrelerinde saptanmıştır (89). Bununla birlikte erken foliküler aşamada oosit tarafından üretilmekte ve temel olarak primordial folikül gelişimini düzenlemektedir (90).

Bununla birlikte erkekte gonadal fonksiyonun düzenlenmesinde de bFGF lokal etki gösterir (84,91). Yapılan immatür domuz sertoli hücre çalışmalarında bFGF'nin mitojenik etki gösterdiği de saptanmıştır (92,93).

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF, A ve B olmak üzere disülfid bağlarıyla bağlanmış 2 alt üniteden oluşmuş, 30 kDa ağırlığında bir proteindir (94). Alt üniteleri homodimer ve heterodimerlerden oluşmuştur. PDGF'ye ait PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB olmak üzere 3 homodimer formu mevcuttur. Bu izoformlarda a ve b diye adlandırılan ve intrinsik kinaz aktivitesi gösteren 2 farklı reseptöre bağlanmaktadır (95).

Farelerdeki preimplantasyon ve postimplantasyon embriyolarında RT-PCR ve "ribonükleaz-protection metodları" ile, PDGF-A zinciri ile PDGF-a alt ünite reseptörlerinin ekspresyonu gösterilmiştir (26). Ve yine farelerde yapılan bir *in vitro* çalışmada, 2 hücreli bir embriyonun hücrelerinden birine endojen PDGF geni de baskılanmış durumda iken mutant PDGF geni enjekte edilmiş ve enjeksiyonun yapılmadığı diğer hücre ile karşılaştırıldığında mutant alıcıda daha ileri olan hücre bölünmelerinde belirgin bir azalma saptanmıştır. Enjeksiyonun yapılmadığı hücrelerde ise blastosiste ulaşılmıştır (96). Bu bulgular bize PDGF'nin erken fare embriyolarında otokrin mekanizmalar yoluyla hücre bölünmelerini ilerlettiğini göstermektedir.

PDGF-A ve TGF-a fertilize, fertilize olmamış ovüle oosit ve blastosiste maternal transkripler olarak tespit edilmiştir. PDGF-A transkriplerinin artışı, zamana bağlı şekilde ortaya çıkar. Maternal transkriptler ilk olarak fertilize olmamış ovüle oositte saptanmış, daha sonra 2-8 hücre aşamasında gözden kaybolmuş ve erken kavitasyon aşamasında (32-64 hücre) tekrar gözlenmiştir. PDGF-A ekspresyonundaki bu değişim, oosit ve blastosist arasındaki transkript sayılarının 10 kat fazla olduğu şeklindedir. Diğer büyüme faktörleri gibi PDGF'de memeli embriyogenezindeki büyüme farklılaşmasının kontrolünde rol oynayan genellikle maternal kaynaklı önemli bir proteindir (26).

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, mayotik bölünmenin yeniden olduğu sırada gözlenen, mikrovasküler değişikliklere neden olan ve granüloza hücreleri tarafından salınan pek çok anjiyogenik faktörden biridir (97,98). Folikül fonksiyonuyla ilgili olarak, sıvı (folikül sıvısı) biyokimyasında değişikliklere yol açtığı hem hücre, hem de kromozomal tabakalarda insan oositinin gelişim potansiyelini etkilediği bilinmektedir (99-103)

Fizyolojik şartlar altında LH ve HCG, granüloza hücrelerinden VEGF mRNA ekspresyonunu etkileyen stimülatörlerdir (104,105). Foliküler sıvı anjiyotensin faktörler bakımından zengin bir ortamdır. VEGF, TGF- β , anjiyotensin ve bFGF gibi anjiyogenik faktörler overyumlarında da bulunmuştur (98,106).



Doğrudan bir vasküler yapıya sahip olamayan oosit granüloza hücreleri ve foliküler sıvı arasındaki oksijen difüzyonu kararsız bir şekildedir. Oksijen difüzyonunun azaldığı VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin eksikliğinden de kaynaklanabilen yetersiz mikrosirkülasyon durumunda, pH azalmakta ve anaerobik ürünlerin oluşumu izlenmektedir. Bunun sonucunda oluşan asidemi tablosu ilk mayoz bölünmedeki kromozomların spindle büyüklüğünü ve oositlerde normal kromozom ayrılışını engeller (107-109). Bu durum özellikle yaşlı kadınlarda yoğun olarak kromozomların ayrılmaması (nondisjunction) şeklinde ortaya çıkmaktadır (110). Bu hipotez Van Blerkom tarafından da desteklenmiştir. Burada azalmış oksijen içeriğine sahip foliküllerden elde edilen oositlerde, kromozomal dağılım insidansında bir artış saptanmıştır (103). Yine hipoksiye bağlı olarak oosit-kümüllüs kompleksinde VEGF konsantrasyonunun yükseldiği ve buna bağlı olarak fertilizasyonun olumsuz etkilendiği de gözlenmiştir (111).

İlerlemiş yaşta HCG uygulamasına rağmen, VEGF ve diğer anjiyogenik faktörlerin yetersiz salındığı gözlenmiştir. Normalde mayozun yeniden başladığı periyotta folikül sıvısındaki VEGF konsantrasyonunda bir artış meydana gelmesi gerekirken, yaşlı kadınlarda hipoksik foliküler çevre oluşumu siktir (110).

Hipoksik foliküler ortama bağlı olarak, overyen kan akışının azalmış olduğu ve bunun sonucunda aneuploidilerin arttığı ileri yaştaki ve ovülasyon indüksiyonuna kötü cevap veren kadınlarda, folikül sıvısı VEGF insan oositlerinin ve erken preimplantasyon embriyo gelişiminin tanımlanabilmesi için kullanılabilir önemli bir marker olarak düşünülmektedir. Ayrıca endometriyozisli hastaların folikül sıvısında VEGF konsantrasyonu düşük bulunmuş ve zayıf oosit-embriyo kalitesi ile seyreden bu tip folikül içi değişimlerin infertiliteye neden olabileceği öne sürülmüş ve aynı zamanda bu embriyoların implante olma özelliğinin azaldığı saptanmıştır (112).

Büyüme Farklılaşma Büyüme Faktörü-9 (GDF-9)

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan büyüme faktörlerinden biri de GDF-9'dur. GDF-9, TGF- ailesinin bir üyesidir. Gerek farelerde gerekse insanlarda yapılan çalışmalarda, GDF-9, overyen folikülogenez için ihtiyaç duyulan önemli faktörlerdendir (20,112).

Farelerde yapılan çalışmalarda tek tabakalı primer foliküllerdeki oositin ovülasyon sırasında GDF-9 mRNA'sının sentezlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonucuna göre GDF-9 yetmezliğinin olduğu durumlarda tek tabakalı primer foliküler aşamadan sonraki ileri foliküler gelişim aşamasında belirgin bir bloğun olduğu ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olduğu saptanmıştır (114,115). Bu nedenle GDF-9 *in vivo* somatik hücre fonksiyonları için ihtiyaç duyulan ilk oosit kaynaklı faktör olarak gösterilmektedir (20). Yine bu görüş birçok çalışma ile desteklenmektedir. Bilindiği gibi primordial foliküllerden matür Graff folikü-

lünün gelişimi hipofizer gonodotropinler ve overyen faktörlerle kontrol edilmektedir. Overyen başarısızlıktan dolayı olan infertiliteye, overyen fonksiyon kusurları veya gonodotropin salımındaki disfonksiyonlar neden olmaktadır. Günümüzde insan ya da genetik olarak manipüle edilmiş hayvanlar kullanılarak overyen başarısızlığın ya da yetmezliğin sebepleri araştırılmış ve bu durumdan, gonadlarda salgılanan overyen fonksiyon için esansiyel olan ve aralarında GDF-9'un da olduğu spesifik genlere ait defektler sorumlu tutulmuştur (112,116-118).

Yine Zinn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ilginç olarak, overyen bozuklukların görüldüğü Turner Sendromlu hastaların oositlerinde GDF-9B/BMP-15 diye adlandırılan transkriptlerin eksprese olduğu ve bunların Turner Sendrom fenotipinde overyen bozukluklara yol açabileceği öne sürülmüştür (119).

Gerek maternal gerekse oosit ya da embriyo kaynaklı büyüme faktörleri, folikülogenezin ilk aşamalarından başlayarak oosit matürasyonu, fertilizasyon, erken embriyonal bölünmelerin takip ettiği preimplantasyonel gelişim ve implantasyon aşamalarında büyüme ve farklılaşmayı direkt ya da indirekt olarak etkileyen ve önemi kesinlikle göz ardı edilemeyen çok geniş ve karmaşık bir ailedir. Oosit ve embriyoda hücre bölünmesi, farklılaşması ve hatta ölümü peptid yapılı bu faktörler tarafından regüle edilmektedir. Ve artık spesifik büyüme faktörleri (TGF- gibi), preimplantasyon aşamasındaki embriyo için bir hayatta kalma faktörü olarak ifade edilmektedir (120). Oosit ve embriyo gelişimi üzerinde etkin potansiyelleri olan bu faktörlerin fonksiyonlarının ve işleyişinin anlaşılması çoğunlukla *in vitro* kültür modelleriyle mümkün olabilmektedir. Normalde *in vitro* kültürler, yardımcı üreme tekniklerinin temelini teşkil etmektedir. Ne var ki pek çok çalışmada *in vitro* insan embriyolarının gelişimi ve ömrü, kültür ortamındaki yetersizliklere bağlı olarak, *in vivo* embriyo gelişimi ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde düşük bulunmuştur. Bu noktadan yola çıkılarak gerek oosit, gerek embriyo, gerekse kültür ortamındaki eksiklikleri gidermek üzere büyüme faktörleri sıklıkla kullanılmış ve önemli ölçüde olumlu sonuçlar alınmıştır. Günümüzde oosit ve erken embriyo gelişimi veya matürasyonu için pek çok *in vitro* matürasyon ve "cocultur" sistemleri geliştirilmiştir. Spesifik infertilite nedenlerinden olan polikistik over sendromu ve prematür overyen yetmezlik durumlarından sorumlu olan immatür oositlerin, özel hormon ve büyüme faktörleri eklendiği *in vitro* matürasyon kültürlerinde oositlerin matür hale gelmesi sağlanarak implantasyon ve gebelik şanslarının artırıldığı birçok çalışma ile desteklenmiştir (121,122). Yine granüloza, tuba epitel hücreleri ve endometriyum stroma hücreleriyle yapılan embriyo "cocultur" çalışmalarında da preimplantasyon embriyo gelişimi ile ilgili olarak olumlu sonuçlar alınmıştır (123). Sonuç olarak; oosit ve preimplantasyon embriyo gelişimi ve farklılaşması üzerine ciddi şekilde etkili olan büyüme faktörlerinin tam olarak anlaşılıp, uygulamaya geçirilebilmesi için daha birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



Kaynaklar

1. Passarge E.: Colors atlas of genetics. Georg Thieme Verlag Stuttgart Newyork. Thieme Medical Publishers, Inc. Newyork (1995), page. 106-113
2. Drews U.: Colors atlas of embriyology. Georg Thieme Verlag Stuttgart Newyork. Thieme Medical Publishers, Inc. Newyork (1995), page. 6
3. Christmann L., Jung T., and Moor R.M.: MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1994, 38, p.p. 85-90
4. Chesnel F. and Eppig J.J.: Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol. Reprod. Dev.* 1995, 40, p.p.503-508
5. De Vantery C., Gavin A.C., Vasalli J.D., and Schorderet-Slatkine S.: An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev. Biol.* 1996, 174, p.p. 335-44
6. Mitra J., Schultz R.M.: Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin b1, cdc25c, and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J. Cell. Sci.* 1996, 109, p.p. 2407-15
7. De Vantery C., Stutz A., Vasalli J.D., and Schorderet-Slatkine S.: Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes in controlled at both translational and post translational levels. *Dev. Biol.* 1997, 187, p.p. 43-54
8. De La Fuente R., J.O'Brien M., Eppig J.J.: Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 1999, 14, p.p. 3060-3068
9. Rutherford A.J.: The practical aspects of in vitro maturation of human oocytes. *Fertility and Reproductive Medicine* 1998, p.p. 577-587
10. Eppig J.J., Schultz R.M., O'Brien M., and Chesnel F.: Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1994, 164, p.p. 1-9
11. Eppig J.J.: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8, p.p. 485-86
12. Eppig J.J., Downs S.M.: Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 1984, 30:1
13. Downs S.M., Daniel S.A.J., Eppig J.J.: Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zool.* 1988, p.p. 245-86
14. Das K., Stout L.E., Hensleigh H.C., Tagatz G.E., Phipps W.F., Leung B.S.: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertility and Sterility* 1991, vol.55, no.5, p.p. 1000-4
15. Salha O., Nugent D., Dada T., Kaufmann S., Levett S., Jenner L., Lui S., and Sharma V.: The relationship between follicular fluid aspirate volume and oocyte maturity in in-vitro fertilization cycles. *Human Reproduction* 1998, vol.123, no.17, p.p. 1901-6
16. Erickson G.F., and Danforth D.R.: Ovarian control of follicle development. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 1995, 172, p.p. 736-44
17. Erickson G.F.: Non-gonadotrophic regulation of ovarian function: growth hormone and IGFs. In Filicori M., and Flamigni C. (eds) *Ovulation induction: basic science and clinical advances. International Congress Series. Elsevier, Amsterdam* 1994, p.p. 73-84
18. Matsui Y., Toksoz D., Nishikawa S., Nishikawa S., Williams D, Zsebo K, Hogan B.L.: Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991, 353, p.p. 750-52
19. Eppig J.J.: *Seminars Dev. Biol.* 1994, 5, p.p. 51-59
20. Dong J., Albertini D.F., Nishimori K., Kumar T.R., Lu N., Matzuk M.M.: Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996, vol.383, 10 October, p.p. 531-35
21. King K.L., Cidlowski J.A.: Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell. Biochem.* 1995, 58, p.p. 175-80
22. Van Zoelen E.J.J.: Polypeptide growth factors and their role in regulating the cell cycle. *Molecular Biology in Reproductive Medicine (Fauser B.C.J.M), 1st ed., Parthenon published London-Newyork* 1999, p.p. 67-77
23. Ullrich A., Schlessinger J.: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990, 61, p.p. 203-12
24. Massague J., Weis-Garcia F: Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv.* 1996, 27, p.p. 41-64
25. Carpenter G.: Receptor for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56, p.p. 881-914
26. Rappolee D.A., Brenner C.A., Schultz R., Mark D., Werb Z.: Developmental expression of PDGF, TGF-a and TGF-b genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 1988, 241, p.p. 1823-25
27. Pincus G., Enzmann E.V.: The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* 1935, 62:665
28. Trounston A.O., Willadsen S.M., Rowson L.E.A.: Fertilization and developmental capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J. Reprod. Fertil* 1977, 51: 321
29. Leibfried M.L., Bavister B.D.: Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamsters. *J. Exp. Zool.* 1983, 226: 481
30. Schroeder A.C., Downs S.M., Eppig J.J.: Factors affecting the developmental capacity of mouse oocytes undergoing maturation in vitro. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1988, 541:197
31. First N.L., Leibfried-Rutledge M.L., Sirad M.A.: Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988, 267:1
32. Dekel N., Scherzly I.: Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* 1985, 116:406
33. Schultz R.M.: Role of protein phosphorylation in meiotic maturation of mouse oocytes oocytes in vitro. *Annu. NY. Acad. Sci.* 1988, 541: 219
34. Earp S., Huckle W., Marts S., Bishop W., Raymond V., Pech L., Mc Cune B.: The epidermal growth factor reseptor: control of synthesis and signalling function (Abstr.). Presented at the symposium on growth factor in reproduction, sponsored by Sero Symposia USA 1990, in the Final Program, p.3
35. Lorenzo PL, Liu IK, Illera JC, Picazo RA, Carneiro GF, Illera MJ, Conley AJ, Enders AC, Illera M.: Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine kinase pathway. *J. Physiol. Biochem.* 2001, Mar; 57 (2): 15-22
36. Staigmiller R.B., Moor R.M.: Effect of follicle cells on the maturation and development competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.* 1984, 9:221
37. Paria B.C. and Dey S.K.: Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, vol. 87, p.p. 4756-60
38. Carpenter G., Cohen S.: *Annu. Rev. Biochem.* 1979, 32, p.p. 193-216
39. Derynck R.: *J. Cell. Biochem.* 1986, 32, p.p. 293-304
40. Marquardt H., Rose T.M., Webb N.R., et. al: Rat transforming growth factor type I : structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 1984, 223, p.p. 1079-82
41. Hemmings R., Langlais J., Falcone T., Granger L., Miron P., Guyda H.: Human embryos produce transforming growth factors _ activity and insulin-like growth factor II. *Fertility and Sterility* 1992, vol. 58, no.1, p.p. 101-4
42. Sporn M.B., Roberts A.B., Wakefield L.M., Assoian R.K.: Transforming growth factor _: Biological function and chemical structure. *Science* 1986, 233, p.p. 532-40
43. Wakefield L.M., Smith D.L., Flanders K.C., Sporn M.B.: Latent transforming growth factor _ from human platelets. *J. Biol. Chem.* 1988 263, p.p. 7646-54
44. Roberts A.B., and Sporn M.B.: In *Handbook of Experimental Pharmacology*, (Sporn M.B. and Roberts A.B), Spriger- Heidelberg, in press 1990
45. Flanders K.C., Marascalco B.A., Roberts A.B. and Sporn M.B.: Transforming growth factor _: A multifunctional regulatory peptide with actions in the reproductive system. *Growth Factors in Reproduction (Schomber D.W.) Sero Symposia, USA Norwell, Massachusetts. Springer-Verlag* 1990, p.p. 23-37
46. Thompson N.L., Flanders K.C., Smit J.M., Ellingsworth L.R., Roberts A.B., Sporn M.B.: Expression of transforming growth factor _1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J. Cell. Biol.* 1989, 108, p.p. 661-9
47. Folkmann J. and Klagsbrun M.: *Science* 1987, 235, 442
48. Williams M.F.: *Am. J. Anat.* 1948, 83, 274
49. McLaren A., and Smith R: *Nature (London)* 1977, 267, p.p. 351-3
50. Galway A.B., Oikawa M., Ny T. and Hsueh A.J.W.: *Endocrinology* 1989, 120, p.p.126-135
51. Chow JF, Lee KF, Chan ST, Yeung WS.: Quantification of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) mRNA expression in mouse preimplantation embryos and determination of TGFbeta receptor (type I and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract. *Mol. Hum. Reprod.* 2001 Nov;7(11):1047-56



52. Roberts A.B., Sporn M.B.: Transforming growth factor α . *Adv. Cancer Res.* 1988, 51, p.p. 107-45
53. Bavister B.D.: Culture of preimplantation: facts and artifacts. *Hum. Reprod.* 1995 Update 3, p.p. 91-148
54. Kane M.T., Morgan P., and Coonan C.: Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum. Reprod.* 1997 Update 3, p.p. 137-157
55. Nissley P., Lopaczynski W.: Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors* 1990, 5, p.p. 29-36
56. Rosenfeld R.G., Lamson G., Pham H., Oh Y.-M., Conover C., Donovan S.M., Ocran I., Giudice L.C.: Insulin-like growth factor binding proteins. *Rec. Progr. Horm. Res.* 1990, 46, p.p. 99-163
57. Rotwein P.: Structure, evolution, expression and regulation of Insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991, 5, p.p. 3-18
58. Daliri M., Appa Rao K.B.C., Kaur G., Garg S., Patil S., and Totey S.M.: Expression of growth factor ligand and receptor genes in preimplantation stage water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos and oviduct epithelial cell. *J. Reprod. And Fertility* 1999, 117, p.p. 61-70
59. Lei Z.M., and Rao C.V.: Expression of epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands, EGF and transforming growth factor alpha, in human fallopian tubes. *Endocrinology* 1992, 131, p.p. 947-57
60. Adashi E.Y., Resnick C.E., D'Ercole J., Svaboda M.E., and VanWyk J.J.: Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cells. *Endocrinological Reviews* 1985, 6, p.p. 400-20
61. Adashi E.Y., Resnick C.E., Hernandez E.R., Hurwitz A., Roberts C.T., Lerioth D., Rosenfeld R.: Intraovarian IGF-I system. *Growth Factors In Reproduction (Schomberg D.W.) Sero Symposium USA Norwell, Massachusetts. Springer-Verlag* 1990, p.p. 91-101
62. Pawshe C.H., Appa Rao K.B.C., and Totey S.M.: Effect of insulin-like growth factor I and its interaction with gonadotrophins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus cells and granulosa cells in buffalo. *Molecular Reproduction and Development* 1998, 49, p.p. 277-85
63. Larson R.C., Ignatz G.G., and Currie W.B.: Transforming growth factor α and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Molecular Reproduction and Development* 1992, 33, p.p. 432-35
64. Engstrom W., Bell K.M., Schofield P.N.: Expression of insulin-like growth factor II gene in the developing chick limb. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1987, 11, p.p. 415-21
65. Beck F., Samani N.V., Penschow V.D., Thorley B., Tregear G.W., Cochlan V.P.: Histochemical localization of IGF-I and II mRNA in the developing rat embryo. *Development* 1987, 101, p.p. 175-84
66. Harvey M.B., Kaye P.L.: Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryo. *Endocrinology* 1988, 122, p.p. 1182-4
67. Mattson B.A., Rosenblum I.Y., Smith R.M., and Heyner S.: *Diabetes* 1988, 37, p.p. 585-89
68. Heyner S., Rao L.V., Jarett L., Smith R.M.: *Dev. Biol.* 1989, 134, p.p. 585-89
69. Totey S.M., Singh G., Taneja M., Pawshe C.H., and Talver G.P.: In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalis bubalis*). *J. Reprod. of Fertility* 1992, 95, p.p. 597-607
70. Zhang X., Kidder G.M., Watson A.S., Schultz G.A., and Armstrong D.T.: Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation gene expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Reprod. of Fertility* 1994, 100, 375-80
71. Lighten A.D., Hardy K., Winston R.M.L., and Moore G.E.: Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 1997, 47, p.p. 134-39
72. Telford N.A., Watson A.J., and Schultz G.A.: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development* 1990, 26, p.p. 90-100
73. Telford N.A., Hogan A., Franz C.R., and Schultz G.: Expression of genes for insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early preimplantation mouse embryos and embryonal carcinoma cells. *Molecular Reproduction and Development* 1996, 26, 81-92
74. Narula A., Taneja M., and Totey S.M.: Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophectoderm and inner cell mass of in vitro fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos the effect of IGF-I. *Molecular Reproduction and Development* 1996, 44, p.p. 343-51
75. Gardner H.G., and Kaye P.L.: Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse preimplantation embryos in vitro. *Reproduction Fertility and Development* 1991, 3, 79-91
76. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. : Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993, 75, p.p. 73-82
77. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. : Mice carrying null mutation of the genes encoding insulin-like growth factor-I (Igf-I) and type-I IGF receptor (Igf-Ir). *Cell* 1993, 75, p.p. 59-72
78. Giudice L.C.: Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 1994, 61, p.p. 1-17
79. Casella SJ, Smith EP, van Wyk JJ, Joseph DR, Hynes MA, Hoyt EC, Lund PK.: Isolation of rat testis cDNAs encoding an insulin-like growth factor I precursor. *DNA* 1987, 6, p.p. 325-30
80. Chaterlain P.G., Naville D., Saez J.M.: Somatomedin-C/insulin-like growth material secreted by Sertoli cells in vitro: characterization and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1987, 146, p.p. 1009-17
81. Vanelli B.G., Barni T., Orlando C., Natali A., Serio M., Balboni G.C.: Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: An immunohistochemical study. *Fertil. Steril.* 1988, 49, p.p. 666-9
82. Benahmed M., Morera A.H., Cauvin M.C., DePeretti E.: Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1987, 50, p.p. 69-77
83. Borland K., Mita M., Oppenheimer C.L., Blindermann L.A., Massague J., Hall P.F., Czech M.P.: The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 1984, 114, p.p. 240
84. Lighten A.D., Moore G.E., Winston R.M.L., Hardy K.: Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture. *Hum. Reprod.* 1998, vol.13, p.p. 3144-50
85. Knee R.S., Pitcher S.E., and Murphy P.R.: Basic fibroblast growth factor sense (FGF) and antisense (GFG) RNA transcripts are expressed in unfertilized human oocytes and in differentiated adult tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994, vol.205, no.1, p.p. 577-83
86. Lapolt P.S., Yamato M., Veljkovic M., Sincich C., Ny T., Tsafiriri A., and Hsueh A.J.W.: *Endocrinology* 1990, 127, p.p. 2357-63
87. Gospodarowicz D., Plouet J., and Fujii D.K.: *Endocrinology* 1989, 125, p.p. 1266-76
88. Gospodarowicz D., and Ferrara N.: *J. Steroid Biochem.* 1989, 32, p.p. 183-91
89. Watson R., Antony F., Pickett M., Lambden P., Masson G., and Thomas E.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992, 187, p.p. 1227-31
90. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK.: Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001, Apr 25;175(1-2):123-30
91. Ueno N., Baird A., Esch F., Ling N., Guillemin R.: Isolation and partial characterization of a basic fibroblast growth factor bovine testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1985, 49, p.p. 189-94
92. Jaillard C., Chaterlain P.G., Saez J.M.: In vitro regulation of pig Sertoli cell growth and function: effect of fibroblast growth factor and somatomedin-C. *Biol. Reprod.* 1987, p.p. 665-74
93. Smith E.P., Hall S.H., Monaeo L., French F.S., Wilson E.M., Conti M.: A rat Sertoli cell factor similar to bFGF increases c-fos messenger ribonucleic acid in culture Sertoli cells. *Mol. Endocrinol.* 1989 3, p.p. 954-61
94. Heldin C.H., Wateson A., Westermark B.: Platelet-derived growth factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1985, 39, p.p. 169-87
95. Ross R., Raines E.W., Bowen-Pope D.F.: Biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986, 46, p.p. 155-69
96. Palmieri S., Biggers J.D., Mercola M.: Expression of PDGF-A chain and the PDGF-a receptor during mouse embryogenesis suggests possible role in cell cycle control. *Abstr. Sero Sympos on Preimplantation embryo Develop.*, Boston, 1991 Abstr. No. I-34
97. Ravindranath L., Little-Ihrig L.L., Phillips H.S., Ferrara N., Zeleznik A.J.: Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992, 131, p.p. 254-60
98. Dissen G.A., Lara H.E., Fahrenback W.E., Costa M.E., Ojeda S.R.: Immature rat ovaries become revascularized rapidly after auto transplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 1994, 134, p.p. 1146-54
99. Hartshorne G.: Steroid production by the cumulus: relationship to fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 1989, 7, p.p. 742-45
100. Nayudu PL, Lopata A, Jones GM, Gook DA, Bourne HM, Sheather SJ, Brown TC, Johnston WI.: An analysis of human oocytes and follicle from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characterization. *Hum. Reprod.* 1989, 4, p.p. 558-67
101. Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, Genazzani AR.: Relationship between human oocyte maturity,



- fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum. Reprod.* 1994, 9, p.p. 902-906
102. Gregory L., Booth A., Wells C. and Walker S.: A study of the cumulus-corona cell complex in in vitro fertilization and embryo transfer; a prognostic indicator of the failure of implantation. *Hum. Reprod.* 1994, 9, p.p. 1308-17
103. Van Blerkom J.: The influence of intrinsic and extrinsic factors on the developmental potential of chromosomal normality of the human oocyte. *J. Soc. Gyn. Invest.* 1996, 3, p.p. 3-11
104. Koos R.D.: Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biol. Reprod.* 1995, 52, p.p. 1426-35
105. Neulens J., Yan Z., Raczek S., Weindel K., Keck C., Weich H.A., et. al: Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995, 80, p.p. 1967-71
106. Hagemann A., Nielsen A.H., Poulsen K.: The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exper. Clin. Endocrinol.* 1994, 102, 252-61
107. Gaulden M.: Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutat. Res.* 1992, 296, p.p. 69-88
108. Van Blerkom J., Antczak M., and Schrader R.: The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor concentrations and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.* 1997, 12, p.p. 1047-55
109. Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW.: Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum. Reprod.* 1997, 12, p.p. 191-96
110. Friedman C.I., Danforth D.R., Herbosa-Encarnacion C., Arbogast L., Alak B.M., Seifer D.B.: Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertility and Sterility* 1997, vol. 68, no. 4, p.p. 607-12
111. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Baka SG, Tziotis J, Rizos D, Hassiakos D, Creatas G.: Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilization. *Fertil. Steril.* 2001 Jul; 76(1): 98-101
112. Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C.: The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2000 Jul; 15 suppl 2: 173-88
113. Aaltonen J., Laitinen M.P., Vuojolainen K., Jaatinen R., Horell-Kuitunen N., Seppa L., Louhio H., Tuuri T., Sjöberg J., Bützow R., Hovatta O., Dale L., Ritvos O.: Human growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Clin. Endocrinol. and Met.* 1999, vol. 84, no. 8, p.p. 2744-50
114. McPherron A.C., and Lee S-J.: *J. Biol. Chem.* 1993, 268, p.p. 3444-49
115. McGrath S.A., Esquelo A.F. and Lee S-J.: *Mol. Endocrinol.* 1993, 9, p.p. 131-36
116. Elvin J.A., Matzuk M.M.: Mouse models of ovarian failure. *Rev. Reprod.* 1998, 3, p.p. 183-95
117. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ.: The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 1997, 389, p.p. 73-77
118. Luoh S-W, Bain P.A., Polakiewicz R. D., Goodheart M. L., Gardner H., Jaenisch R., Page D. C.: *Zfx* mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development.* 1997, 124, p.p. 2275-84
119. Zinn AR, Tonk VS, Chen Z, Flejter WL, Gardner HA, Guerra R, Kushner H, Schwartz S, Sybert VP, Van Dyke DL, Ross JL. : Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am. J. Hum. Gen.* 1998, 63, p.p. 1757-66
120. Schultz R. M.: Preimplantation embryo development. *Molecular Biology in Reproductive Medicine* (Fauser B.C.J.M.), 1st ed., Parthenon published London-Newyork 1999, p.p. 313-31
121. Cha K.Y.: Future directions of in vitro maturation. *Fertility and Reproductive Medicine* (Kempers R. D., Cohen J., Haney A. F. and Younger J. B.) 1998, p.p. 589-95
122. Barnes F. L., Kausche A., Tiglias J., Wood C., Wilton L., Trounson A.: Production of embryos from in vitro matured primary human oocytes. *Fertility and Sterility* 1996, vol.65, no.6, p.p. 1151-56
123. Barmat L.I., Liu H-C., Spandorfer S.D., Kowalik a., Mele C., Xu K., Veeck L., Damario M.,and Rosenwaks Z.: Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization embryo transfer. *J. Assist. Rep. And Genet.* 1999, vol.16, no.3, p.p.121-27