

Raziskovalni prispevek/Research article

## OVARIJSKA NEPLODNOST, MATIČNE CELICE IN OOGENEZA IN VITRO

OVARIAN INFERTILITY, STEM CELLS AND OOGENSIS *IN VITRO*

Irma Virant-Klun,<sup>1</sup> Andrej Vogler,<sup>1</sup> Jasna Šinkovec,<sup>1</sup> Matjaž Hren,<sup>2</sup> Kristina Gruden,<sup>2</sup>  
Elvira Maličev,<sup>3</sup> Helena Meden-Vrtovec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Zavod za transfuzijsko medicino Republike Slovenije, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

### Izvleček

- Izhodišča** *V različnih tkivih oziroma organih odraslega človeka so že bile odkrite embrionalnim celicam podobne matične celice. Postavlja se vprašanje, ali so takšne celice prisotne tudi v odraslem jajčniku. S to raziskavo smo poskušali ugotoviti, ali so v površinskem epitelu žensk s prezgodnjo menopavzo prisotne pluripotentne matične celice, in ali je možno v laboratorijskih pogojih te celice vzgojiti v jajčne celice.*
- Metode** *Laparoskopsko smo postrgali površinski epitel jajčnika 10 bolnic s prezgodnjo menopavzo. Iz suspenzije postrganih celic smo poskušali s pomočjo imunokroglic in magneta osamiti in dokazati embrionalnim podobne matične celice. Njihovo pluripotentnost smo dokazovali imunocitokemično (c-kit, SSEA-4). V laboratoriju smo matične celice v celični kulturi poskušali vzgojiti v jajčne celice z dodajanjem heterologne folikularne tekočine iz postopka zunajtelesne oploditve, ki vsebuje substance, potrebne za rast in dozorevanje jajčnih celic. Spremljali smo razvoj jajčnim podobnih celic, jih osamili iz celične kulture in jih imunocitokemično barvali na označevalce, značilne za jajčne celice (c-kit, VASA, ZP2). Na posamičnih celicah smo z metodo RT-PCR analizirali izraženost genov, značilnih za jajčne celice (Oct-4A, ZP3, c-kit, SCP-3).*
- Rezultati** *Iz postrganih celic vseh bolnic smo osamili majhne, rumenkaste celice s premerom 2 do 4 µm, pozitivne na označevalce pluripotentnih matičnih celic. V laboratoriju smo te celice uspešno vzgojili v celice, podobne jajčnim, s premerom 60–80 µm. Nekateri od celic, podobne jajčnim, so se pozitivno obarvale na označevalce jajčnih celic in izražale gene, značilne za jajčne celice, vključno z mejotskimi.*
- Zaključki** *Iz matičnih celic površinskega epitela lahko vzgojimo celice, podobne jajčnim, in vitro pri bolnicah s prezgodnjo menopavzo. Potrebne bodo temeljite nadaljnje raziskave teh celic, da bomo ocenili možnost njihove uporabe za zunajtelesno oploditev v daljnji prihodnosti.*
- Ključne besede** *embrionalnim podobne matične celice; jajčna celica; kultura in vitro; površinski epitel jajčnika; prezgodnja menopavza*

### Abstract

- Background** *In different human adult tissues and organs embryonic-like stem cells have already been found. A question is whether they are present also in the adult human ovary. In this study we tried to find whether embryonic-like stem cells are present in the ovarian surface epithelium of women with premature ovarian failure, and whether these cells can differentiate into oocytes by in vitro culture.*

### Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

Irma Virant-Klun, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

Methods	<i>In 10 women with premature ovarian failure the ovarian surface epithelium was laparoscopically scraped. We tried to immunomagnetically isolate embryonic-like stem cells from the suspension of scraped cells and to confirm their existence immunocytochemically by the expression of the markers c-kit and surface antigen SSEA-4, characteristic of pluripotent stem cells. In the lab, we tried to differentiate stem cells into oocytes in a cell culture medium with added heterologous follicular fluid from the in vitro fertilization programme, which is rich in substances, and important for oocyte growth and maturation. The differentiation of oocyte-like cells was screened. Oocyte-like cells were isolated from the cell culture and immunocytochemically stained for oocyte-specific markers (c-kit, VASA, ZP2-zona pellucida). Oocyte-like cells were analyzed for the expression of oocyte-specific genes (Oct-4A, ZP3, c-kit, SCP-3) by single-cell PCR.</i>
Results	<i>From the ovarian surface epithelium of all patients small yellow coloured cells with diameters of 2 to 4 µm and positive for markers of pluripotent stem cells were isolated. In the lab, these cells were cultured into oocyte-like cells with diameter ranging from 60 to 80 µm. Some of oocyte-like cells were positive for oocyte-specific markers and expressed the genes, characteristic of oocytes, including meiotic genes.</i>
Conclusions	<i>In patients with premature ovarian failure it is possible to culture oocyte-like cells from ovarian surface epithelium stem cells. Intense research is needed to evaluate the quality of oocyte-like cells developed in vitro and to estimate their potential use for in vitro fertilization in the far future.</i>
<b>Key words</b>	<i>embryonic-like stem cells; oocyte; culture in vitro; ovarian surface epithelium; premature ovarian failure</i>

## Uvod

Dosedanje raziskave v svetu kažejo, da je možno iz embrionalnih matičnih celic, odvzetih iz zarodka, razviti jajčne celice v laboratorijskih pogojih. Ker so embrionalne matične celice pluripotentne, jih je teoretično možno diferencirati v kateri koli tip celic, vključno s spolnimi celicami (gametami). Huebner s sodelavci je dokazala, da je možno mišje embrionalne matične celice razviti *in vitro* v jajčne celice.<sup>1</sup> Embrionalne matične celice so se razvile v oogonije, ki so vstopili v proces mejoze, pritegnile vezne celice in tvorile foliklom podobne strukture ter se razvile v blastociste. Njene rezultate sta potrdili še dve drugi skupini. Novak s sodelavci je v laboratorijskih pogojih uspela razviti mišje embrionalne matične celice v foliklom podobne strukture in v jajčne celice, ki so vstopile v proces mejoze, niso pa ga zaključile.<sup>2</sup> Lacham-Kaplan s sodelavci pa je v posebnem gojišču, ki se drugače uporablja za gojenje celic testisa, iz mišjih embrionalnih matičnih celic razvila jajčne celice in folikle.<sup>3</sup> Zelo presentljiva pa so bila odkritja, da se lahko celice, pozitivne na označevalce jajčnih celic in izraženost genov, specifičnih za jajčne celice, razvijejo tudi iz matičnih celic trebušne slinavke pri podgani in iz kože pri prašiču.<sup>4,5</sup> Podobna odkritja so bila pred kratkim objavljena tudi pri človeku. Naša skupina je bila prva, ki je iz površinskega epitela odraslega jajčnika osamila in definirala populacijo celic z značilnostmi pluripotentnih matičnih celic, podobnih embrionalnim matičnim celicam.<sup>6</sup> <sup>7</sup> To potrjuje ugotovitve nekaterih drugih skupin, ki so našle tudi v drugih odraslih tkivih (npr. kostni mozeg, modo) in organih človeka celice, zelo podobne embrionalnim matičnim celicam po obliki, pluripotentnosti in neomejeni sposobnosti delitve in samoobnavljanja;

te celice naj bi se ohranjale v odraslih tkivih in organih še iz embrionalnega obdobja življenja.<sup>8</sup> Bukovsky s sodelavci je v celični kulturi površinskega epitela jajčnika pomenopavznih žensk opazil razvoj velikih okroglih celic, ki so bile pozitivne na več označevalcev, značilnih za jajčne celice.<sup>9</sup> Naša skupina je te rezultate potrdila in prvič objavila podobna opažanja tudi pri prvih ženskah s prezgodnjo menopavzo.<sup>6</sup> Namen te raziskave je bil poglobiti raziskave matičnih celic in oogneze *in vitro* pri bolnicah s prezgodnjo menopavzo. Prvič smo ugotavljali izraženost genov, značilnih za jajčne celice, na posameznih celicah, podobnih jajčnim, vzgojenih v pogojih *in vitro*.

## Bolnice in metode

V raziskavo smo vključili 10 bolnic s prezgodnjo menopavzo in povprečno starostjo 26 let (min. 21 in maks. 31 let). Vse bolnice so imele močno povišano koncentracijo FSH v krvi in zelo nizko koncentracijo estrogenov. Nobena od bolnic ni nimela fragilnega X ali ovarijskega raka. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko (dokument št. 110/10/05). Vse bolnice so bile natančno obveščene o poteku raziskave. V raziskavi so sodelovale prostovoljno po podpisu soglasja k sodelovanju v tej raziskavi.

Pri vsaki bolnici smo laparoskopsko postrgali površinski epitel jajčnika s fino ščetko, sprali površino jajčnika in spirek vsrkali iz Douglasovega prostora. Opravljena je bila tudi biopsija jajčnika za histološko oceno prisotnosti foliklov in jajčnih celic po barvanju s hematoksilin-eozinom in površinskega epitela jajčnika po barvanju s citokeratinom. Iz populacije celic, postrganih iz površine jajčnika, smo s pomočjo

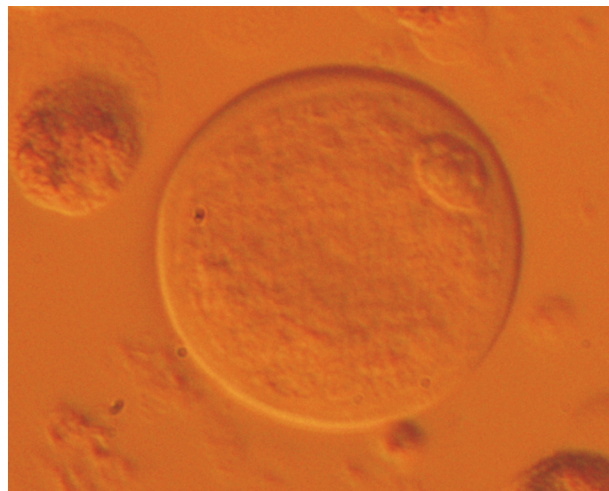
imunokroglic, obdanih s protitelesi anti-SSEA-4 (angl. Stage-specific embryonic antigen 4) in z magnetom osamili populacijo SSEA-4-pozitivnih celic, ki so bile analizirane tudi s pretočno citometrijo. S populacijo postrganih celic površinskega epitela smo vzpostavili celično kulturo v modificiranem gojišču DMEM/F-12 z 20 % dodane prefiltrirane heterologne folikularne tekočine iz postopka zunajtelesne oploditve. Celice smo gojili v CO<sub>2</sub>-inkubatorju (Heraeus, Nemčija) pri 37 °C in 6 % CO<sub>2</sub> v zraku. Sledili smo razvoju celic, podobnih jajčnim, s premerom nad 50 μm. Pod invertirnim mikroskopom (Nikon, Japonska), opremljenim z digitalno kamero (Nikon, Japonska), smo opazovali matične celice in celice, podobne jajčnim, pri povečavah 100- do 6000-krat (Hoffman in Dic-Nomarski osvetlitev). Po 20 dneh gojenja smo celice, podobne jajčnim, osamili iz celične kulture mehansko ali s pomočjo tripsin-EDTA reagenta. Posamezne celice, podobne jajčnim, smo imuncitokemično barvali s FITC-konjugiranimi protitelesi proti VASA in Texas-rdeče-konjugiranimi protitelesi proti c-kit in ZP2 (angl. zona pellucida glycoprotein 2). Iz posameznih celic, podobnih jajčnim, smo osamili RNA in po amplifikaciji pri vsaki celici posebej ugotavljali izraženost genov *Oct 4A*, *c-kit*, *ZP3* (angl. *zona pellucida glycoprotein 3*) in *SCP3* (angl. *synaptonemal complex protein-3* mejotski protein), značilnih za jajčne celice.

## Rezultati

Pri 9 bolnicah s prezgodnjo menopavzo v skorji jajčnika ni bilo foliklov in jajčnih celic, pri eni (1) bolnici pa so bili prisotni samo primordialni folikli. Pri vseh bolnicah je bil prisoten površinski epitel jajčnika. Pri vseh bolnicah smo dokazali prisotnost matičnih celic, podobnih embrionalnim, v površinskem epitelu jajčnika. Te celice so bile rumenkaste, premera 2 do 4 μm (Sl. 1A) in pozitivne na označevalca pluripotentnosti c-kit in SSEA-4 (Sl. 1B), značilna za embrionalne

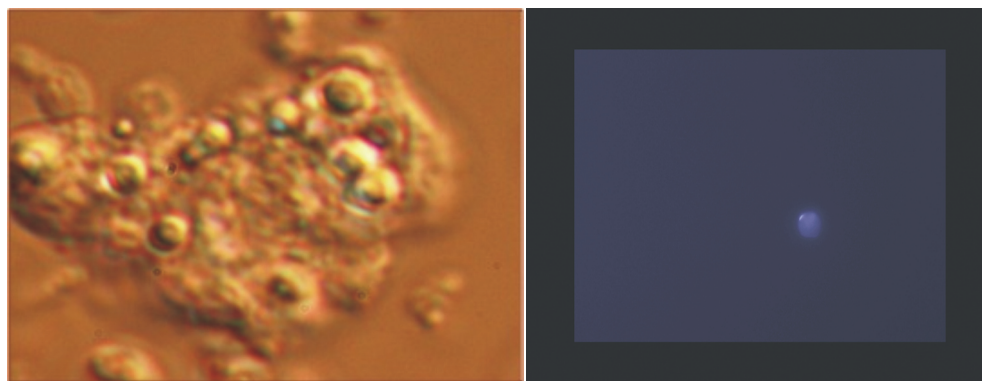
matične celice. Predstavljale so 4,8 % vseh celic, postrganih s površine jajčnika. Prevladovale so epitelne celice. Matične celice so se pojavljale posamično ali pa ujete med skupke epitelnih celic (Sl. 1A).

Pri vseh bolnicah smo uspešno vzpostavili celično kulturo površinskega epitela jajčnika. Po 20 dneh gojenja smo pri vseh bolnicah našli velike, okrogle celice, podobne jajčnim, s premerom 60 do 80 μm (Sl. 2). Našli smo 2 do 5 takšnih celic na bolnico. Pri 10 % teh celic smo opazili strukturo, podobno coni pelucidi okrog celic in 1 % celic je izločilo strukturo, podobno polarnemu telesu. Preostale celice, podobne jajčnim, so bile manjše in so imele premer od 20 do 40 μm.



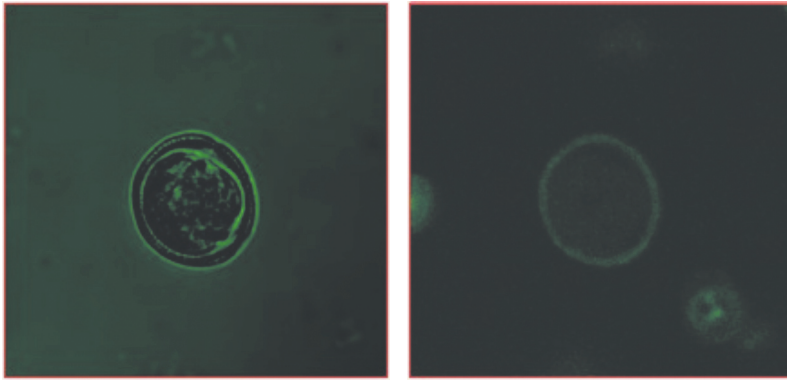
Sl. 2. Jajčni podobna celica s strukturo, podobno polarnemu telesu in s premerom 80 μm, razvita v celični kulturi površinskega epitela jajčnika (inverted microscope, Hoffman, povečava 200-krat).

Figure 2. Oocyte-like cell with a structure resembling a polar body and with a diameter of 80 μm, developed in a cell culture of ovarian surface epithelium (inverted microscope, Hoffman, magnification 200-times).



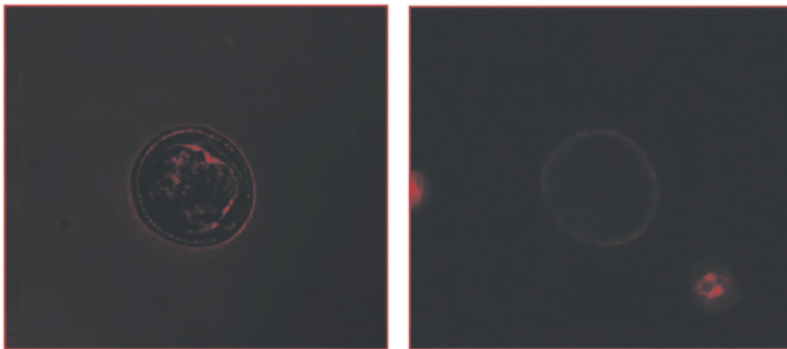
Sl. 1. Matične celice v površinskem epiteliju jajčnika. A. Matične celice, ujete med epiteljskimi celicami, postrganimi iz površine jajčnika (invertirni mikroskop, dic-Nomarski, povečava 6000-krat). B. Matične celice, pozitivno obarvane na površinski antigen SSEA-4 (fluorescenčni mikroskop, povečava 1000-krat).

Figure 1. Stem cells in the ovarian surface epithelium. A. Stem cells, captured in a cluster of epithelial cells, scraped from the ovarian surface (inverted microscope, dic-Nomarski, magnification 6000-times). B. Stem cells positively stained for SSEA-4 surface antigen (fluorescent microscope, magnification 1000-times).



Sl. 3. Jajčni podobna celica, razvita v celični kulturi površinskega epitelijskega z izraženo *cono pelucido* in pozitivna na VASA označevalec (fluorescenčni mikroskop, povečava 100-krat).

Figure 3. Oocyte-like cell developed in the ovarian surface epithelium cell culture, positive for the VASA marker (fluorescent microscope, magnification 100-times).



Sl. 4. Jajčni podobna celica, razvita v celični kulturi površinskega epitelijskega z izraženo *cono pelucido* in pozitivna na ZP2 označevalec (fluorescenčni mikroskop, povečava 100-krat).

Figure 4. Oocyte-like cell developed in the ovarian surface epithelium cell culture, positive for the ZP2 marker (fluorescent microscope, magnification 100-times).

Celice, podobne jajčnim, so se pozitivno obarvale na označevalce jajčnih celic: *c-kit*, VASA (Sl. 3) in ZP2 (Sl. 4). Izražale so gene, značilne za jajčne celice: *Oct 4A*, *c-kit*, *ZP3* in *SCP-3*. Izgleda, da so jajčne celice vstopile v proces mejoze.

## Razpravljanje

V tej raziskavi smo v površinskem epitelu jajčnika bolnic s prezgodnjo menopavzo odkrili embrionalnim podobne matične celice, ki so se ob prisotnosti heterologne folikularne tekočine v gojišču razvile v celice, podobne jajčnim. Podobno kot v drugih odraslih tkivih in organih človeka naj bi se matične celice, podobne embrionalnim, v odraslem jajčniku ohranjale še iz embrionalnega obdobja življenja. Ni izključena tudi možnost njihovega potovanja s krvnim obtokom po vsem telesu na mesta, kjer so potrebne. Izkazalo se je, da je folikularna tekočina v gojišču izredno pomemben dejavnik razvoja matičnih ce-

lic jajčnika v jajčne celice. Znano je, da folikularna tekočina, pridobljena v postopku zunajtelesne oploditve po hormonskem spodbujanju jajčnikov bolnic in po aspiriranju jajčnih celic iz foliklov vsebuje visoke koncentracije hormonov – estrogenov, gonadotropinov (FSH), progesterona, androgenov, proteinov, aminokislin, lipidov, prostega holesterola, mejozo aktivirajočih sterolov (FF-MAS), rastnih dejavnikov in številne druge snovi, pomembne za rast in dozorevanje jajčnih celic.<sup>10-14</sup>

Gre za pomembno odkritje, saj je prezgodnja menopavza ena najtežjih oblik ovarijske neplodnosti. Bolnice s prezgodnjo menopavzo namreč nimajo lastnih zrelih foliklov in jajčnih celic; neplodnost pri teh bolnicah se lahko zdravi samo z zunajtelesno oploditvijo darovanih jajčnih celic. Na žalost pa darovanih jajčnih celic primankuje in jih nikoli ni dovolj za vse bolnice, ki bi jih potrebovale.

Jajčne celice, razvite *in vitro*, so bile za približno 20  $\mu\text{m}$  manjše od jajčnih celic v postopku zunajtelesne oploditve (premer približno 100  $\mu\text{m}$ ), so pa nekatere med njimi sprostile strukture, podobne *cono pelucido* in strukture, podobne polarnemu telesu. Poudariti je potrebno, da so se jajčne celice v tej raziskavi razvijale brez dodajanja rastnih dejavnikov.

Ker so nekatere jajčne celice izražale gen *SCP-3*, se odpira pomembno vprašanje, kakšna je kakovost jajčnih celic, vzgojenih v pogojih *in vitro*. Novak s sodelavci je namreč ugotovila, da so jajčne celice, razvite iz mišjih embrionalnih matičnih celic,

vsebovale mejotski protein *SCP-3*, ne pa mejotskih proteinov, kot so *SCP-1*, *SCP-2*, *STAG3* (angl. stromal antigen 3), *REC8* (angl. meiotic protein similar to the *rad21* cohesins) in *SMC1* (angl. structural maintenance of chromosomes-1). Poleg tega je bila jedrna razporeditev proteina *SCP-3* zelo nenormalna in ni bila povezana s kromosomi. Z metodo fluorescenčne *in situ* hibridizacije je dokazala, da *SCP-3*-pozitivne celice niso vsebovale sinaps homolognih kromosomov, temveč organizacijo kromosomov, značilno za somatske celice.<sup>2</sup> Posledica tega je bila, da so jajčne celice, razvite iz mišjih embrionalnih matičnih celic, vstopile v mejozo, niso pa je končale in se niso razvile v zrele jajčne celice, sposobne oploditve.<sup>2</sup> Poudariti je potrebno, da so se v naši raziskavi celice, podobne jajčnim, razvile v drugačnih pogojih in ob prisotnosti folikularne tekočine, ki pomeni naravno stanje. Poleg tega so bile tudi jajčne celice, pridobljene iz mišjih embrionalnih matičnih celic, v raziskavi Lacham-Kaplan in njenih sodelavcev, normalne.<sup>3</sup> Vsekakor bo v prihodnosti zelo pomembno

zagotoviti čim bolj ustrezno sestavo gojišča za vzgojo celic, podobnih jajčnim, iz matičnih celic jajčnika v pogojih *in vitro*.

Nadaljnje raziskave v mednarodni skupini strokovnjakov bodo pokazale, kakšna je dejanska kakovost celic, podobnih jajčnim, razvitih *in vitro* iz matičnih celic jajčnika. Ocenili bomo genetski in epigenetski status teh celic. Ugotoviti bo potrebno, ali bi jajčne celice, razvite *in vitro*, lahko uporabili za zunajtelesno oploditev v daljnji prihodnosti. Na ta način razvite jajčne celice pa bi lahko bile zelo uporabne tudi za namene regenerativne medicine kot substrat za terapevtsko kloniranje (tj. pridobivanje avtologne linije matičnih celic po prenosu somatskega jedra v jajčno celico z odstranjenim jedrom za zdravljenje degenerativnih bolezni); razvoj terapevtskega kloniranja močno ovira pomanjkanje jajčnih celic, darovanih za raziskave.

## Zaključki

V celični kulturi površinskega epitela jajčnika lahko ob dodatku heterologne folikularne tekočine v laboratorijskih pogojih vzgojimo celice, podobne jajčnim. To je izrednega pomena, saj gre za bolnice s prezgodnjo menopavzo, ki nimajo naravno prisotnih jajčnih celic za oploditev. Potrebne bodo temeljite nadaljnje raziskave teh celic, da bomo ocenili njihovo kakovost, vključno z genetskim in epigenetskim statusom in možnostjo, da se uporabijo za zunajtelesno oploditev v daljnji prihodnosti.

## Zahvala

Zahvaliti se želimo za vso podporo, ki so nam jo nudili prof. Antonin Bukovsky, Univerza Tennessee, ZDA, prof. Thomas Skutella, Univerza Tuebingen, Nemčija, prof. Eda Vrtačnik-Bokal, predstojnica Oddelka za reprodukcijo, prof. Tomaž Tomažević, vodja skupine za oploditev z biomedicinsko pomočjo, osebje Laboratorija za oploditev z biomedicinsko pomočjo na Ginekološki kliniki v Ljubljani, prof. Primož Rožman, strokovni direktor Zavoda za transfuzijsko medicino Republike Slovenije, Javna agencija za raziskovalno dejavnost, ki je podprla to delo s financiranjem raziskovalnega projekta: Nov pogled v fiziologijo humanega jajčnika: matične celice in oogeneza *in vitro*? (J3-0415) in vsi ostali.

## Literatura

1. Huebner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300: 1251–6.
2. Novak I, Lightfoot DA, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Hoog C. Mouse embryonic stem cells from follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 2006; 24: 1931–6.
3. Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 2006; 24: 266–73.
4. Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 11–20.
5. Dyce PW, Wen I, Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 384–90.
6. Virant-Klun I, Zech N, Rozman P, Vogler A, Cvjeticanin B, Klemenč P, et al. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation* 2008; 76: 843–56.
7. Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, Vrtacnik-Bokal E, Novakovic S, Ruelicke T, et al. Parthenogenetic Embryo-Like Structures in the Human Ovarian Surface Epithelium Cell Culture in Postmenopausal Women with No Naturally Present Follicles and Oocytes. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 137–50.
8. Ratajczak MZ, Kucia M, Ratajczak J, Zuba-Surma EK. A multi-instrumental approach to identify and purify very small embryonic like stem cells (VSEs) from adult tissues. *Micron* 2009; 40:386–93.
9. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 17.
10. Duijkers JJ, Willemsen WN, Hollanders WN, Hamilton CJ, Thomas CM, Wemer HM. Follicular fluid hormone concentrations after ovarian stimulation using gonadotropin preparations with different FSH/LH ratios. II. Composition of hMG and recombinant FSH. *Int J Fertil Womens Med* 1997; 42: 431–35.
11. Velasquez A, Reyes A, Chargoy J, Rosado A. Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1977; 28: 96–100.
12. Bokal EV, Tacer KF, Vrbnjak M, Leposa S, Virant-Klun I, Verdenik I, et al. Follicular sterol composition in gonadotrophin stimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Moll Cell Endocrinol* 2006; 249: 92–8.
13. Smitz J, Picton HM, Platteau P, Rutherford A, Cortvrindt A, Clyde J, et al. Principal findings from a multicenter trial investigating the safety of follicular fluid meiosis-activating sterol for in vitro maturation of human cumulus-enclosed oocytes. *Fertil Steril* 2007; 87: 949–46.
14. Ulug E, Turan E, Tosun SB, Erden HF, Bahceci M. Comparison of preovulatory follicular concentrations of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and inhibins A and B in women undergoing assisted conceptions treatment with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists and GnRH antagonists. *Fertil Steril* 2007; 87: 995–8.