



# Laparoskopsko pridobivanje potencialnih matičnih celic jajčnika pri bolnicah s prezgodnjo menopavzo

## *Laparoscopic collection of putative ovarian stem cells in patients with premature ovarian failure*

Andrej Vogler, Irma Virant-Klun

Ginekološka klinika Ljubljana, Univerzitetni klinični center

Avtor za dopisovanje (*Correspondence to*):

doc. dr. Andrej Vogler, dr. med., Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ginekološka klinika, Šlajmerjeva ulica 3, 1000 LJUBLJANA, tel.: (01) 422 62 29, (041) 695 966), e-naslov: andrej.vogler@guest.arnes.si

### **Povzetek**

**Izhodišča.** Ženske s prezgodnjo odpovedjo delovanja ovarijev (POO) ne morejo zanositi ne po naravni poti ne s pomočjo oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP) in imeti genetsko lastnega otroka s svojimi oociti. V zadnjem desetletju so raziskave na področju matičnih celic odprle možnosti zdravljenja številnih doslej še neozdravljivih bolezni. Prisotnost matičnih celic v odraslem jajčniku še niso povsem jasno dokazali. Matične celice jajčnika bi lahko omogočile nove raziskave, kako pomagati ženskam s POO, ki želijo zanositi. Z raziskavo smo želeli pridobiti potencialne matične celice s pomočjo laparoskopije iz odraslega jajčnika pri ženskah s POO in iz matičnih celic razviti oocite.

**Bolnice in metode.** V raziskavo smo vključili 8 neplodnih žensk s POO, starih 22–39 let. Vsem smo napravili laparoskopijo in skušali pridobiti potencialne matične celice s površine jajčnikov na 4 različne načine: s postrganjem in ščetkanjem površine jajčnikov, z biopsijo in z izpiranjem površine jajčnikov. Del ovarijskega tkiva smo obarvali s citokeratinom, da bi dokazali površinski ovarijski epitel. Iz pridobljenih celic smo vzpostavili celično kulturo jajčnikov in v naslednjih 16 dni morfološko sledili diferenciaciji celic.

**Rezultati.** Pri 7 od 8 preiskovank smo opazili dobro razvit površinski epitel jajčnika in uspešno vzpostavili ovarijsko celično kulturo. Peti dan gojenja smo opazili celice, podobne oocitom z germinalnim veziklom, zono pellucido in v nekaterih tudi delitveno vreteno. Hkrati z razvojem prvih oocitom podobnih celic smo pri vseh preiskovankah opazili tudi razvoj nekaj celic, ki so bile podobne blastocistam. Opazili smo tudi somatske celice, ki so se diferencirale v celični kulturi nevromom in mioblastom podobne celice ter sloj epitelnih celic.

**Zaključki.** Z našim delom smo empirično dokazali obstoj ovarijskih matičnih celic pri ženskah s POO, ki jih lahko pridobimo z dokaj preprostim laparoskopskim posegom. Razvoj oocitom podobnih celic in blastocisti podobnih struktur, čeprav partenogenetsko razvitih, potrjuje obstoj matičnih celic v odraslem jajčniku.

**Ključne besede.** Prezgodnja menopavza, neplodnost, laparoskopija, ovarij, matične celice.



## Abstract

**Background:** Women with premature ovarian failure (POF) are unable to conceive and have a genetically related child with their own oocytes. The presence of stem cells in an adult human ovary has not yet been definitively established. The aim of our study was to collect laparoscopically putative stem cells from adult ovaries of women with POF, and to derive oocytes from stem cell cultures.

**Patients and Methods:** Eight infertile women with POF were included in our study. In all patients laparoscopy was performed and the following techniques of putative stem cells collection were used: scratching and brushing the ovarian surface, ovarian biopsy and rinsing the ovarian surface. A part of the tissue was stained with cytokeratin to determine the presence of ovarian surface epithelium. The collected ovarian cells were cultured for 16 days and cell differentiation was followed morphologically.

**Results:** Thick ovarian surface epithelium was confirmed and ovarian cell cultures were successfully established in 7 of the 8 women. On the 5<sup>th</sup> day of culturing, oocyte-like cells with a germinal vesicle and zona pellucida were identified. In some of these cells a spindle was confirmed. Additionally, some blastocyst-like structures were found in all patients. Somatic cells, including neuron-like and myoblast-like cells and a layer of epithelial cells, were confirmed in the cell culture, too.

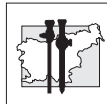
**Conclusions:** Our work has empirically proved the presence of ovarian stem cells in patients with POF. These cells can be collected using a relatively straightforward laparoscopic procedure. The differentiation of oocyte-like and blastocyst-like cells in the ovarian cell culture strongly supports the existence of ovarian stem cells in women with POF.

**Key words.** Premature ovarian failure, infertility, laparoscopy, ovary, stem cells.

## Uvod

Prezgodnja menopavza je spontano prenehanje menstruacij zaradi popolnega prenehanja hormonskega in gametogenega delovanja jajčnikov pri ženskah, mlajših od 40 let. Pogoj za diagnozo je tudi zvečana koncentracija FSH (> 40 IE) ob ponovitvi v presledku 2–3 mesecev (1,2). Vzroki za prezgodnjo menopavzo so lahko kirurška odstranitev jajčnikov iz različnih razlogov ali prezgodnja odpoved delovanja jajčnikov (*angl.* premature ovarian failure, POO). POO je najpogostejši vzrok za prezgodnjo menopavzo in prizadene približno 0,3–1 % žensk, mlajših od 40 let (3–5). Včasih izraz POO napačno uporabljamo tudi pri ženskah s prezgodnjim popuščanjem delovanja jajčnikov (*angl.* premature ovarian insufficiency, POI). Za POI so značilna obdobja delovanja in nedelovanja jajčnikov, kar je sicer normalno pri ženskah po 40. letu starosti, ko so v predmenopavznem obdobju. Nekatere ženske s POI lahko tudi zanosijo.

Glede na patogenezo lahko POO razvrstimo v 2 glavni skupini: primarno spontano POO in sekundarno inducirano oziroma iatrogeno POO. Vzroki za primarno POO so lahko zelo različni, čeprav jih pri večini ne odkrijemo. Danes vemo, da je čas, ko nastopi menopavza, genetsko programiran, in da igrajo geni pomembno vlogo pri nastanku POO. Med redkimi genetskimi in kromosomski vzroki za primarno POO so družinska predispozicija, mutacija receptorjev za folikel stimulirajoči hormon (FSH), galaktozemija, pomanjkanje 17 $\alpha$ -hidroksilaze, spremenjena zgradba ali delovanje gonadotropinov in strukturne spremembe kromosoma X, med katerimi je najpogostejša permutacija fragilnega kromosoma X. Najpogostejši vzrok za spontano POO so avtoimunske motnje, saj pri približno 50 % žensk s spontano POO odkrijemo protiovarijska protitelesa, vendar pa so ta protitelesa prisotna tudi pri približno 30 % žensk brez POO (6,7).



POO lahko nastane tudi zaradi okoljskih vplivov, kot so virusne okužbe in toksini (8). Sekundarna POO nastane najpogosteje zaradi operacij jajčnikov, zdravljenja s citostatskimi zdravili in z obsevanjem.

POO ima številne telesne in psihološke posledice zaradi značilnih simptomov in dolgotrajnega pomanjkanja spolnih steroidnih hormonov. Ženske s POO ne morejo zanositi ne po naravi poti ne s pomočjo oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP), zato ne morejo imeti genetsko lastnega otroka s svojimi oociti. Danes je edina možnost za te bolnice OBMP z darovanimi oociti ali posvojitvev otroka. V zadnjem desetletju so raziskave na področju matičnih celic odprle možnosti zdravljenja številnih doslej še neozdravljivih bolezni in s tem povrnile upanje številnim bolnikom z rakom, multiplo sklerozo, Parkinsonovo boleznijo, amiotrofično lateralno sklerozo in bolnikom s poškodbo hrbtenjače (9,10). Prisotnost matičnih celic v odraslem jajčniku še ni povsem jasno dokazana. Bukovsky s sodelavci meni, da bi bil lahko površinski epitel odraslega ovarija vir matičnih celic (11,12). Matične celice ovarija bi lahko omogočile nove raziskave, kako pomagati ženskam s POO, ki želijo zanositi.

Z raziskavo smo želeli pridobiti potencialne matične celice s pomočjo laparoskopije iz odraslega jajčnika pri ženskah s POO in iz matičnih celic razviti oocite.

## Bolnice in metode

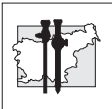
V raziskavo smo vključili 8 neplodnih žensk s POO z normalnim citogenetskim kariotipom in brez premutacije fragilnega kromosoma X. Stare so bile od 22 do 39 let (povprečno 32,6 let, SD  $\pm$  3,75) z značilnimi menopavznimi simptomi, nizko koncentracijo estradiola (v povprečju 0,35 nmol/L, SD  $\pm$  0,17) in visokimi koncentracijami FSH, značilnimi za menopavzo (povprečno 87,5 IU/L, SD  $\pm$  32,20). Pri sedmih je šlo za primarno POO brez znanega vzroka, ena bolnica pa je bila v preteklosti laparoskopsko operirana zaradi obojestranskih ovarijskih endometriomov, ki so bili izluščeni. Nobena od preiskovank vsaj 3 mesece ni prejela nadomestnega hormonskega zdravljenja.

Pri vseh smo napravili laparoskopijo kot del diagnostičnega postopka pri neplodnosti in POO. Da bi pridobili potencialne matične celice iz jajčnikov, smo:

1. postrgali površino obeh jajčnikov z odprtimi rezili laparoskopskih škarij (Slika 1), ki smo jih nato sprali v sterilni fiziološki raztopini, ogreti na 37° C, podobno kot je opisal Bukovsky s sodelavci (le da so postrgali površino jajčnikov postrgali *in vitro*) (13);
2. ščetkali površino obeh jajčnikov s ščetko za jemanje vzorcev iz jajcevodov (Slika 2) in jo prav tako sprali v fiziološki raztopini;
3. napravili biopsijo obeh jajčnikov s pomočjo škarij in poškodbo nato zašili (Slika 3) in
4. sprali površino obeh jajčnikov s sterilno fiziološko raztopino, ogreto na 37° C, nato pa smo posrkali tekočino iz Douglasovega prostora (Slika 4).

Delček z biopsijo pridobljenega ovarijskega tkiva smo poslali na rutinsko patohistološko preiskavo, da bi ocenili morebitno prisotnost foliklov in oocitov v ovarijski skorji. Drugi delček ovarijskega tkiva smo po postrganju pripravili za vzpostavitev celične kulture in obarvali s citokeratinom, da bi ocenili prisotnost površinskega epitela. Ocenili smo tudi število potencialnih matičnih celic, ki smo jih pridobili z eno od naštetih metod. Iz celic, ki smo jih pridobili s postrganjem in ščetkanjem površine jajčnika in z aspiriranjem izpirka jajčnika, smo pripravili celično suspenzijo in iskali potencialne matične celice s pomočjo invertnega in navadnega svetlobnega mikroskopa. Osredotočili smo se na majhne, okrogle celice z velikim jedrom. Celično populacijo, pridobljeno s strganjem površine jajčnika, smo neposredno uporabili za vzpostavitev celične kulture in za osamitev populacije morebitnih matičnih celic iz površinskega epitela jajčnika. Uporabili smo medij DMEM/F-12 s šibkim estrogenskim učinkovanjem in celično kulturo gojili 16 dni v CO<sub>2</sub>-inkubatorju pri 37° C in 5 % CO<sub>2</sub> v zraku (Heraeus, Nemčija). Diferenciacijo celic smo ocenili morfološko s pomočjo invertnega mikroskopa (Nikon, Japonska) in povečavami od 100- do 6000-krat.

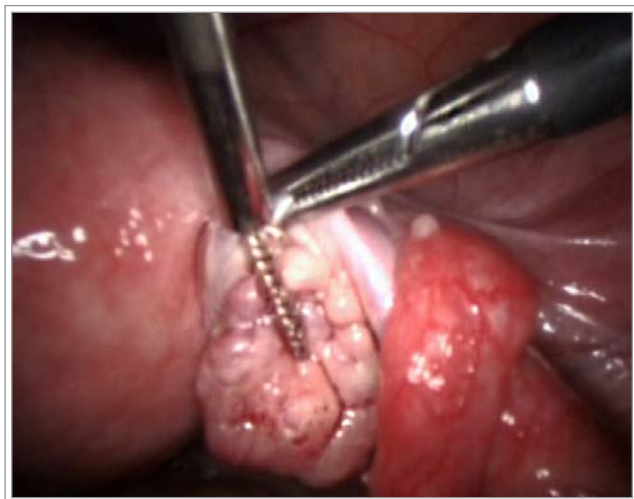
Raziskavo sta odobrili Komisija za medicinsko etiko (številka odobritve 110/10) in Državna komisija za oploditev z biomedicinsko pomočjo. Vse bolnice so bile natančno obveščene o poteku raziskave. V raziskavi so sodelovale prostovoljno po podpisu soglasja.



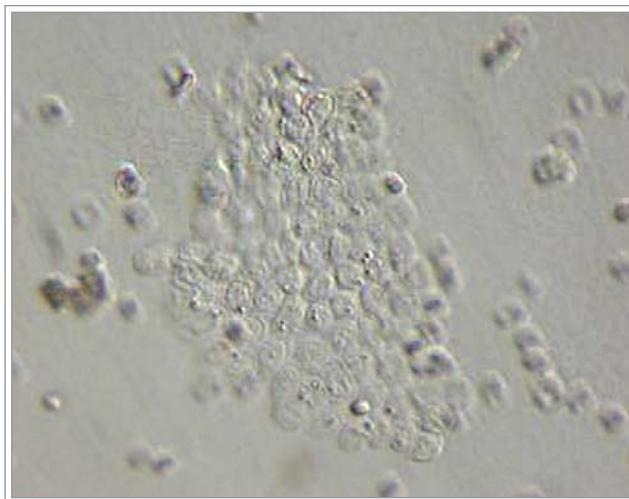
**Slika 1**  
Strganje površine ovarija



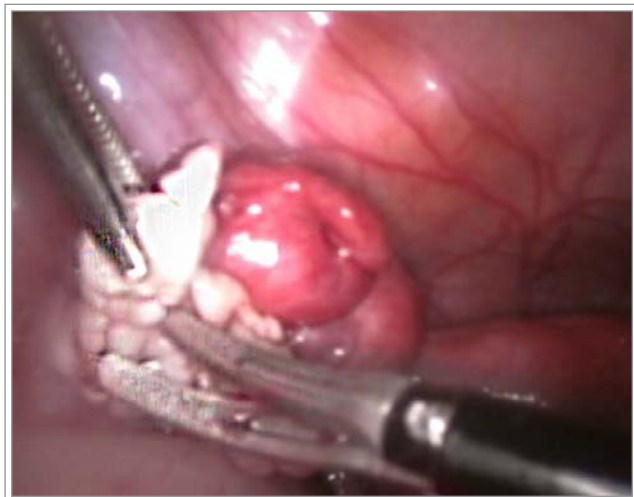
**Slika 4**  
Izpiranje površine ovarija



**Slika 2**  
Šetkanje površine ovarija



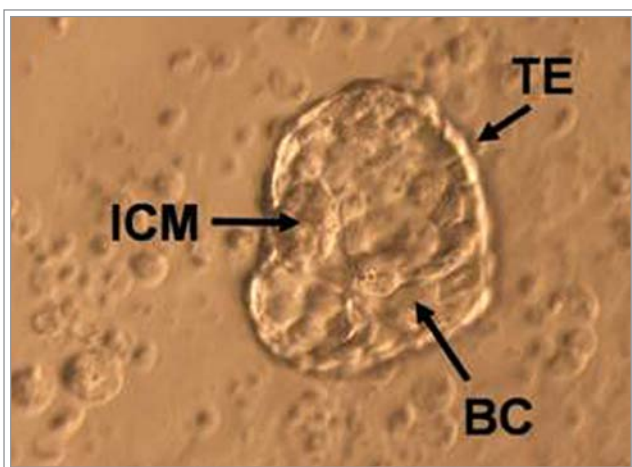
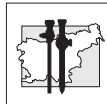
**Slika 5**  
Potencialne matične celice



**Slika 3**  
Biopsija ovarija



**Slika 6**  
Oocitu podobna celica (ZP – zona pellucida)



**Slika 7**

Blastocisti podobna celica (ICM – notranja celična masa, BC – blastocistna votlina, TE - trofoektoderm)

## Rezultati

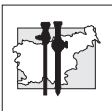
S patohistološkim pregledom delčkov jajčnika smo ugotovili, da nobena od preiskovank ni imela foliklov in oocitov v ovarijski skorji. Pri 7 ženskah s primarno POO smo potrdili dobro razvit površinski ovarijski epitel, pri bolnici, ki je bila operirana zaradi obojestranskih ovarijskih endometriomov, pa ga ni bilo. S strganjem in ščetkanjem površine jajčnika smo neposredno pridobili le nekaj celic, iz aspirirane tekočine iz Douglasovega prostora po strganju in ščetkanju pa več kot 100 celic. Pri vseh ženskah, razen pri bolnici po operaciji endometriomov, smo v celični suspenziji našli majhne, še nedoločljive celice velikosti 2–4  $\mu\text{m}$  (Slika 5). Te celice so bile pozitivne na površinski antigen SSEA-4, ki je značilen za embrionalne matične celice. Celice so izkazovale tudi pluripotentnost.

Pri vseh 7 ženskah s površinskim epitelium jajčnika smo uspešno vzpostavili celično kulturo. Po 2–3 dneh smo opazili pričetek diferenciacije teh celic v različne tipe celic, predvsem fibroblaste. Peti dan gojenja smo opazili celice, podobne oocitom, s premerom 80–95  $\mu\text{m}$  (Slika 6). Pri teh celicah smo opazili germinalni vezikel in potrdili zono pellucido. V nekaterih celicah, podobnih oocitom, smo zaznali tudi delitveno vreteno. Pri vsaki preiskovanki smo opazili več kot 10 oocitom podobnih celic. Sočasno z razvojem prvih oocitom podobnih celic smo pri vseh preiskovankah opazili diferenciacijo nekaj blastocistam podobnih celic (Slika 7). Te celice so bile velike več kot 100  $\mu\text{m}$  in so bile morfološko podobne blastocistam, ki jih pridobimo v postopku zunajtelesne oploditve. Opazili smo tudi somatske celice, ki so se

diferencirale v celični kulturi: nevrom in mioblastom podobne celice ter sloj epitelnih celic.

## Razpravljanje

Že dolgo obstaja deljeno mnenje o tem, ali v odraslem jajčniku obstajajo matične celice. Danes je vse več eksperimentalnih dokazov, ki potrjujejo, da te vendarle obstajajo (14,15). Neplodne ženske s POO so zelo primerne za raziskovanje razvoja oocitov iz lastnih potencialnih ovarijskih matičnih celic. Vse preiskovanke, ki so sodelovale v raziskavi, smo skrbno izbrali tako, da nobena ni imela lastnih oocitov. S tem smo se izognili morebitni pristranskosti raziskave. Z dokaj preprostim laparoskopskim posegom smo pri ženskah s POO s površinskega ovarijskega epitela uspeli pridobiti celice, ki so se v celični kulturi razvile v različne druge tipe celic. Nedvomno gre za potencialne matične celice iz odraslega jajčnika, kar smo po dostopnih podatkih napravili prvi (16). Naše izsledki so v nasprotju z rezultati raziskave, ki jo je opravil Lee s sodelavci. Pri ženskah, starih 28–53 let, v jajčnikih namreč niso odkrili označevalcev matičnih ali zarodnih celic, kar je v nasprotju s testisi oziroma fetalnimi ovariji, ki so služili za pozitivno kontrolo (17). Za razliko od nas so se raziskovalci osredotočili na ovarijsko skorjo in ne na površinski epitel jajčnika. Čeprav bi bila lahko vir teh potencialnih matičnih celic tudi periferna kri (18), naše dosedanje delo in tudi raziskave nekaterih drugih avtorjev kažejo, da je površinski ovarijski epitel dejanski vir potencialnih matičnih celic (13,19–21). Ugotovili smo, da je razvoj celične kulture *in vitro* povezan tudi z debelino ovarijskega površinskega epitela, kar še dodatno potrjuje, da so v površinskem epitelu prisotne matične celice. Zanimiva ugotovitev našega dela je bila tudi, da bolnica, ki je bila prej operirana zaradi ovarijskih endometriomov s posledično POO, ni imela površinskega ovarijskega epitela, tako da pri njej nismo uspeli vzpostaviti celične kulture s potencialnimi matičnimi celicami. Številni avtorji so ugotovili, da se po kirurški odstranitvi endometriomov lahko pomembno zmanjša ovarijska rezerva ali celo privede do POO (22–27). To je odvisno predvsem od kirurške tehnike. Pravilna operacijska tehnika namreč kljub neizogibni odstranitvi nekaj zdravega tkiva jajčnika omogoča zadostno ohranitev funkcionalnega tkiva in ne vpliva pomembno na njegovo delovanje. Po drugi strani pa lahko z neustrezno operacijsko tehniko zmanjšamo ovarijsko rezervo ali celo povzročimo prezgodnjo menopavzo,



kar kažejo tudi izsledki novejših raziskav (24,28). Seveda je na podlagi ene bolnice z iatrogeno povzročeno POO preuranjeno sklepati, da pri ženskah s POO po konzervativnih operacijah benignih ovarijskih tvorbo ni mogoče pridobiti potencialnih matičnih celic s površine preostanka jajčnikov.

Pri naših preiskovankah smo v celični kulturi z imunohistološkimi označevalci potrdili razvoj oocitov podobnih celic na zgodnejših razvojnih stopnjah, kar do sedaj iz matičnih celic jajčnika še ni bilo dokazano. Oocitov podobne celice je nekaterim raziskovalcem uspelo razviti iz matičnih celic, pridobljenih iz drugih organov oziroma tkiv (29,30). Blastocistam podobne strukture, ki so se razvile v celični kulturi površinskega ovarijskega epitela, so bile enako velike kot tiste, ki jih pridobimo z običajnim postopkom zunajtelesne oploditve. V nekaterih blastocistam podobnih celicah smo opazili celo za blastociste značilne strukture: notranjo celično maso, trofoektoderm in blastocistno votlino. Blastocistam podobne celice so najverjetneje nastale s partenogenetsko delitvijo oocitov podobnih celic ali pa z združevanjem dveh zarodnih matičnih celic.

Za neplodne ženske s POO je danes edina možnost, da imajo otroka, postopek OBMP z darovano jajčno celico ali pa posvojitev. Z raziskavami matičnih celic in novimi spoznanji se morda odpirajo nove možnosti zdravljenja neplodnosti pri ženskah s POO. Današnji izjemno uspešni postopki OBMP so plod približno 40-letnega razvoja in raziskav. Čeprav smo uspeli razviti oocite iz kulture ovarijskega površinskega epitela pri ženskah s POO, bo verjetno potrebno še veliko let raziskav, preden bomo morda lahko na takšen način zdravili neplodne bolnice s POO. Prve klinične raziskave s tega področja so se namreč pričele šele konec leta 2005 (31).

## Zaključki

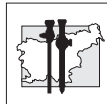
V prispevku smo empirično dokazali obstoj ovarijskih matičnih celic pri ženskah s POO, ki jih lahko pridobimo z dokaj preprostim laparoskopskim posegom. Razvoj oocitov podobnih celic in blastocist podobnih struktur, čeprav partenogenetsko razvitih, potrjuje obstoj matičnih celic v odraslem jajčniku. Te ugotovitve naj služijo kot nadaljnja spodbuda za intenzivno raziskovanje tega še dokaj neznanega področja, da bi v prihodnosti lahko zdravili neplodne bolnice s POO.

## Zahvala

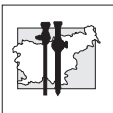
Brez nesebične pomoči sodelavcev prispevek ne bi mogel nastati, zato se avtorja iskreno zahvaljujeta: prof. dr. Antoninu Bukovskyemu z Univerze Tennessee, ZDA, prof. dr. Heleni Meden-Vrtovec, dr. med., višji svetnici z Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, celotnemu osebju skupine za oploditev z biomedicinsko pomočjo Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in celotnemu osebju operacijskega bloka Kliničnega oddelka za reprodukcijo Ginekološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

## Literatura

1. Meden-Vrtovec H. Prezgodnja menopavza: vzroki, diagnostika in zdravljenje. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 551–7
2. Meden-Vrtovec H, Levičnik A, Ihan A, Vizjak A. Avtoimunski vidiki prezgodnje menopavze. *Zdrav Vestn* 2009; 78: 151–6
3. Nippita TA, Baber RJ. Premature ovarian failure: a review. *Climacteric* 2007; 10: 11–22
4. Coulam CB, Adamson SC, Anegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 604–6
5. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF et al. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod* 2003; 18: 199–206
6. Rees M, Purdie D. Premature menopause. In: Rees M, Purdie D eds. *Management of the Menopause: The Handbook* (4th edn). London: Royal Society of Medicine Press Ltd, 2006; 142–9
7. Novosad JA, Kalantaridou SN, Tong ZB et al. Ovarian antibodies as detected by indirect immunofluorescence are unreliable in the diagnosis of autoimmune premature ovarian failure: a controlled evaluation. *BMC Womens Health* 2003; 3: 2
8. Goswami D, Conway GS. Premature Ovarian Failure. *Horm Res* 2007; 68: 196–202
9. Lindvall O. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 2003; 47: 279–87



10. Goldman S, Windrem M. Cell replacement therapy in neurological disease. *Phil Trans R Soc B* 2006; 36: 1463–75
11. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB: Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2004, 2: 20
12. Bukovsky A, Copas P, Virant-Klun I: Potential new strategies for the treatment of ovarian infertility and degenerative diseases with autologous ovarian stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 2006, 6: 341–65
13. Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 17
14. Irma Virant-Klun, Martin Stimpfel and Thomas Skutella. Ovarian pluripotent/multipotent stem cells and in vitro oogenesis in mammals. *Histol Histopathol* 2011; 26: 1071–82
15. Parte S, Bhartiya D, Telang J et al. Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cells Dev*. 2011, 20: 1451–64
16. Virant-Klun I, Zech N, Rožman 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
17. Liu Y, Wu C, Lyu Q et al. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 2007; 306: 112–20
18. Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells from bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303–15
19. Zou K, Yuan Z, Yang Z et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 5: 631–6
20. Virant-Klun I, Rožman P, Cvjetičanin B 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: 137–49
21. Gong SP, Lee ST, Lee EJ et al. Embryonic stem cell-like cells established by culture of adult ovarian cells in mice. *Fertil Steril* 2010; 93: 2594–601
22. Benaglia L, Somigliana E, Vighi V, Ragni G, Vercellini P, Fedele L. Rate of Severe Ovarian Damage following Surgery for Endometriomas. *Hum Reprod* 2010; 25: 678-82
23. Al-Azemi M, Bemal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D and Kenedy S. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2000; 15: 72–5
24. Garcia-Velasco JA, Mahutte NG, Corona J et al. Removal of endometriomas before in vitro fertilization does not improve fertility outcomes: a matched, case-control study. *Fertil Steril* 2004; 81: 1194–7
25. Garcia-Velasco JA, Somigliana E. Management of endometriomas in women requiring IVF: to touch or not to touch. *Hum Reprod* 2009; 24: 496–501
26. Somigliana E, Ragni G, Benedetti F, Borroni R, Vegetti W, Crosignani PG. Does laparoscopic excision of endometriotic ovarian cysts significantly affect ovarian reserve? Insights from IVF cycles. *Hum Reprod* 2003; 18: 2450–3
27. Suzuki T, Izumi S, Matsubayashi H, Awaji H, Yoshikata K, Makino T. Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005; 83: 908–13
28. Yu HT, Huang HY, Soong YK, Lee CL, Chao A, Wang CJ. Laparoscopic ovarian cystectomy of endometriomas: surgeons' experience may affect ovarian reserve and live-born rate in infertile patients with in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 152: 172–5
29. 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
30. 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

31. Bukovsky A, Gupta SK, Virant-Klun I et al.  
Study origin of germ cells and formation of new  
primary follicles in adult human and rat ovaries.  
In: Hou SX, Singh SR eds. *Germline Stem Cells*.  
New York: Humana Press, 2008; 233–65