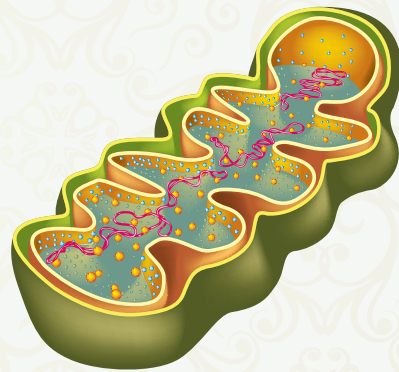


VAI TRÒ CỦA TY THỂ TRONG NOÃN VÀ NHỮNG VẤN ĐỀ LIÊN QUAN ĐẾN SỰ GIÀ HÓA CỦA NOÃN Ở BỆNH NHÂN HIỂM MUỘN VÀ VÔ SINH

Mai Công Minh Tâm

IVFMD, Bệnh viện Mỹ Đức



LỜI MỞ ĐẦU

Hiện nay, xu hướng trì hoãn việc sinh con ở nhiều phụ nữ trong độ tuổi 30-40 vẫn đang rất phổ biến với mong muốn dành nhiều thời gian hơn cho sự nghiệp và cho nhiều lý do khác. Tuy nhiên, việc này lại gây nên sự giảm khả năng sinh sản khi tuổi tác ngày càng gia tăng, đặc biệt sự suy giảm này tăng nhanh hơn sau 35 tuổi (Nelson và cs, 2013). Ngoài ra, hệ quả còn kéo theo suy giảm chất lượng noãn, chủ yếu do tăng khả năng lệch bội nhiễm sắc thể khi tuổi phụ nữ ngày càng tăng (Franasiak và cs, 2014). Có thể thấy, ngay cả khi đến với điều trị thụ tinh trong ống nghiệm thì khả năng thành công của những phụ nữ lớn tuổi này thường không cao do số lượng noãn vừa ít vừa đi cùng với chất lượng noãn kém dần đi (Stoop và cs, 2012).

Không giống như bao loại tế bào khác, noãn được xem là 1 loại tế bào lớn nhất và quyền năng nhất trong cơ thể người phụ nữ. Trong đó, bào quan đóng vai trò quan trọng nhất trong tế bào hay trong noãn, chính là ty thể hay còn gọi là tế bào ty thể. Ty thể được xem là nhà máy năng lượng chính của tế bào, giúp tổng hợp năng lượng ATP qua con đường phosphoryl oxy hóa và cung cấp năng lượng này cho tất cả các hoạt động sinh tổng hợp khác trong tế bào, đặc biệt là hoạt động phân bào. Về mặt cấu trúc, tế bào ty thể sở hữu bộ gen di truyền tương đối nhỏ gọn, được gọi là mtDNA (mitochondrial DNA) trong đó không có các cấu trúc protein histone bảo vệ bên cạnh không có những cấu trúc intron (cấu trúc gen vô nghĩa, không mã hóa cho bất kỳ amino acid nào tạo ra protein), và cũng chẳng có chứa những enzym sửa chữa DNA nào hết. Do vậy, mtDNA rất dễ tích lũy những đột biến và những ảnh hưởng gây mất đoạn ở mức độ cao so với cấu trúc khá an toàn của DNA trong nhân (Bentov và Casper,

2013; Scheibye-Knudsen và cs, 2015). Hơn nữa, ty thể chỉ thừa hưởng các yếu tố di truyền từ một phía, từ mẹ, do những protein của ty thể trong tinh trùng đều đã bị ubiquitin hoá (gây ức chế) và bị phân hủy sau khi đã tiến vào bên trong noãn (Kaneda và cs, 1995; Song và cs, 2014). Do vậy, có thể thấy vai trò của ty thể rất quan trọng đối tế bào noãn. Bất kỳ những tổn hại hay thay đổi tiêu cực đến ty thể đều có thể ảnh hưởng đến chất lượng noãn, cũng như ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh sản của người phụ nữ.

Bài viết này có mục tiêu mong muốn phân tích sâu hơn về mặt y học thực chứng về vai trò quan trọng của ty thể đối với noãn qua các khía cạnh:

- Học thuyết nút thắt cổ chai vật chất di truyền của DNA ty thể (mtDNA) từ giai đoạn tế bào mầm sinh dục đến giai đoạn tế bào noãn như thế nào?
- Vật chất di truyền mtDNA được truyền thế nào qua nhiều thế hệ và tính ổn định của hiện tượng này ra sao?
- Cuối cùng, các tế bào ty thể này phải chăng là tác nhân chính tác động đến sự già hóa hay suy giảm chất lượng của noãn và chức năng buồng trứng đối với những trường hợp hiếm muộn và vô sinh?

HỌC THUYẾT NÚT THẮT CỔ CHAI VẬT CHẤT DI TRUYỀN CỦA DNA TY THỂ TỪ GIAI ĐOẠN TẾ BÀO MẦM SINH DỤC ĐẾN GIAI ĐOẠN TẾ BÀO NOÃN NHƯ THẾ NÀO? (Stine và cs, 2017)

Sự sao chép tế bào ty thể bắt đầu ở tế bào mầm nguyên thủy (PGCs: primordial germ cells) và hiện tượng này tiếp tục xảy ra trong suốt giai đoạn sinh noãn sớm. Tuy nhiên, số lượng ty thể chỉ có thể gia tăng đáng kể ở kỳ sau của giai đoạn sinh noãn (St John, 2014) (Hình 1). Do vậy, số lượng tế bào ty thể ở tế bào mầm

nguyên thủy với khoảng vài trăm bản sao mtDNA khác nhau rõ rệt so với vài trăm ngàn bản sao ở noãn trưởng thành (Wai và cs, 2008; Otten và Smeets, 2015).

Trong suốt thời gian này, một mặt mỗi tế bào ty thể này rất dễ bị tác động gây đột biến của điều kiện bên ngoài xảy ra một cách nhanh chóng, mặt khác chúng còn phải duy trì khả năng chống lại sự thay đổi bộ gen của chính chúng thông qua một học thuyết nút thắt cổ chai về vật chất di truyền (hình 2). Học thuyết này được giới thiệu lần đầu tiên vào năm 1985 bởi nhóm nghiên cứu Hauswirth và Laipis, rồi sau đó được nhiều nhóm nghiên cứu khác bổ sung và hiệu chỉnh (Wai và cs, 2008; Johnston và cs, 2015) rồi xem xét lại (Mishra và Chan, 2014; Stewart và Chinnery, 2015). Học thuyết này cho rằng chỉ có một lượng rất nhỏ vật chất di truyền trên tổng số vật chất di truyền của các tế bào ty thể được truyền từ cá thể mẹ sang cho con (Hauswirth và Laipis, 1985). Mặc dù, cơ chế chính xác của hiện tượng này còn chưa được chứng minh rõ ràng, nhưng về cơ bản hiện tượng này được ghi nhận xuất hiện ở những tế bào mầm nguyên thủy, hơn nữa đây là kết quả của sự chọn lọc tự nhiên nhằm giữ lại những ty thể có mtDNA bình thường và loại bỏ những ty thể có bộ gen bị đột biến giúp cho quần thể ty thể trong tế bào đồng nhất hơn (Stewart và Chinnery, 2015; May Panloup và cs, 2016). Hơn nữa, các noãn bào bắt buộc phải trải qua hiện tượng này và càng tăng dần trong tiến trình của sự sinh noãn và sự hoàn chỉnh chất liệu bên trong noãn (Wai và cs, 2008; Bentov và cs, 2011).

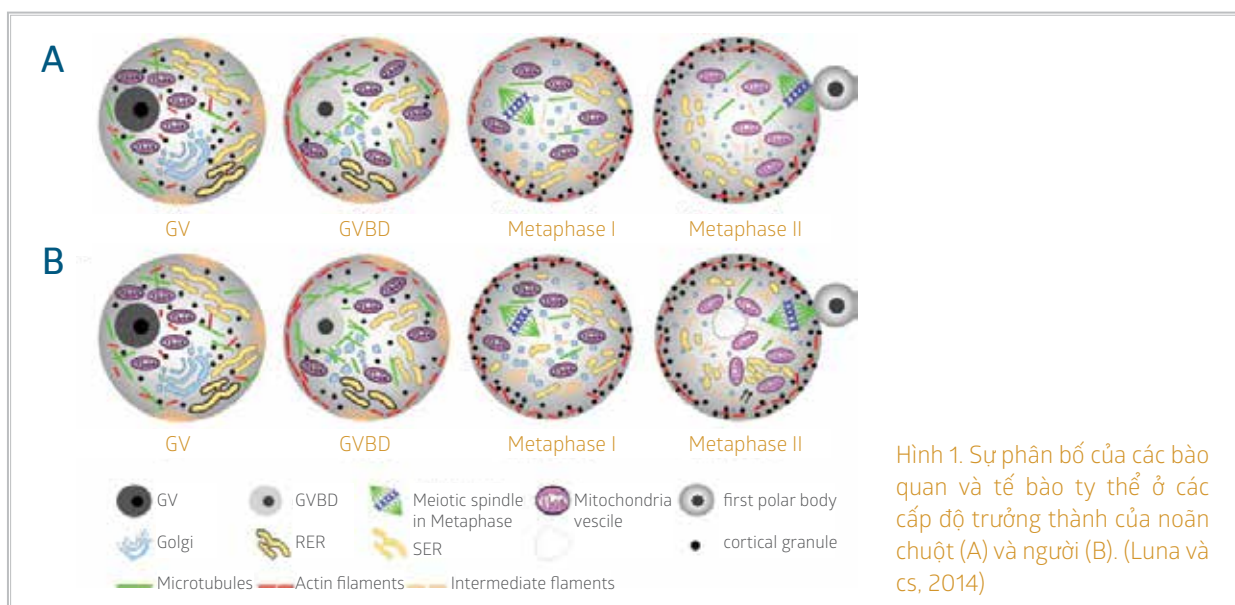
Một cách chi tiết hơn, một số phỏng đoán cũng cho rằng hiện tượng thắt cổ chai này thực chất đã luôn xảy ra trong suốt chu trình sống của một tế bào nang noãn. Bằng chứng dễ thấy nhất chính là sự thất thoát hay sự

mất bớt đi số lượng lớn những tế bào mầm nguyên thủy của nữ giới trong suốt quá trình phát triển của nang noãn, ngay từ lúc bắt đầu có sự giảm phân cho đến khi nang noãn được hình thành (Baker, 1963; Gougeon và cs, 1994). Tất cả những quá trình này dường như cần tiêu tốn rất nhiều năng lượng. Do đó, chỉ có khoảng 1/10 noãn bào mới có thể tồn tại và tiếp tục chặng đường thực hiện chức năng của mình ngay từ lúc mới sinh ra. Cụ thể hơn, tế bào noãn có số lượng ty thể bình thường càng nhiều, đồng nhất tính trạng bình thường càng nhiều thì khả năng tồn tại và phát triển sẽ tốt hơn so với những noãn bào chứa nhiều ty thể đột biến do sản xuất không đủ lượng năng lượng cần thiết cho các hoạt động sống của noãn bào.

VẬT CHẤT DI TRUYỀN mtDNA ĐƯỢC TRUYỀN QUA CÁC THỂ HỆ NHƯ THẾ NÀO VÀ TÍNH ỔN ĐỊNH CỦA HIỆN TƯỢNG NÀY RA SAO?

(Pascale và cs, 2016)

Về bản chất, tế bào ty thể của người chứa bộ gen ở dạng DNA vòng và mạch đôi với 16.569 cặp nucleotide (hay còn gọi là bp: base pairs) (Anderson và cs, 1981) và được sắp xếp dưới dạng nucleoprotein mà hoàn toàn không có thành phần bảo vệ là protein histone gắn kết với bộ gen (Sato và Kuroiwa, 1991; Legros và cs, 2004). Hơn nữa, lượng mtDNA của từng tế bào người cũng rất dao động, lên đến vài trăm ngàn bản sao ở noãn trưởng thành (Reynier và cs, 2001) và cũng có thể xuống thấp chỉ còn vài bản sao trong tinh trùng (May-Panloup và cs, 2003). Hơn nữa, sự truyền mtDNA chỉ theo đường từ mẹ cho con theo quy luật xảy ra ở hầu hết các sinh vật có phương thức truyền vật chất di



Hình 1. Sự phân bố của các bào quan và tế bào ty thể ở các cấp độ trưởng thành của noãn chuột (A) và người (B). (Luna và cs, 2014)

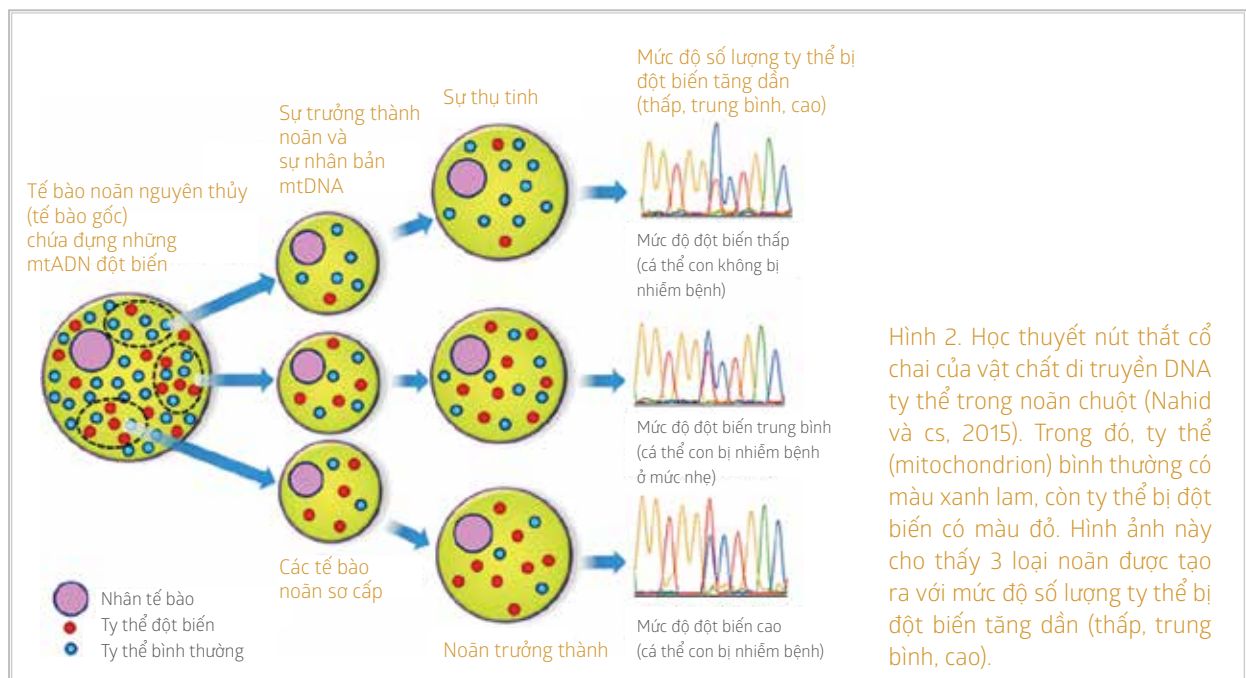
truyền qua noãn (Hutchison và cs, 1974; Giles và cs, 1980). Vài nghiên cứu gần đây cũng cho thấy có cơ chế giúp loại bỏ mtDNA từ bố (Sato và Sato, 2013; Carelli, 2015). Một trong số cơ chế đó có liên quan đến sự pha loãng thụ động vật chất di truyền do số lượng phân tử mtDNA giữa giao tử đực và giao tử cái luôn chênh lệch nhau (Luo và cs, 2013). Mặc dù vậy, mtDNA của tinh trùng cũng được tìm thấy trong hợp tử ở giai đoạn thụ tinh (Ankel Simons và Cummins, 1996; Cummins, 1998), nhưng lượng này sẽ nhanh chóng bị tiêu hủy khi phôi phát triển đến giai đoạn 4 tế bào theo một quá trình loại bỏ chủ động nào đó (Kaneda và cs, 1995). Thật vậy, mtDNA trong tinh trùng luôn được ubiquitin hóa (gây bất hoạt) trong suốt quá trình sinh tinh trùng (Sutovsky và cs, 1999, 2000), và sau đó ở giai đoạn thụ tinh, mtDNA lại được xuất hiện, rồi tiêu hủy trong noãn thông qua các quá trình ly giải protein trong tế bào chất (Sutovsky và cs., 1999; Sato và Sato, 2013). Sự tiêu hủy mtDNA từ bố như vậy luôn xảy ra trong bào tương noãn và trước khi quá trình phân hủy hoàn toàn cấu trúc mtDNA, nhằm đảm bảo không còn sự hiện diện của mtDNA từ bố (Nishimura và cs, 2006). Hiện tượng này dường như có tầm quan trọng với tần suất xảy ra thường xuyên với tính chất không thay đổi cho các vấn đề sinh lý và tiến hóa của tế bào, ngoại trừ một vài trường hợp hiếm xảy ra ở một số loài (Gyllenstein và cs, 1991; Zhao và cs, 2004) hay ở một số ca bệnh hiếm gặp trên người (Schwartz và Vissing, 2002). Nói một cách khác, noãn luôn can thiệp vào sự loại bỏ mtDNA từ bố, mặc dù vậy tình cờ cũng có một trường hợp cho thấy còn sự tồn tại của mtDNA từ bố

này trong những phôi bất thường ở dạng đa bội hay ở những noãn chất lượng kém (St John và cs, 2000). Điều này cho thấy chất lượng trứng dường như đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong sự duy trì hiện tượng đồng nhất mtDNA từ phía mẹ qua nhiều thế hệ.

TẾ BÀO TY THỂ PHẢI LÀ NGUYÊN NHÂN CHÍNH TÁC ĐỘNG ĐẾN SỰ GIÀ HÓA HAY GIẢM CHẤT LƯỢNG NOÃN VÀ CHỨC NĂNG BUỒNG TRỨNG ĐỐI VỚI NHỮNG TRƯỜNG HỢP HIẾM MUỘN VÀ VÔ SINH?

Trong chọn lọc tự nhiên, noãn quan tâm kỹ đến tế bào ty thể do đây là vấn đề sống còn của bất kỳ tế bào sinh học. Bởi lẽ, ty thể đóng vai trò cốt yếu trong chức năng hoạt động của noãn và thông qua quá trình đường phân, ty thể là một nhà máy cung cấp nguồn năng lượng ATP cho suốt quá trình phát triển của phôi giai đoạn tiền làm tổ. Nguyên nhân chính là sau sự thụ tinh, quá trình đường phân này bị giới hạn cùng với sự sao chép tế bào ty thể cũng bị ngăn lại bắt đầu từ giai đoạn noãn MII cho đến hết khi phôi nang thoát màng (Chappel, 2013).

Hiện nay, sự sai hỏng chức năng tế bào ty thể trong noãn được cho là nhân tố quyết định ảnh hưởng đến sự kém phát triển của noãn ở những bệnh nhân lớn tuổi thụ tinh trong ống nghiệm (Babayev và Seli, 2015). Ngoài ra, hàm lượng mtDNA ở những bệnh nhân lớn tuổi hoặc giảm dự trữ buồng trứng cho thấy thấp đáng kể so với hàm lượng mtDNA này trong noãn ở những phụ nữ trẻ tuổi hơn hoặc đang có dự trữ buồng trứng



Hình 2. Học thuyết nút thắt cổ chai của vật chất di truyền DNA ty thể trong noãn chuột (Nahid và cs, 2015). Trong đó, ty thể (mitochondrion) bình thường có màu xanh lam, còn ty thể bị đột biến có màu đỏ. Hình ảnh này cho thấy 3 loại noãn được tạo ra với mức độ số lượng ty thể bị đột biến tăng dần (thấp, trung bình, cao).

binh thường (Duran và cs, 2011; Murakoshiet và cs, 2013). Hơn nữa, lượng mtDNA này còn có mối tương quan đến khả năng thụ tinh của noãn, bằng chứng là những noãn không thụ tinh cho thấy có số lượng bản sao mtDNA rất thấp (Reynier và cs, 2001; Santos và cs, 2006). Ngoài ra, nồng độ năng lượng ATP trong noãn cũng có tương quan đến sự phát triển và tỷ lệ làm tổ của phôi (Van Blerkom và cs, 1995) do các noãn trưởng thành có chất lượng tốt đã tích lũy đủ hoặc dư thừa tế bào ty thể trong quá trình trưởng thành noãn, nhằm giúp cho phôi tiếp tục phát triển ở giai đoạn sớm (giai đoạn mà sự sao chép thêm tế bào ty thể đều đã bị ngăn chặn) (Babayev và Seli, 2015). Ở góc độ phân tử, khi giảm thiểu hoạt động ty thể cũng gây ra giảm thiểu sản xuất năng lượng ATP hoặc gây ra sai hỏng hoạt động sản xuất này, dẫn đến những hệ quả xấu sau này như gây mất đi quá trình phân ly nhiễm sắc thể trong giảm phân, hoặc ảnh hưởng xấu đến phát triển của phôi như trạng thái lệch bội nhiễm sắc thể hay giảm khả năng làm tổ (Van Blerkom, 2011; Eichenlaub Ritter, 2012).

KẾT LUẬN

Nói tóm lại, sự sinh noãn và sự hình thành nang noãn là 2 quá trình cực kỳ quan trọng đối với hoạt động sinh sản của chúng ta. Quá trình này đòi hỏi được cung cấp rất nhiều năng lượng ATP thông qua các phản ứng phosphoryl oxy hóa trong tế bào ty thể, trong bào tương noãn. Tế bào noãn là một tế bào lớn nhất trong cơ thể người có số lượng nhiều nhất ty thể (khoảng 200.000 bản sao), gấp một hoặc hai lần lượng này đối với tế bào sinh dưỡng cần cung cấp nhiều năng lượng như tế bào cơ hay tế bào thần kinh.

Trong quá trình hình thành noãn, tế bào mầm

nguyên thủy chỉ chứa vài bản sao ty thể, sau đó được nhân lên gấp nhiều lần đủ để truyền cho một cá thể mới. Học thuyết nút thắt cổ chai vật chất di truyền ở ty thể theo sự chọn lọc ngẫu nhiên và chỉ bảo tồn những dạng thuần di truyền từ mẹ và loại trừ các ty thể bị đột biến, khác với tính trạng từ mẹ nhằm thuần hóa cho quần thể này. Tuy nhiên, đây là điểm yếu rất lớn cho quá trình sinh sản, do tuổi mẹ qua nhiều thế hệ ngày càng tăng thì tăng khả năng có nhiều bản sao ty thể bị đột biến tích lũy và gia tăng trong noãn. Điều này sẽ làm giảm chất lượng noãn ở thế hệ sau khi không còn chứa ty thể ở dạng thuần hoang dại mà sẽ chuyển dần sang dạng dị hợp (hoang dại trộn lẫn dạng bị đột biến) hoặc một lúc nào đó, thuần toàn bộ là các ty thể bị đột biến ảnh hưởng đến hoạt động sinh năng lượng cho hoạt động sống của noãn.

Hiện nay và trong tương lai, các cơ chế phân tử liên quan đến chu trình sống và chức năng của ty thể đang được nghiên cứu rất mạnh mẽ nhằm cung cấp đầy đủ thông tin về các tác động gây đột biến ty thể của noãn, bên cạnh việc phòng ngừa cho nhiều thế hệ sau này. Với sự phát triển của nhiều kỹ thuật chẩn đoán hiện đại, noãn hoặc phôi có thể phát hiện được hàm lượng và chất lượng mtDNA của ty thể dễ dàng hơn, giúp cho công tác điều trị sau này. Cuối cùng, các phương án chữa trị xâm lấn vào chất lượng noãn cũng có thể là những hướng đi có nhiều triển vọng trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Luna Mao, Hangying Lou, Yiyun Lou, Ning Wang, Fan Jin. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online* 2014; 28:284-299.
2. Nahid Akhtar Khan, Periyasamy Govindaraj, Angamuthu Kannan, Meena, Kumarasamy Thangaraj. Mitochondrial disorders: Challenges in diagnosis & treatment. *Indian Journal of Medical Research* 2015;141:13-26.
3. Pascale May-Panloup, Lisa Boucrot, Juan-Manuel Chao de la Barca, Valérie Desgueret-Dumas, Véronique Ferré-L'Hottelier, Catherine Morinère, Philippe Descamps, Vincent Procaccio, và Pascal Reynier. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. *Hum Reprod Update* 2016; 22:725-743.
4. Stine Gry Kristensen, Susanne Elisabeth Pors, Claus Yding Andersen. Improving oocyte quality by transfer of autologous mitochondria from fully grown oocytes. *Hum Reprod* 2017; 32:725-732.
5. Yaakov Bentov và Robert F. Casper. The ageing oocyte - can mitochondrial function be improved? *Fertil and Steril* 2013; 99:18-22.

Tiếp theo
→
trang 41

KỸ THUẬT TRƯỞNG THÀNH TRỨNG NON TRONG ống NGHIỆM

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, và Gilchrist RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*, 2010;25(12):2999-3011.
2. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertility & Sterility* 1991;55:109-13.
3. Chan RC, Uzelac PS, Nargund G. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertility and Sterility* 2013;99:173-81.
4. Chan RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction* 2000;15: 165-170.
5. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2001;76:936-42.
6. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstetrics and Gynecology* 2002;100:665-70.
7. Fadini R, Dal Canto MB, Mignini Renzini M, Brambilla SC, Comi R, Fumagalli D, et al. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. *Reproductive Biomedicine Online* 2009;19:343-51.
8. Fadini R, Mignini Renzini M, Guarneri T, Dal Canto M, De Ponti E, Sutcliffe A, et al. Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from in vitro or in vivo matured oocytes in in vitro maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. *Human Reproduction* 2012;27:3601-8.
9. Liu LL, G. Qian Y, Mao Y, và Ding M. Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility* 2003;80(2):447-449.
10. Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). *Biology Reproduction* 2011;85:1252-1259.
11. Maman E, Yung Y, Kedem A, Yerushalmi GM, Konopnicki S, Cohen B, Dor J, Houvritz A. High expression of luteinizing hormone-releasing peptide messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertility and Sterility* 2012;97:592-598.
12. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001;122:587-92.
13. Nivet AL, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 2012;143:165-171.
14. Paulson RJ, Fauser BCJM, Vuong LTN, và Doody K. Can we modify assisted reproductive technology practice to broaden reproductive care access? *Fertility and Sterility* 2016;105(5):1138-1143.
15. Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. the activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935;62:665-75.
16. Segers I, Adriaenssens T, Wathlet S, Smits J. Gene expression differences induced by equimolar low doses of LH or hCG in combination with FSH in cultured mouse antral follicles. *J Endocrinol* 2012;215:269-280.
17. Shalom-Paz E, Almog B, Wiser A, Levin I, Reinblatt S, Das M, et al. Priming in vitro maturation cycles with gonadotropins: salvage treatment for nonresponding patients. *Fertil Steril* 2011;96:340-3.
18. Shalom-Paz E, Holzer H, Son W, Levin I, Tan SL, Almog B. PCOS patients can benefit from in vitro maturation (IVM) of oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;165:53-6.
19. Siristatidis CS, Vrachnis N, Creatsa M, Maheshwari A, Bhattacharya S. In vitro maturation in subfertile women with polycysticovarian syndrome undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;10:CD006606.
20. Soderstram-Anttila V, Salokorpi T, Pihlaja M, Serenius-Sirve S, Suikkari AM. Obstetric and perinatal outcome and preliminary results of development of children born after in vitro maturation of oocytes. *Hum Reprod* 2006;21:1508-13.
21. Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2000;15:747-51.
22. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994;62:353-62.
23. Walls ML, Hunter T, Ryan JP, Keelan JA, Nathan E, Hart RJ. In vitro maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: a comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. *Hum Reprod* 2015;30:88-96.
24. Zhang M, Su YQ, Sugura K, Wigglesworth K, Xia G, và Eppig JJ. Estradiol Promotes and Maintains Cumulus Cell Expression of Neurotrophic Peptide Receptor 2 (NPR2) and Meiotic Arrest in Mouse Oocytes In Vitro. *Endocrinology* 2011;152(11):4377-4385.