

Dojrzewanie oocytów *in vitro* (IVM) Aspekty kliniczne

Dr R. Faúndez

Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu
Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW

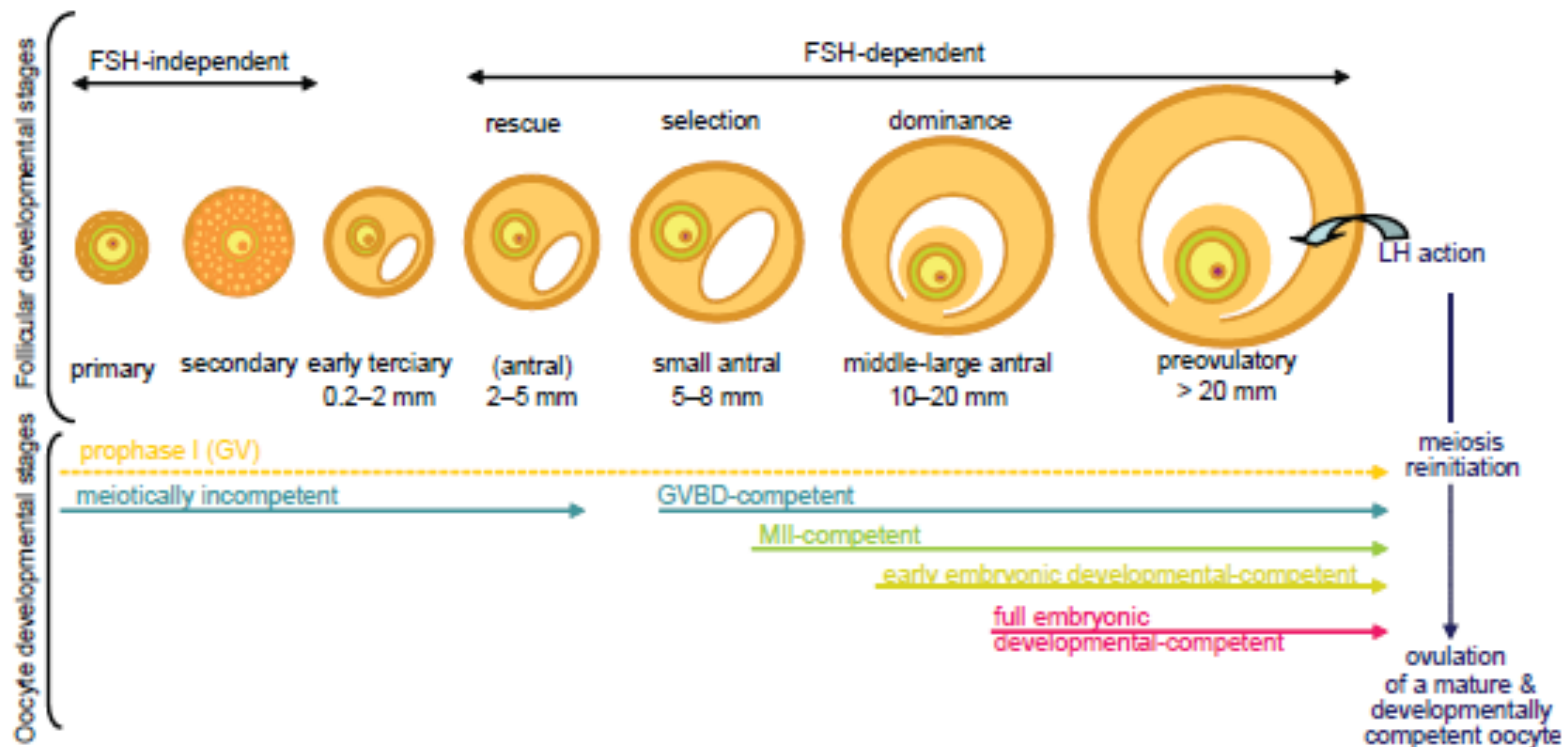


Fig 9.1 Inter-relationship of in vivo follicular and oocyte developmental stages. The earliest stages of follicular growth up to early antral stage occur independently of FSH stimulus. Antral follicles are rescued from atresia by the FSH action, which stimulates few antral follicles to growth, followed by a selection and a further growth of a single dominant follicle destined to ovulate. During this period, oocytes are kept arrested at prophase I, germinal vesicle (GV) stage. Oocyte developmental competence in humans is gradually acquired throughout folliculogenesis. At the earliest stages of folliculogenesis, oocytes are meiotically incompetent due to intrinsic oocyte factors. The meiotically competent oocytes enclosed in antral follicles are arrested at the GV stage because of inhibitory factors present in follicle fluid and derived from somatic cells. Upon further development, the oocyte acquires the capability to complete nuclear maturation. This is followed by a further period of cytoplasmic development in which oocytes acquire the capability to sustain early embryonic development post-fertilization. At the end of follicle growth, oocytes have attained the potential to sustain full embryonic development. Therefore, although oocytes have acquired the potential to complete nuclear maturation at an earlier stage of folliculogenesis, oocytes, cytoplasmic maturation is completed only by the end of follicle development.

Prematuration

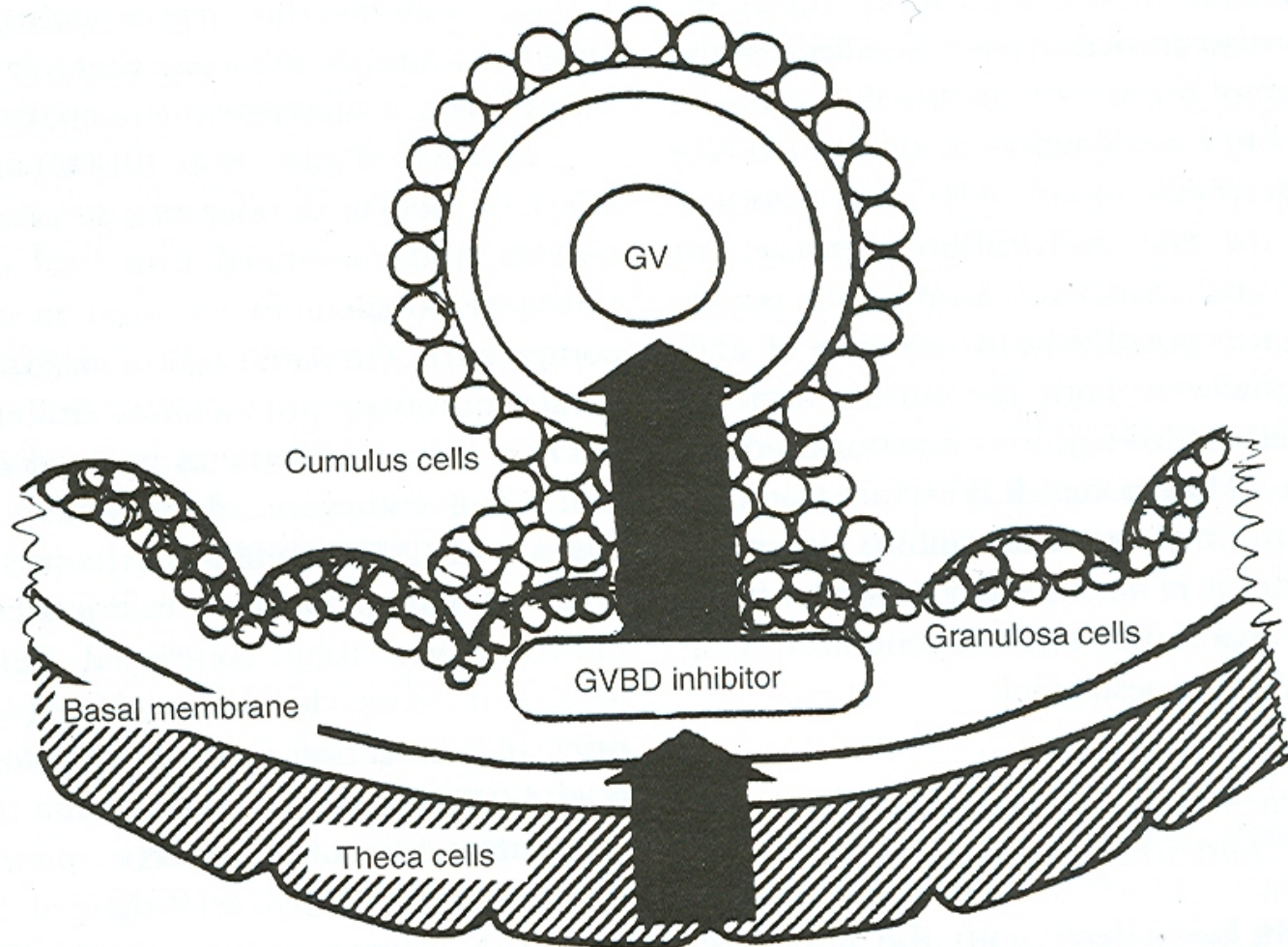


Fig. 4.9. Interaction between granulosa and theca cells in the inhibition of meiotic resumption

Development of a culture system for COCs from small antral follicles

There is good rationale to schedule immature oocyte retrieval before the intraovarian selection processes have taken place or after a short treatment course of FSH. When targeting 6–12-mm diameter follicles for IVM, these follicles would in vivo still undergo a growth phase of 4–5 days before ovulation. Hence, a prolonged ‘prematurational system’ could be beneficial for IVM.

Oocyte in vitro maturation

- Although oocyte nuclear and cytoplasmic maturation can proceed independently from each other, both processes need to be coordinated to ensure developmental competence.
- Therefore, the intimate transzonal oocyte must be kept patent for transfer of regulatory substances between the two cellular compartments.
- Keeping the oocyte meiotically arrested (by using that arrest the meiosis process) and providing growth factors and hormonal supplements to sustain completion of the oocyte's cytoplasmic maturation could theoretically lead to an improvement of development after fertilization. This strategy is actually pioneered in bovine and human oocytes.
- Safety restricts the use of protein sources from other species in human IVMmedia. Serum substitutes might be found necessary to cover the 'serum functions.
- The presence of steroids in the culture medium might be important for the maintenance of intercellular contacts (estrogens and progesterone) and for the oocyte's cytoplasmic maturation.

Oocyte in vitro maturation

- It was proved that r-hCG and r-hFSH in IVM media are essential components during the in vitro prematuration phase
- Additions of a meiosis-activating sterol, growth hormone, activin/inhibin ratios or enhancers of glutathione synthesis in the cytoplasm are possible approaches towards increased cytoplasmic maturation.

Steps for establishing IVM in Human

- Owing to the large interspecies differences in regulation of meiosis, it would advocate a stepwise approach to the development of 'robust IVM' in the human.
 - ❖ In a first step, safety is tested on the reinitiation of meiosis by performing karyotyping of MII oocytes. If safe, matured oocytes are injected with sperm and the aneuploidy rate tested in day 3 embryos with state-of-the-art technology.
 - ❖ Further emphasis should be placed on blastocyst quality obtained after IVM, and, finally, transferred embryos should be monitored closely during implantation.
 - ❖ As with all new techniques in ART, a registry for all children born has to be set in place.

Dojrzewanie *in vitro* oocytów ludzkich (IVM) Aspekty podstawowe i zastosowania kliniczne

R. Faundez^{1,2}, O. Sikorska¹, T. Rokicki¹, T. Dworniak¹,
Y. Barak¹

¹InviMed Europejskie Centrum Macierzyństwa, Warszawa

²Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie

Czynniki wpływające na dojrzewanie *in vitro* oocytów

- Pochodzenie oocytu – izolowane z bardzo małych pęcherzyków, są niekompetentne
- Atrezja – zdolność rozwojowa maleje
- Stymulacja hormonalna – polepsza rozwój oocytów po zapłodnieniu
- Odpowiedni kontakt oocyt-wzgórek jajonośny – zapewnia dobry rozwój
- Prawidłowy przebieg dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego
 - Synteza mRNA i białek
 - Potranslacyjna regulacja białek
 - Przemieszczenia organelli cytoplazmatycznych
 - Zmiany w transporcie metabolitów przez błonę
- Dojrzewanie jądrowe i cytoplazmatyczne muszą być całkowicie zintegrowane dla zapewnienia:
 - Zapłodnienia
 - Aktywacji genomu zarodkowego
 - Rozwoju do stadium blastocysty
 - Implantacji i dalszego rozwoju zarodkowego po implantacji

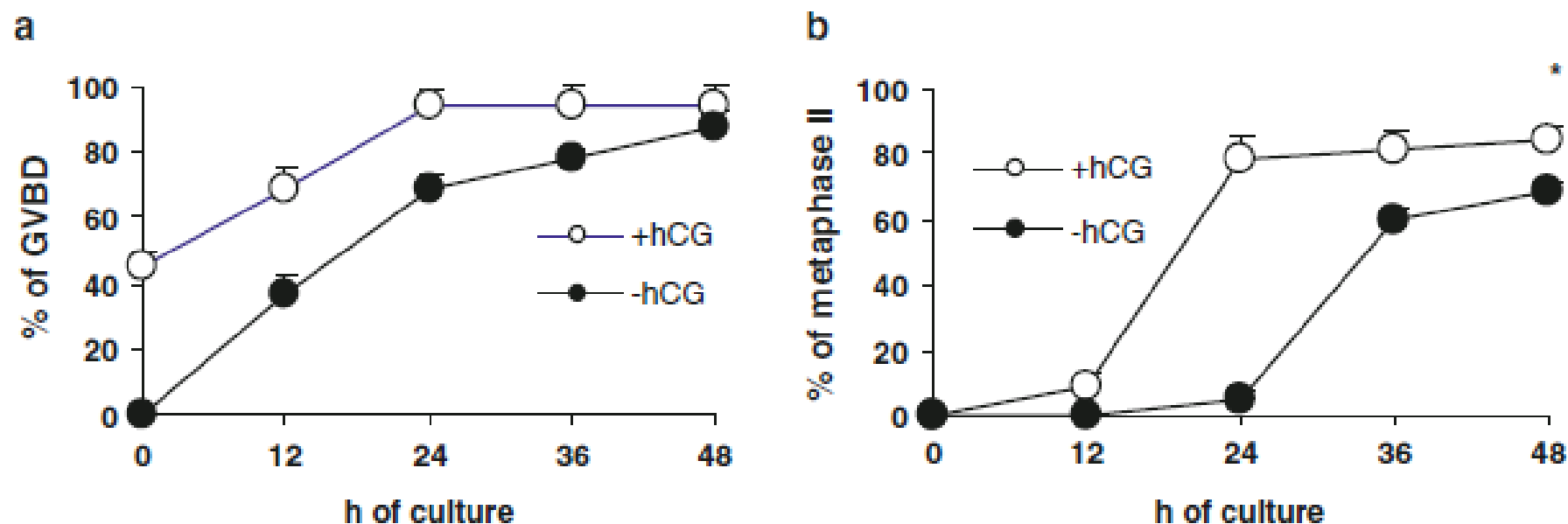


Fig. 2 The time course of human oocyte maturation during culture in vitro. (a) There were $46.2\% \pm 5.2$ of GVBD oocytes at the time of retrieval in HCG-primed group. The final percentages of GVBD were not different between the oocytes retrieved from the HCG-primed group. (b) There were $78.2\% \pm 7.1$ of mature oocytes at 24 h after culture in HCG-primed group. The final percentages of oocyte maturation were significantly different between the oocytes retrieved from the HCG-primed group (*dash-filled circle dash*) and the non-hCG-primed (*dash open circle dash*) group (total of 183 oocytes). Asterisk indicates significant difference between two groups at the time point (at least $P < 0.05$) (Chian et al. [38])

Wskazania do IVM

- Pierwotnie u pacjentek z PCO, u których nie można było przeprowadzić cykli IVF
- U kobiet wykazujących wysoką liczbę pęcherzyków jamistych (AFC - Antral Follicle Count), gdzie istnieje ryzyko występowania zespołu hiperstymulacji jajnikowej (OHSS) (Le Du & R Frydman, Hum Reprod 2005, Schröder, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003)
- U kobiet z regularnym cyklem i normalnymi wyglądającymi jajnikami i u niepłodnych par z przyczyną czynnika męskiego - obniżenie kosztów leczenia z IVF
- U kobiet słabo reagujących na stymulację hormonalną (poor responder)
- Rescue ICSI po IVM oocytów niedojrzałych pochodzących ze stymulowanych cykli (Liu, Fertil Steril 2003)
- Niewytłumaczalna niska jakość otrzymywanych zarodków (Tan, J Gynecol Obstet Biol Reprod 2003)
- Donacja oocytów (Tan, International Symposium on IVM, Berlin 2004)
- Przechowywanie oocytów przed owariektomią (Oktay, The Lancet 2004) lub przed chemioterapią (Rao i wsp., The Lancet 2004)

Przygotowanie do IVM

- Cykl naturalny
 - Niepotrzebne - bezpieczny zabieg, niskie koszty
- Cykl ze stymulacją
 - FSH priming - 150 jm
 - ❖ Krótka stymulacja FSH (od 3-5 dc) korzystna u pacjentek z PCO i PCOS (Mikkelsen i wsp., 2001)
 - Cykl z hCG
 - 10.000 jm hCG 36 godz. przed OPU powoduje wzrost % dojrzałych oocytów u kobiet z PCO i PCOS
- U pacjentek z PCO stymulacja z FSH i hCG nie daje lepszych efektów.
- Stymulacja z FSH u kobiet z PCO wzmacnia się po stosowaniu leków zwiększających wrażliwość na insulinę

Natural Cycle IVF/M (Lim-Chian Protocol)

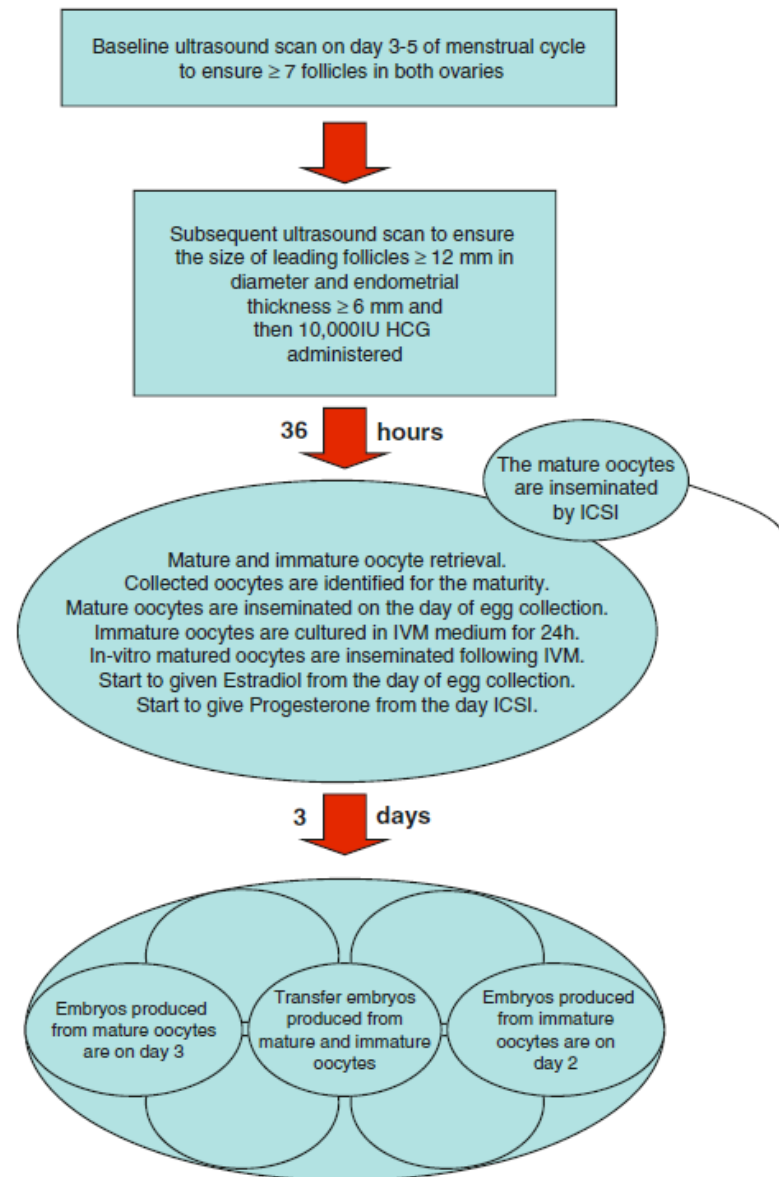


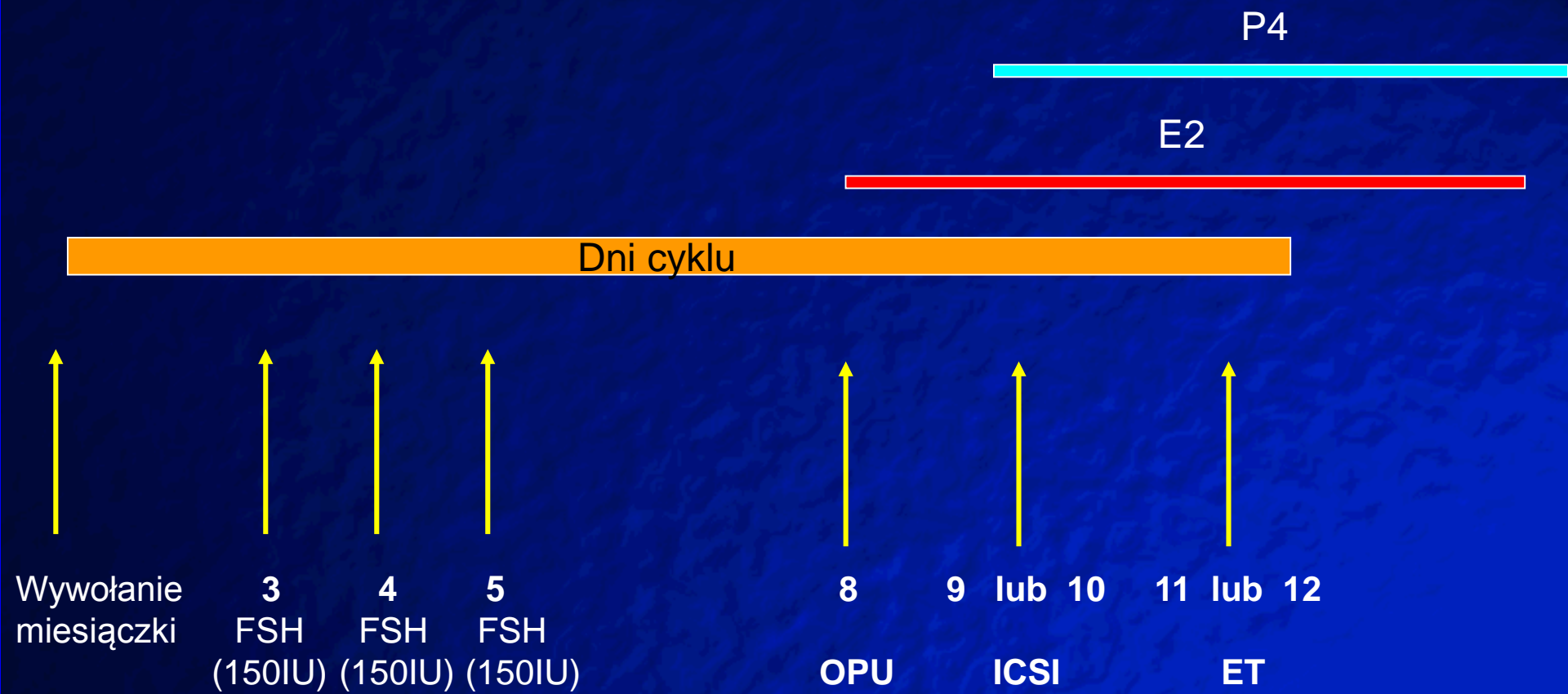
Fig. 3 Detailed protocol for natural-cycle IVF combined with in vitro maturation (Lim-Chian protocol) (Lim et al. [86])

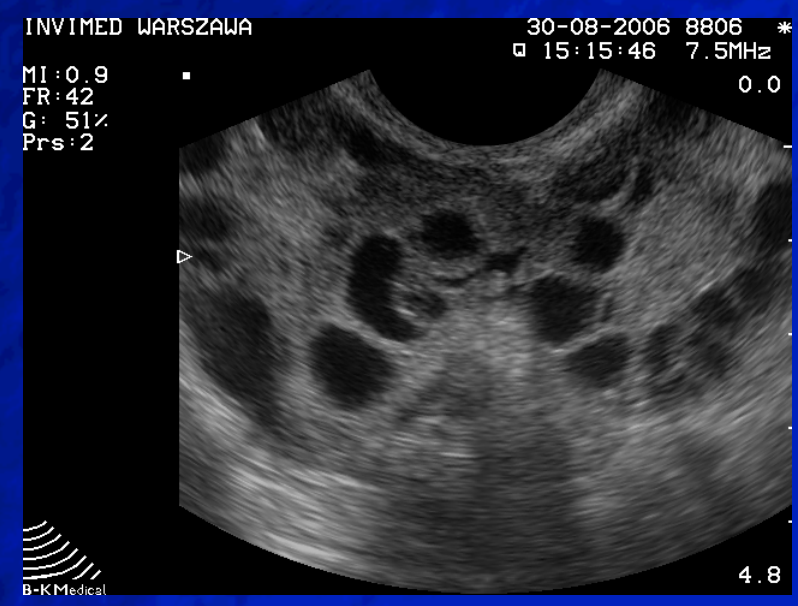
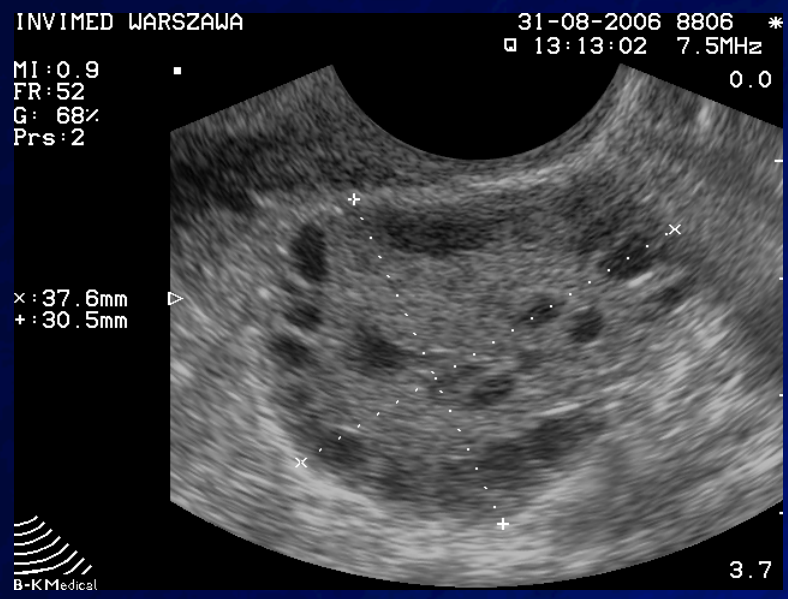
InviMed

IVM 2006 - 2008

Parametry	IVM	ICSI	P
Liczba pacjentek	94	118	-
Liczba cykli	118	122	-
Średnia wieku pacjentek	29,6±3,5	30,5 ±3,8	>0,05
BMI (kg/m ²)	23,6±4,8	21,1 ±7,3	>0,05
Średnia wieku pacjentów	32,3± 4,9	33,6±6,2	>0,05
Czynnik męski (WHO) %	26,8	52,3	<0,05

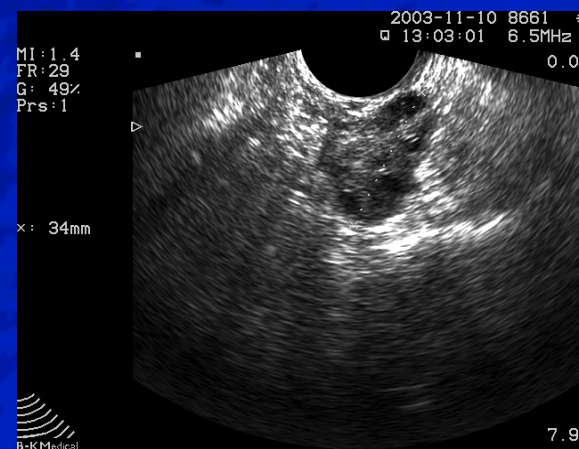
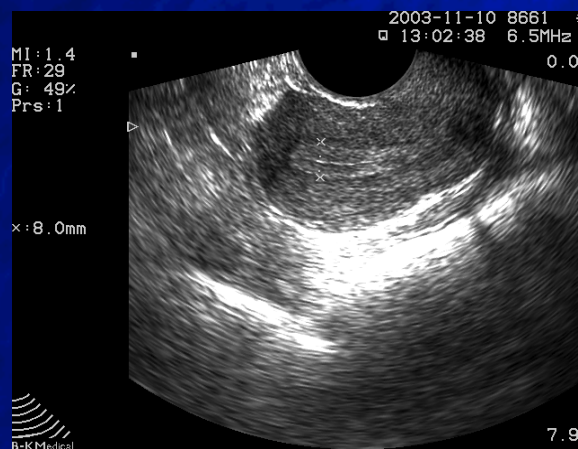
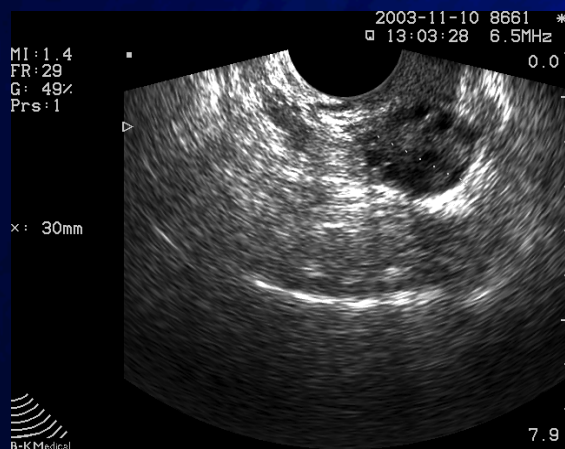
IVM – protokół kliniczny





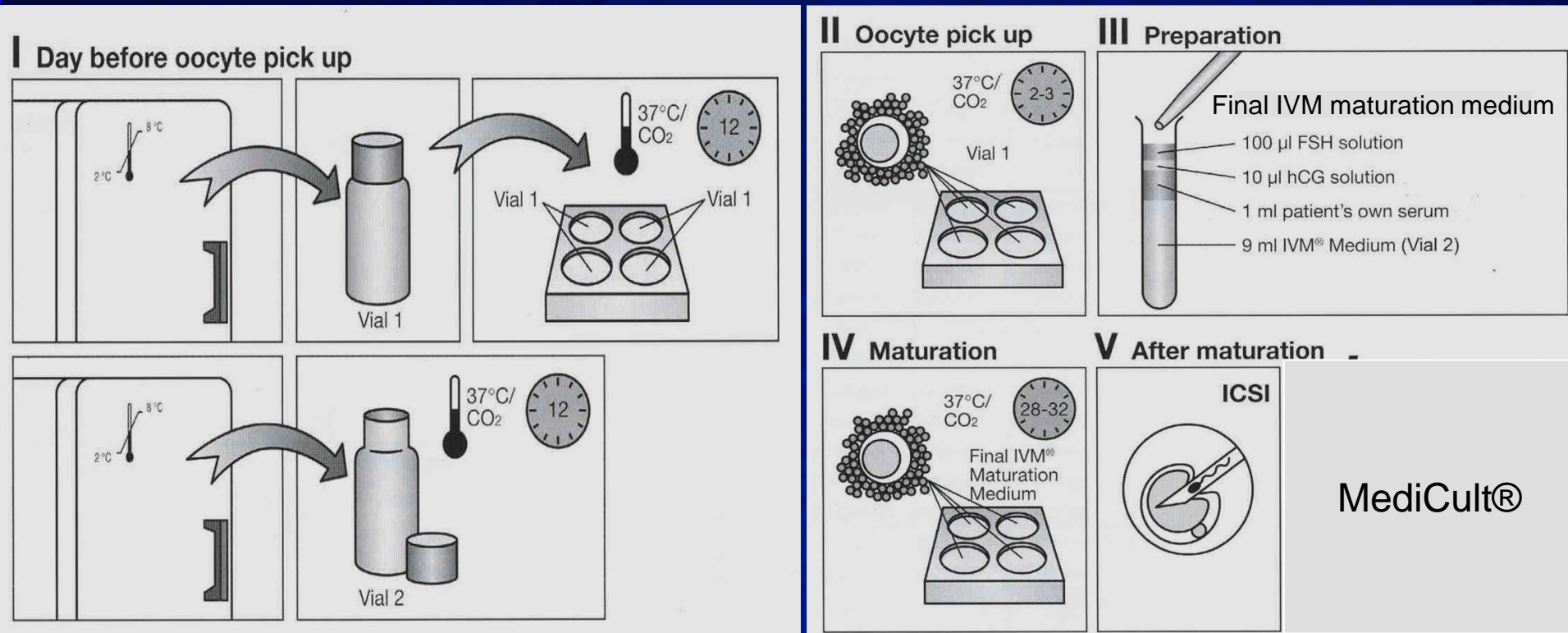
Punkcja w cyklu IVM

- zwykle dzień 8-9 cyklu
- pęcherzyk/pęcherzyki dominujące są średnicy 10-12 mm endometrium ≥ 5 mm
- w dniu punkcji pacjentka oddaje krew w celu uzyskania osocza koniecznego do „Final Maturation Medium”





IVM System (protokół laboratoryjny)



OPU



Denudacja



ICSI



ET



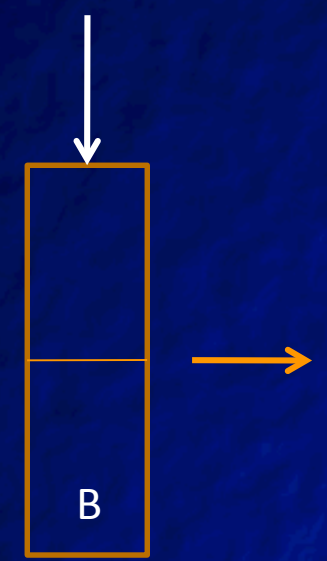
LAG medium
2 – 3 h

IVM medium
26 h

SPM
2 h

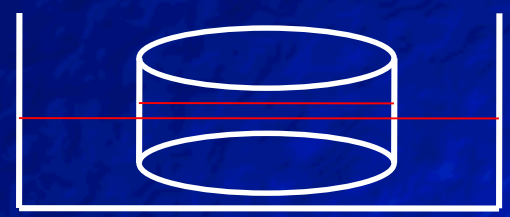
ISM
42-44 h

50 μ l
Roztw. A
Menopur



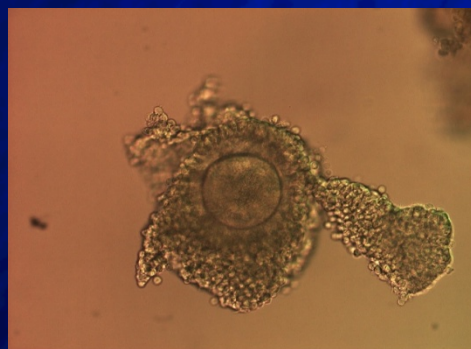
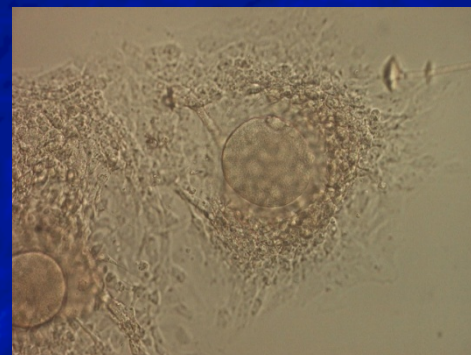
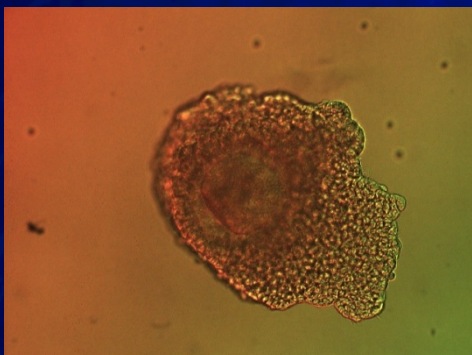
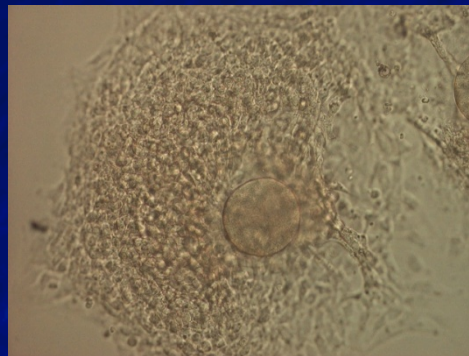
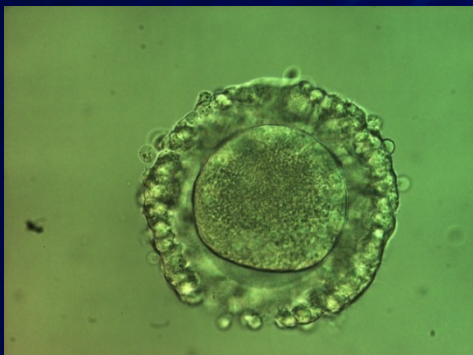
4,95 ml

Oocyte Maturation Medium



1 ml w studzience roztw B
2 ml OWM w zewnętrznej części płytki

Niedojrzałe i dojrzałe oocyty po IVM



COCs w dniu OPU i 30 godz. po IVM

Parametry	n (%)
Dzień OPU	
Liczba izolowanych COCs	1126
Średnia liczba izolowanych COCs /cykl	9,5±6,1
Oocyty otoczone komórkami ziarnistymi	1009 (89,6)
Oocyty bez kumulusa	55 (4,9)
Zdegenerowane oocyty	62 (5,5)
Stadium dojrzewania 30 godz. po IVM	
Liczba COCs	1121
GV	136 (12,1)
MI	233 (20,8)
MII	630 (56,2)
Zdegenerowane oocyty	122 (10,9)

COCs – Kompleksy oocyt-wzgórek jajonośny; OPU – Punkcja pęcherzyków jajnikowych
 GV – Pęcherzyk zarodkowy; MI - Metafaza I; MII – Metafaza II

Zapłodnienie w dniu 1 i 2

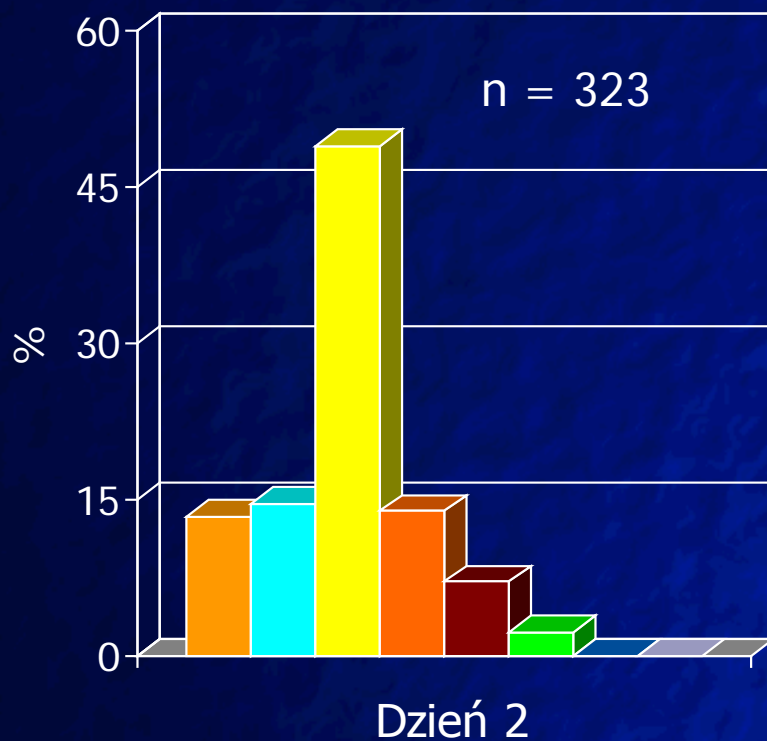
Parametry	IVM (%)	ICSI (%)	P
Dzień 1			
Nastrzykiwane oocyty	657	1122	-
2 PN	507 (77,2)	877 (78,2)	> 0,05
3 PN	22 (3,3)	17 (1,5)	<0,05
Dzień 2			
Nastrzykiwane oocyty	37	-	-
2 PN	26 (62,2)	-	-
3 PN	0 (0)	-	-
Ogółem dzień 1 + 2			
Nastrzykiwane oocyty	694	1122	-
2 PN	533 (76,8)	877 (78,2)	>0,05
3 PN	22 (3,2)	17 (1,5)	<0,05

Zarodki po IVM i ICSI

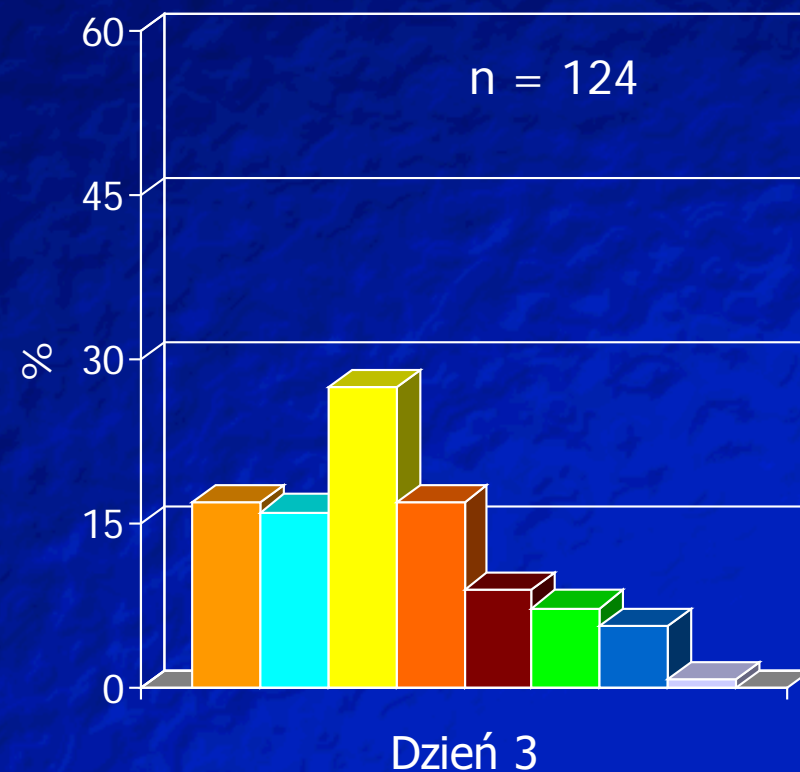
Parametry	IVM (%)	ICSI (%)	P
Ogólna liczba zapłodnionych oocytów (2PN)	533	894	-
Zamrożone oocyty w stadium 2PN	48	160	-
Oocyty w stadium 2PN pozostawione w hodowli	485	717	-
Podzielone zarodki	448 (92,4)	711 (99,2)	>0,05
Średnia jakość zarodków	1,5±0,4	1,4±0,4	>0,05

Rozwój zarodków po IVM

Liczba blastomerów



Liczba blastomerów



Transfer zarodków w dniu 2 lub 3

Parametry	IVM n	ICSI n	P
Dzień 2			
Liczba transferów	103	97	-
Liczba transferowanych zarodków	250	196	-
Średnia liczba transferowanychzarodków	2,3±0,9	2,0±0,6	>0,05
Średni stopień jakości zarodków	1,4±0,4	1,3±0,4	>0,05
Średni stan rozwoju zarodków (bl)	3,9±1,2	4,6±1,3	>0,05
Dzień 3			
Liczba transferów	10	25	-
Liczba transferowanych zarodków	16	39	-
Średnia liczba transferowanychzarodków	2,3±0,7	1,9±0,6	<0,05
Średni stopień jakości zarodków	1,6±0,5	1,3±0,3	<0,05
Średni stan rozwoju zarodków (bl)	4,5±2,0	7,8±1,7	<0,01

IVM 2006 - 2008

Parametry	IVM	ICSI	P
Liczba pacjentek	94	118	-
Liczba cykli	118	122	-
Liczba transferów	113	122	-
β -HCG +	31	68	-
% / cykl	26,3	55,7	<0.01
% / ET	27,4	55,7	<0.01
% / pacjentkę	33,0	57,6	<0,01
% ciąży klinicznych/cykl	22,1	48,3	<0,01
% ciąży klinicznych/ET	23,0	48,3	<0,01
% ciąży klinicznych/pacjentkę	27,7	50,0	<0,01
% implantacji	18,0	32,0	<0,01

Zalety i wady IVM

■ Zalety

- Cykl „bezpieczny”
- Bez zastosowania stymulacji lub z minimalną stymulacją
- Możliwość wykonania kilku cykli u tej samej pacjentki w skali roku
- Niższe koszty

■ Wady

- Trudniejszy od strony klinicznej i embriologicznej
- Bardziej nieprzewidywalny
- Niższa skuteczność

IVM – McGill University

- IVF - CPR < 35 lat 58.9% - ogółem 53.6%
- IVM - CPR < 35 lat 36,0% - > 35 lat 38,0%
- Wskazania do IVM
 - Pacjentki, które chcą unikać kłopotów związanych wysokimi kosztami i ryzykiem stymulacją gonadotropin
 - Najlepsze kandydatki to kobiety :
 - w wieku <38 lat, które przez USG wykazują dużą liczbę pęcherzyków jajnikowych
 - narażony na ryzyko występowania OHSS lub które wykazały w poprzednich cyklach OHSS (1,9%)
 - wielokrotnie produkują po IVF zarodki o niskiej jakości
 - słabo odpowiadające na stymulację hormonalną (poor responder)
 - O niewyjaśnionych przyczynach niepłodności
 - Zagrożone utratą płodności

IVM cycles with and without in-vivo matured oocytes retrieved

Table 1. Characterization of human chorionic gonadotrophin (HCG)-primed in-vitro maturation (IVM) cycles in groups 1 and 2.

<i>Parameter</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>
No. of patients	28	29
Age (years)	31.7 ± 3.9	32.4 ± 2.9
Duration of infertility (years)	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.3
Size of largest follicle at retrieval; range (mm)	11.3 ± 2.9 ^a ; 7–16	9.1 ± 2.3 ^a ; 6–13
Endometrial thickness at retrieval (mm)	8.4 ± 1.7	8.7 ± 1.9
Oocyte retrieval day	13.1 ± 2.9	12.9 ± 1.7

Group 1: HCG-primed IVM cycles in which in-vivo matured oocytes were collected; Group 2: HCG-primed IVM cycles in which no in-vivo matured oocytes were collected. Values are mean ± SD, unless otherwise stated. Values with the same superscript letter are significantly different: ^a*P* < 0.05.

IVM cycles with and without in-vivo matured oocytes retrieved

Table 2. Clinical outcome in human chorionic gonadotrophin (HCG)-primed in-vitro maturation (IVM) cycles in group 1 and 2.

<i>Outcome</i>	<i>Group 1 (30 cycles)</i>	<i>Group 2 (30 cycles)</i>
No. of oocytes retrieved (mean \pm SEM)	629 (20.9 \pm 8.6)	579 (19.3 \pm 10.7)
No. of MII-stage oocytes collected (%)	91 (14.5)	0 (0.0)
No. of oocytes cultured	538	579
No. of oocytes matured <i>in vitro</i> (%)	365 (67.8)	363 (62.7)
Total no. of oocytes matured (%)	456 (72.5)	363 (62.7)
No. of oocytes fertilized (%)	325 (71.3) ^a	315 (86.8) ^a
No. of embryos cleaved (%)	278 (85.5)	278 (88.3)
No. of embryos transferred (mean)	110 (3.8)	113 (3.8)
No. of clinical pregnancies (%)	12 (40.0)	7 (23.3)
No. of implantations (%)	13 (11.8)	9 (8.0)

Group 1: HCG-primed IVM cycles in which in-vivo matured oocytes were collected; Group 2: HCG-primed IVM cycles in which no in-vivo matured oocytes were collected.

Values with the same superscript letter are significantly different: ^a*P* < 0.01.

IVM cycles with and without in-vivo matured oocytes retrieved

Table 3. Embryological details of human chorionic gonadotrophin (HCG)-primed in-vitro maturation (IVM) cycles in group 1 and group 2.

<i>Parameter</i>	<i>Group 1 (629 oocytes)</i>			<i>Group 2 (579 oocytes)</i>		
	<i>Retrieval day</i>	<i>Day 1</i>	<i>Day 2</i>	<i>Retrieval day</i>	<i>Day 1</i>	<i>Day 2</i>
No. of MII oocytes (%)	91 (14.5)	211 (39.2)	154 (28.6)	0 (0.0)	210 (36.3)	153 (26.4)
No. 2PN oocytes (%)	68 (74.7)	165 (78.2)	92 (59.7) ^d	0 (0.0)	181 (86.2)	134 (87.6) ^d
No. of cleaved oocytes (%)	65 (95.6)	156 (94.5)	57 (62.0) ^e	0 (0.0)	162 (89.5)	116 (86.6) ^e
No. of good quality embryos (%)	47 (69.1) ^a	69 (41.8) ^{a,b}	12 (13.0) ^b	0 (0.0)	82 (45.3) ^{a,c}	25 (18.7) ^c

Group 1: HCG-primed IVM cycles in which in-vivo matured oocytes were collected; Group 2: HCG-primed IVM cycles in which no in-vivo matured oocytes were collected; MII = metaphase II; 2PN = 2 pronucleate.

Values with the same superscript letter are significantly different: ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.01, ^d*P* < 0.01, ^e*P* < 0.01.

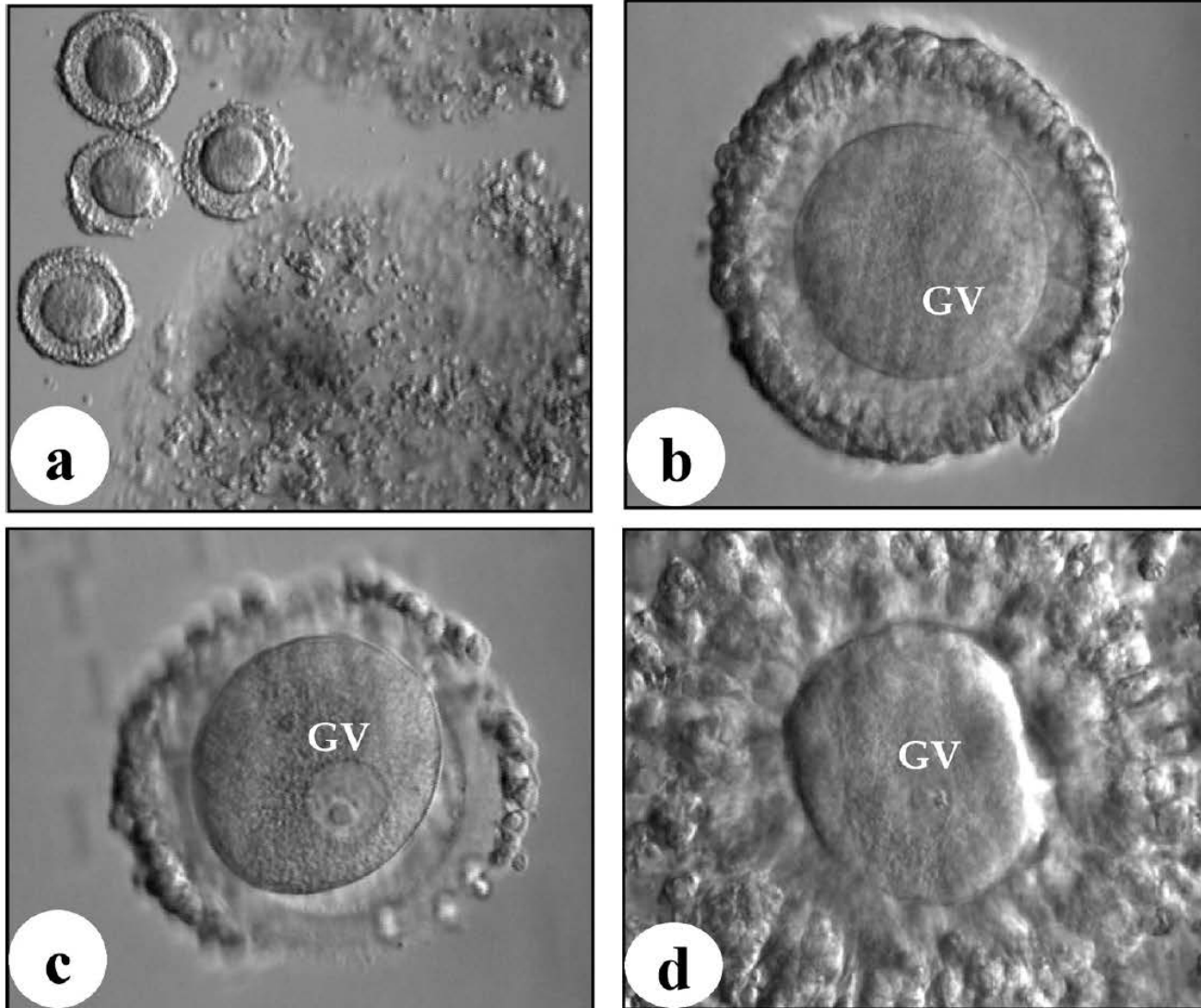


Figure 1. Cumulus–oocyte complex morphology of oocytes obtained in human chorionic gonadotrophin-primed in-vitro maturation cycles. (a) Oocytes just after retrieval, original magnification ($\times 200$). (b) Germinal vesicle (GV)-stage oocyte with compacted cumulus cells (CC). (c) GV-stage oocyte with sparse CC. (d) GV-stage oocyte with dispersed CC. Original magnification ($\times 400$).

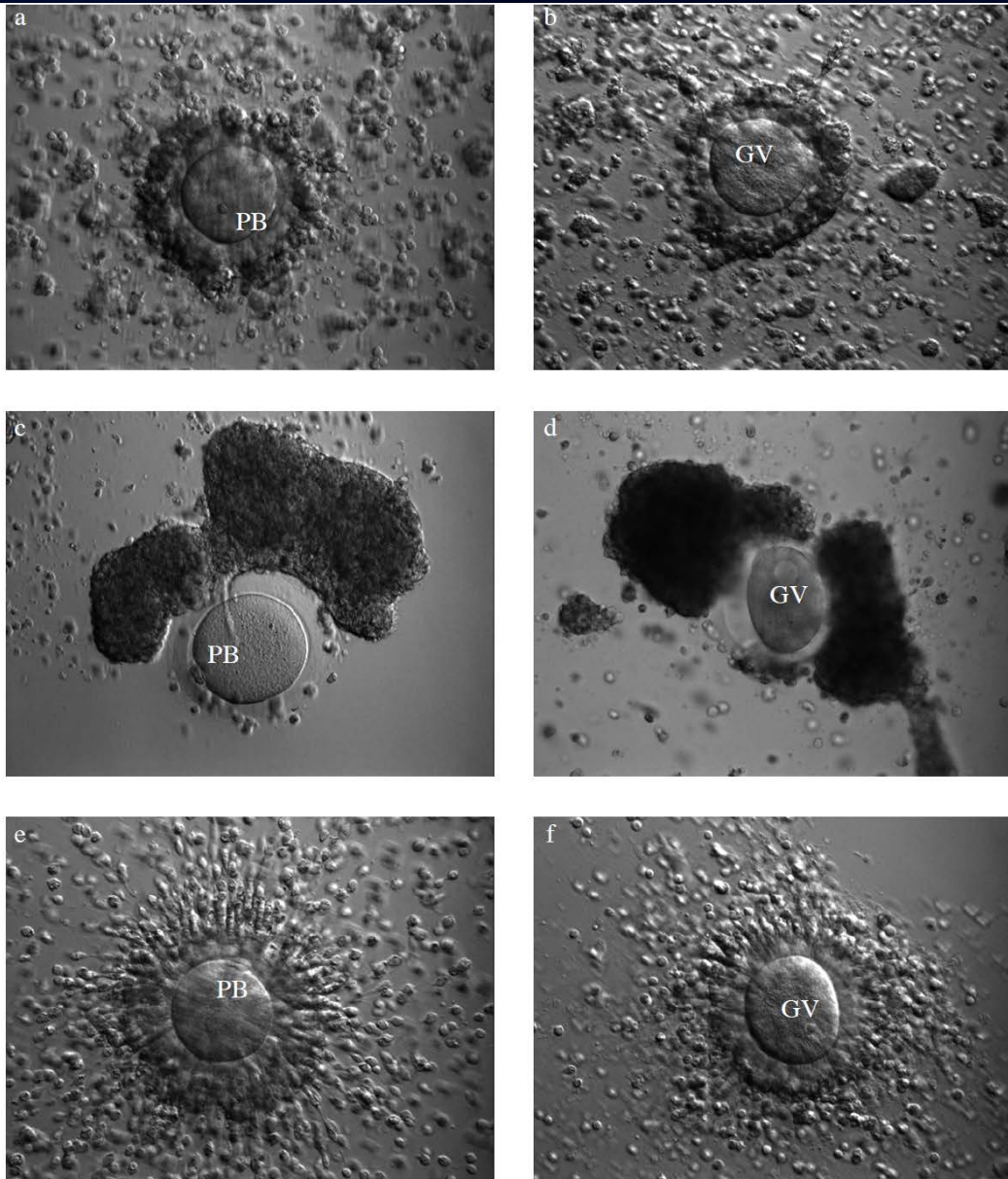


Figure 2. Cumulus–oocyte complex morphology of oocytes with dispersed cumulus cells (CC) collected from similar size of follicles. (a) Metaphase II (MII)-stage oocyte with little expanded corona radiata. (b) Germinal vesicle (GV)-stage oocyte with little expanded corona radiata. (c) MII-stage oocyte with clumped corona radiata. (d) GV-stage oocyte with clumped corona radiata. (e) MII-stage oocyte with expanded corona radiata. (f) GV-stage oocyte with expanded corona radiata. Original magnification ($\times 200$). PB = 1st polar body.

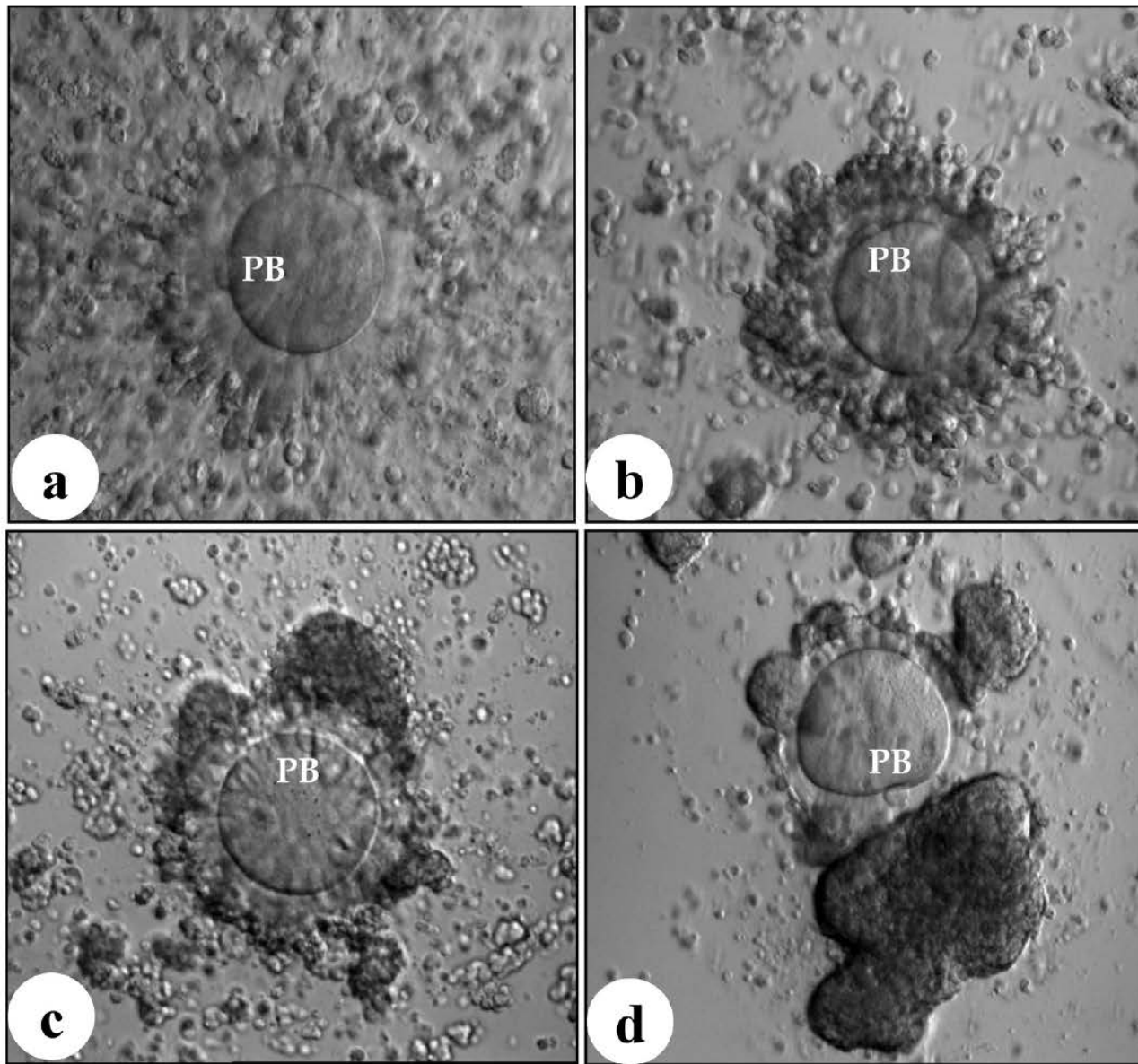


Figure 3. Cumulus–oocyte complex (COC) morphology of in-vivo matured oocyte with dispersed cumulus cells obtained according to follicle size in human chorionic gonadotrophin-primed in-vitro maturation cycle. (a) COC retrieved from 14 mm diameter follicle. (b) COC retrieved from 11 mm diameter follicle. (c) COC retrieved from 9 mm diameter follicle. (d) COC retrieved from 8 mm diameter follicle. Original magnification ($\times 200$). PB = 1st polar body.

TYPES OF IVM

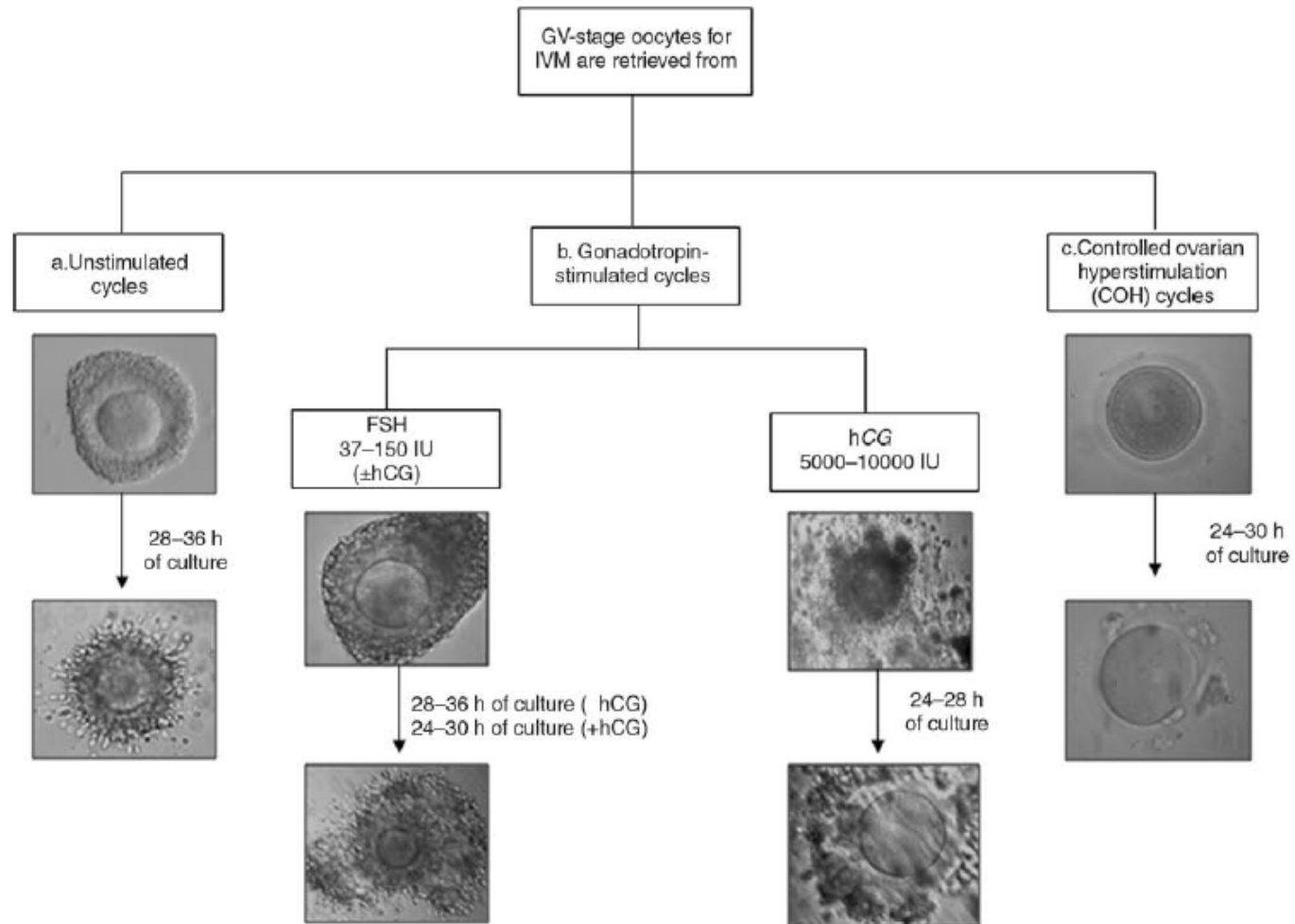


Fig 9.10 Diagram representing the diversified IVM clinical protocols applied in PCO, PCOS, or normo-ovulatory women. These protocols reflect on morphology and maturation timing of oocytes retrieved. (a) Immature oocytes are retrieved prior to the formation of a dominant follicle during a natural cycle: oocytes retrieved are enclosed in a compact mass of cumulus cells and the majority of the oocytes reach maturation between 28 h and 36 hours of culture. (b) Immature oocytes are collected following a mild stimulation: from patients primed only with FSH, the oocytes retrieved have a full compacted cell morphology and the majority of oocytes mature within 28–36 hours of culture; with the administration of hCG with or without FSH priming, maturation is more rapid, within 24–30 hours of culture, and the oocytes retrieved from the most advanced follicles have a more expanded cell morphology. (c) Immature oocytes collected from patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF/ICSI treatment are often in vitro matured in the absence of adjacent surrounding granulosa cells and the majority of the oocytes mature within a time frame of 24–30 hours.

Table 9.5 Maturity grading of cumulus–oocyte complexes (COCs) and oocyte (after cumulus–corona denudation) during prematuration days in culture

1. *Grading of granulosa cell mass: cumulus expansion and oocyte coverage*

Cumulus mass (CM):

3 or fewer layers of cumulus cells	(CM0)
more than 3 but fewer than 10 layers of cumulus cells	(CM1)
10 or more layers of cumulus cells	(CM2)

Cumulus expansion (CE):

tight, dense cells	(CE0)
moderate expansion of cells	(CE1)
fully expanded cells	(CE2)

Contact (CO) between cumulus cells and oocyte:

naked	(CO0)
partially naked	(CO1)
fully enclosed	(CO2)
fully enclosed and part of follicle wall	(CO3)

2. *Assessment of oocyte nuclear maturation stage*

GV

GVBD

PB

3. *Assessment of oocyte morphology*

Oocyte diameter (μm)

Oocyte cytoplasm

presence of inclusions:

vacuoles/refractile bodies

darkness:

clear/dark

granularity:

homogeneous/granular

Zona:

normal/abnormal

Perivitelline space:

normal/enlarged

Oocyte shape:

regular/irregular

Polar body:

intact/fragmented

GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown;

PB, polar body

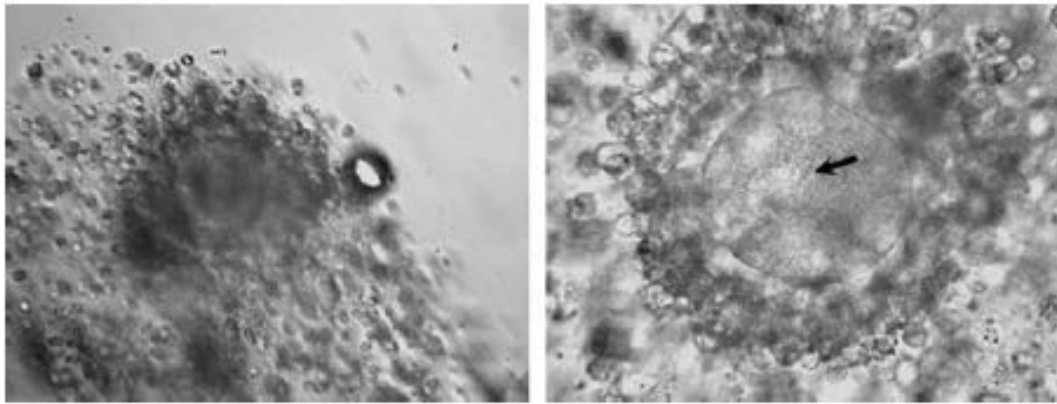


Fig 9.13 Photomicrograph of a cumulus–oocyte complex with an expanded cell morphology pattern (CM2, CE2, CO2). (a) Nuclear maturity of oocyte is not visible under an inverted microscope. (b) After cell ‘spreading,’ the GV is visualized within the ooplasm (arrow).

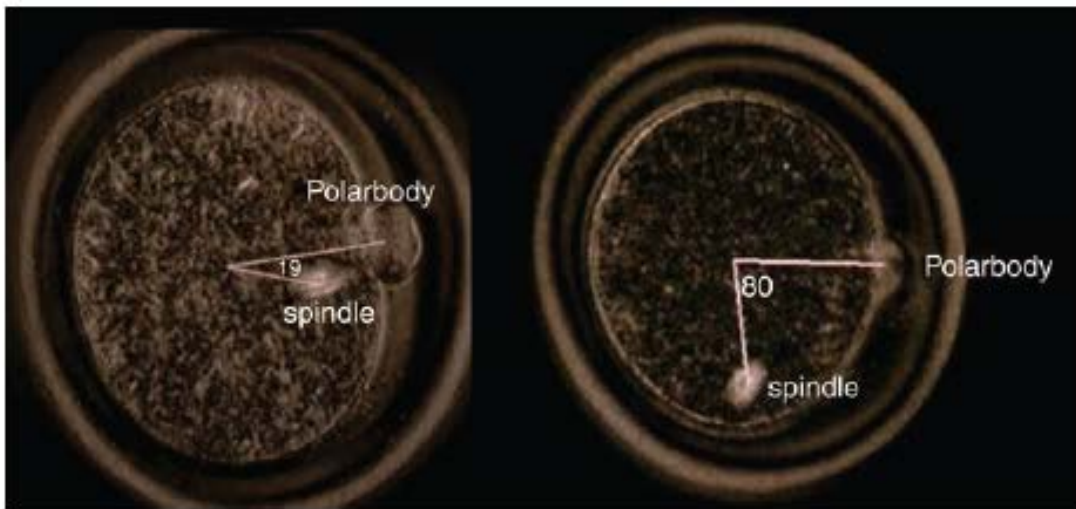


Fig 9.14 Spindle images of human in vitro matured oocytes using the PolScope software showing different locations of spindle in the ooplasm in relation to polar body position. (Courtesy of Lin Liu and David Keefe, University of Florida, Florida.)

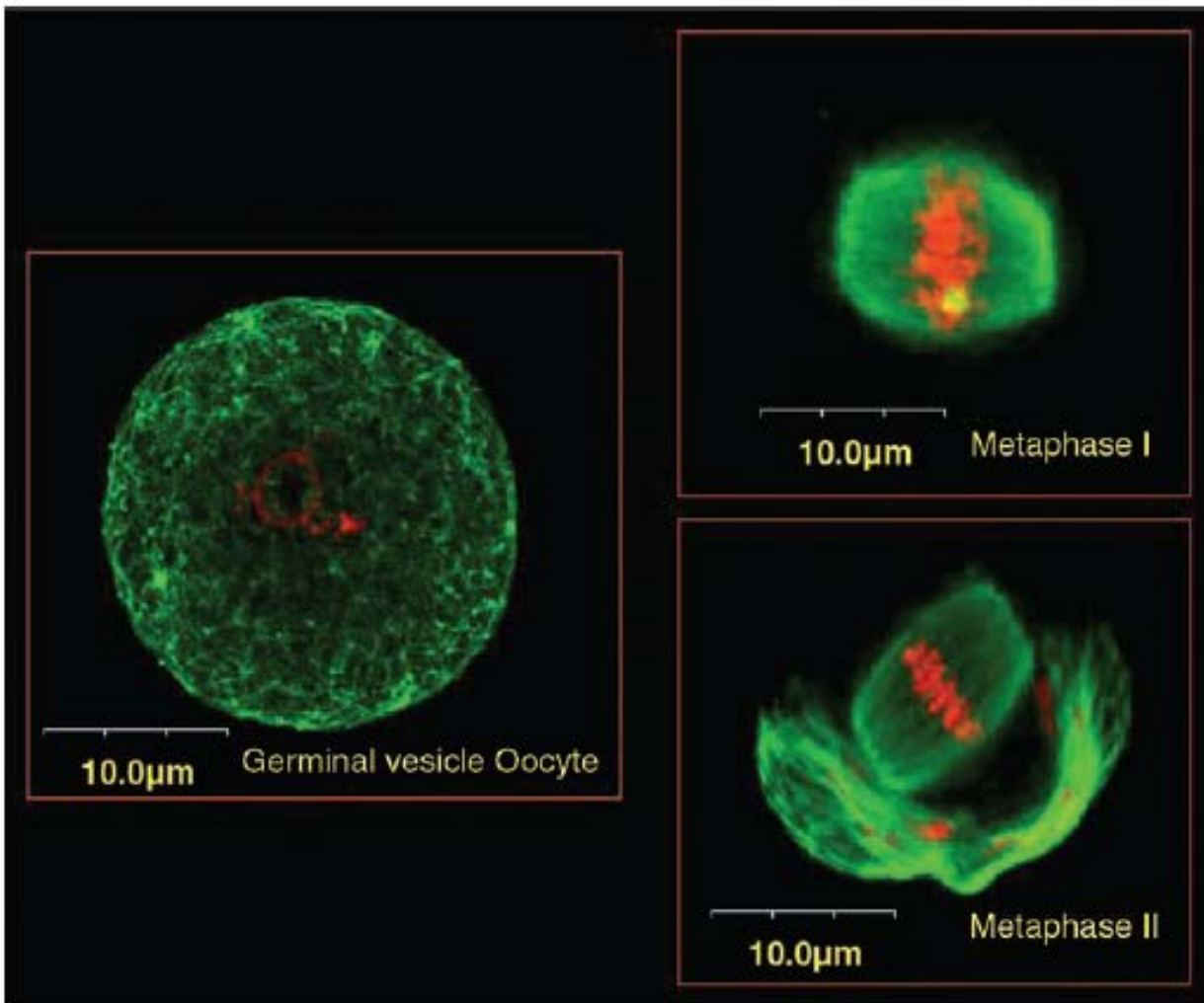


Fig 9.20 Three distinct progression stages of meiosis are illustrated. Mouse oocytes are fixed and extracted in a microtubule-stabilizing buffer and stained with monoclonal antibodies against α - and β -tubulin (label green). Chromosomes are stained with ethidium homodimer-2 (label red). The left panel shows a prophase I oocyte, with the chromosomal material packed into the germinal vesicle and the tubulin dispersed throughout the cytoplasmic compartment. The upper right panel shows a metaphase I spindle. The lower right panel demonstrates a normal barrel-shaped metaphase II spindle and the extruded and degrading first polar body in the perivitelline space. The metaphase plate shows well-aligned chromosomes.

Wnioski

- Oocyty dojrzałe in-vivo w cyklach IVM, w których podano wcześniej hCG mogą produkować więcej zarodków o wyższym potencjale rozwojowym niż oocyty dojrzewające w in vitro
- Istnieje możliwość izolowania oocytów dojrzałych in vivo z pęcherzyków o średnicy mniejszej niż 10mm w cyklach IVM uprzednio stymulowanych hCG
- Jeśli możliwy, hCG powinno być podany kiedy największy pęcherzyk osiągnie 11–12 mm w celu zapewnienia obecności oocytów dojrzałych in vivo w dniu OPU.
- Potrzeba dodatkowych badań w celu określenia kiedy podanie hCG staje się krytyczne, pozwalające na rozwój tyle pęcherzyków jak to jest możliwy, które mogłyby osiągać odpowiedniej wielkości dla uzyskania oocytów w metafazie II w dniu OPU unikając długotrwałego ujemnego efektu na wzrastające dominujące pęcherzyki

Kierunki rozwoju IVM

- Optymalizacja podłoży do IVM, protokołów klinicznych i techniki OPU
 - Optymalizacja środowiska hodowlanego, polepszenie przygotowania śluzówki macicy do implantacji, uzyskanie odpowiedniej estrogenizacji śluzówki, zmniejszenie stopnia aneuploidii.
- Przystosowanie IVM do programów ED
- Stosowanie witryfikacji oocytów niedojrzałych lub po ich dojrzewaniu *in vitro*
- Wykorzystanie tkanki jajnikowej
 - Mrożenie
 - Dojrzewanie