NUÔI TRƯỞNG THÀNH NOÃN NON TRONG ĐIỀU TRỊ THỤ TINH ỐNG NGHIỆM Ở BỆNH NHÂN HỘI CHỨNG BUỒNG TRỨNG ĐA NANG

ThS. Trần Hà Lan Thanh

IVFMD Phú Nhuận, Bệnh viện Mỹ Đức Phú Nhuận

GIỚI THIỆU

Hội chứng buồng trứng đa nang (Polycystic ovary syndrome – PCOS) là một trong những rối loạn nội tiết sinh sản thường gặp ở phụ nữ tuổi sinh sản (5 – 10%). 50% phụ nữ có PCOS sẽ bị hiếm muộn. Những bệnh nhân này sẽ được điều trị thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) để tăng cơ hội có thai. Tuy nhiên, bệnh nhân PCOS có đáp ứng buồng trứng tốt nên khi kích thích buồng trứng kiểm soát (Conventional controlled ovarian stimulation – COS) sẽ có nguy cơ bị hội chứng quá kích buồng trứng. Do đó, phác đồ nuôi trưởng thành noãn non trong ống nghiệm (In–vitro maturation – IVM) được áp dụng cho các bệnh nhân PCOS sẽ giúp giảm thiểu hoàn toàn các biến chứng của hội chứng quá kích buồng trứng, đồng thời giảm chi phí điều trị, giảm ảnh hưởng của thuốc, căng thẳng tâm lý cho bệnh nhân nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả tỷ lệ thành công sau điều trị IVF. Bài viết này sẽ tổng hợp các kết quả điều trị IVM ở nhóm bệnh nhân PCOS.

PCOS

PCOS là một rối loạn nội tiết sinh sản thường gặp ở các phụ nữ trong độ tuổi sinh sản. Người mắc PCOS có nhiều biểu hiện lâm sàng khác nhau, bao gồm rối loạn phóng noãn, các dấu hiệu cường androgen trên lâm sàng/cận lâm sàng và hình ảnh buồng trứng đa nang trên siêu âm.

Theo ước tính khoảng 90% các trường hợp không phóng noãn gây ra bởi PCOS. Những bệnh nhân này có thể điều trị thụ tinh ống nghiệm để tăng cơ hội có thai, nhưng khi thực hiện kích thích buồng trứng bình thường thì nhóm bệnh nhân PCOS có nguy cơ bị hội chứng quá kích buồng trứng. Vì vậy, bệnh nhân PCOS cần thiết có một chiến lược điều trị và theo dõi cẩn thận trong quá trình kích thích buồng trứng – thụ tinh ống nghiệm để giảm thiểu tối đa nguy cơ.

KỸ THUẬT IVM

IVM được xem là kỹ thuật điều trị IVF an toàn và hiệu quả cho những bệnh nhân PCOS, số nang noãn có hốc (Antral follicle count – AFC) cao. Bệnh nhân PCOS có đáp ứng buồng trứng tốt nên khi kích thích buồng trứng kiểm soát bình thường sẽ có nguy cơ cao bị hội chứng quá kích buồng trứng. IVM cho các bệnh nhân PCOS giúp tránh được hoàn toàn các biến chứng của hội chứng quá kích buồng trứng, đồng thời giảm chi phí điều trị, giảm ảnh hưởng của thuốc cũng như căng thẳng tâm lý cho bệnh nhân. Theo một phân tích cộng gộp (2015), cho thấy kết quả điều trị IVM ở nhóm PCOS cho tỷ lệ thai lâm sàng (OR= 2,37; KTC 95%, 1,53 – 3,68), tỷ

lệ làm tổ (OR= 1,73; KTC 95% 1,06 – 2,81) cao hơn đáng kể so với nhóm bệnh nhân có hình ảnh buồng trứng đa nang, nhưng tỷ lệ noãn trưởng thành, tỷ lệ trẻ sinh sống, sẩy thai không có sự khác biệt[1]. Phân tích này đã cung cấp bằng chứng sơ bộ về hiệu quả của IVM trong điều trị IVF cho bệnh nhân PCOS.

IVM có 2 loại phác đồ: (1) có mồi hCG (IVM–hCG) và (2) không mồi hCG (non–hCG IVM). Trong đó, IVM không mồi hCG có hai phương pháp được sử dụng là IVM một bước – Standard IVM và IVM hai bước–Biphasic IVM (IVM–CAPA). Đối với IVM–hCG, bệnh nhân được tiêm một liều hCG trước chọc hút, có hoặc không được mồi FSH trước. Khi đó, noãn thu nhận ở các giai đoạn khác nhau tại thời điểm chọc hút, noãn trưởng thành metaphase II–MII (khoảng 10 – 20%), một số ở giai đoạn túi mầm vỡ (Germinal vesicle breakdown – GVBD) hoặc metaphase I (MI) và phần lớn noãn giai đoạn túi mầm (Germinal vesicle – GV). Vì thế, cần đòi hỏi những phương thức thực hiện khác nhau trong phòng thí nghiệm phôi học: tiến hành thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI đối với noãn MII tại ngày chọc hút, trong khi những noãn non (GV, GVBD, MI) sẽ tiếp tục nuôi cấy IVM trưởng thành rồi mới ICSI. Để tất cả các noãn chọc hút từ IVM đều là noãn non GV thì phác đồ IVM không hCG được sử dụng. Đối với Standard IVM, các noãn non giai đoạn GV được nuôi trưởng thành *in-vitro* trong một bước tới giai đoạn MII. Bệnh nhân có thể có hoặc không được mồi FSH trước, tất cả các noãn đều ở giai đoạn GV tại thời điểm chọc hút.

Khi thực hiện phác đồ IVM–CAPA, bệnh nhân có PCOS chỉ cần kích thích buồng trứng nhẹ với FSH ngoại sinh 2 – 5 ngày không cần tiêm mũi trigger khởi phát trưởng thành noãn. Trong IVM–CAPA trước bước nuôi IVM (30 giờ) như IVM Standard thì có bước nuôi pre–IVM 22 – 24 giờ để các noãn có thời gian phát triển hoàn thiện trước khi bước vào giai đoạn trưởng thành, điều này có thể giúp cải thiện chất lượng của phôi. pre–IVM (CAPA) nuôi trong môi trường có bổ sung peptide natriuretic loại C (C–type natriuretic peptide – CNP) là một chất ức chế giảm phân, hoạt động bằng cách gắn với thụ thể của nó là NPR2 (natriuretic peptide receptor 2) trên tế bào cumulus giúp các tế bào này sản sinh GMP vòng (cyclin GMP). cGMP là chất ức chế phosphodiesterase type 3A của noãn (PDE3A) – chất thủy phân cAMP, dẫn đến duy trì nồng độ cAMP cao trong noãn, làm noãn vẫn bị giữ lại ở prophase I (giai đoạn noãn GV). Cơ chế chính của bước pre–IVM là: (1) giúp trì hoãn việc tái giảm phân nội sinh *in-vitro* của noãn sau khi chọc hút, (2) ngăn chặn việc giao tiếp giữa noãn với tế bào cumulus, (3) điều hòa quá trình đường phân và trao đổi oxi hóa của phức hợp noãn – tế bào cumulus, (4) tăng nồng độ glutathione trong noãn để chống lại các gốc oxy tự do; (5) tạo điều kiện cho việc ngừng tổng hợp RNA noãn trước khi tiếp tục giảm phân; (6) giảm sự không đồng bộ về tiến độ giảm phân giữa các noãn từ các nang có kích thước khác nhau; và (7) cho phép phát triển của con đường tín hiệu chức năng của yếu tố tăng trưởng biểu bì (Epidermal growth factor–EGF) trong tế bào cumulus trong quá trình nuôi cấy pre IVM.

IVM TRONG ĐIỀU TRỊ IVF Ở BỆNH NHÂN PCOS

Kết quả phôi học

IVM–CAPA cải thiện tỷ lệ noãn trưởng thành và số phôi chất lượng tốt cao hơn IVM chuẩn. Cho đến nay, những nghiên cứu sơ bộ đã chứng minh CAPA–IVM làm gia tăng tỷ lệ trưởng thành noãn sau nuôi cấy, tăng

chất lượng phôi tốt ở giai đoạn phân chia và phôi nang. Năm 2017, Sánchez và cộng sự đã áp dụng mô hình nuôi noãn qua hai bước CAPA–IVM trên người và đã cải thiện kết quả trưởng thành noãn sau IVM.

Nghiên cứu công bố năm 2019 tại IVFMD Bệnh viện Mỹ Đức phối hợp với Đại học Tự Do Bỉ ghi nhận hệ thống CAPA–IVM này có thể giúp cải thiện tỷ lệ trưởng thành noãn và kết quả phôi, nhất là ở các nang nhỏ có đường kính < 6 mm. Ở nhóm CAPA–IVM thì tỷ lệ noãn trưởng thành sau IVM (62% so với 47,9%; p = 0,034), tỷ lệ phôi ngày 3 chất lượng tốt trên số noãn MII (37,8% so với 24,1%; p = 0,045), số phôi trữ ngày 3 (4,2 ± 0,5 so với 2,2 ± 0,2; p = 0,0002) cao hơn đáng kể so với Standard IVM; trong khi tỷ lệ thụ tinh không có sự khác biệt đáng kể (85,7% so với 78,1%; p=0,244)[2].

Động học phôi có nguồn gốc từ IVM cũng được nghiên cứu so sánh với phôi IVF thường. Theo nghiên cứu của Cato và cộng sự (2016), thực hiện so sánh động học hình thái phôi IVM và phôi IVF bình thường của bệnh nhân PCOS. IVM–hCG có mồi FSH, trước khi ICSI thì các noãn có lẽ trưởng thành được cấy 6 giờ, còn noãn non được nuôi trưởng thành 30 giờ. Kết quả cho thấy, phôi IVM không có sự khác biệt về động học giai đoạn sớm (đến phôi ngày 3), ngoại trừ t4 trễ hơn, s2 dài hơn đáng kể so với phôi IVF (p < 0,05)[3]. Nghiên cứu Roesner và cộng sự (2017), đã tiến hành so sánh động học phát triển phôi thuộc 3 nhóm: 105 phôi IVM–hCG của bệnh nhân PCOS, 115 phôi IVF của bệnh nhân không PCOS, 74 phôi IVF của bệnh nhân PCOS. Kết quả cho thấy, tỷ lệ phôi chất lượng tốt ở nhóm 1 thấp hơn, phôi nhóm 1 sẽ phát triển nhanh từ thời điểm xuất hiện 2 tiền nhân nhưng sẽ phát triển chậm lại khi đạt giai đoạn 6 phôi bào và tất cả các thời điểm đều chậm hơn so với 2 nhóm phôi còn lại. Tuy nhiên, tỷ lệ thai và tỷ lệ trẻ sinh sống không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm[4].

Kết quả thai kỳ

Ở bệnh nhân PCOS, điều trị IVM–hCG cho tỷ lệ trẻ sinh sống của lần chuyển phôi đầu tiên là 31,7% và tỷ lệ trẻ sinh sống cộng dồn là 33,7%. Ngoài ra, nghiên cứu cũng ghi nhận là nồng độ AMH cao tiên lượng số noãn chọc hút được và số noãn trưởng thành cao[5]. Theo nghiên cứu hồi cứu so sánh kết quả điều trị IVM–hCG và COS–IVF/ICSI trên nhóm bệnh nhân có AFC cao. Trong nhóm IVM (608 chu kỳ), có 511 chu kỳ chuyển tươi và 167 chu kỳ chuyển phôi trữ. Trong nhóm IVF (311 chu kỳ), có 209 chu kỳ chuyển tươi và 185 chu kỳ chuyển phôi trữ. Số lượng noãn trưởng thành, số phôi, phôi tốt và phôi trữ ở nhóm IVM đều thấp hơn đáng kể so với nhóm COS–IVF/ICSI. Tỷ lệ trẻ sinh sống ở lần chuyển đầu tiên và tỷ lệ trẻ sinh sống cộng dồn sau một chu kỳ chọc hút ở nhóm IVM và COS–IVF/ICSI không có sự khác biệt đáng kể. Hội chứng quá kích buồng trứng không xảy ra ở nhóm IVM so với 3,5% ở nhóm COS–IVF/ICSI[6]. Ở những phụ nữ hiếm muộn có AFC cao, IVM–hCG là một giải pháp thay thế khả thi cho COS–IVF/ICSI làm giảm rõ rệt hội chứng quá kích buồng trứng, mà vẫn đảm bảo hiệu quả thành công sau điều trị IVF.

Nghiên cứu đầu tiên báo cáo các trẻ sinh sống sau IVM– CAPA ở những bệnh nhân PCOS cũng được công bố bởi Vuong và cộng sự (2020) ghi nhận IVM–CAPA cải thiện đáng kể tỷ lệ noãn trưởng thành (63,6% so với 49,0; p < 0,001), tỷ lệ thai lâm sàng (63,2% so với 38,5%; p = 0,04) so với kỹ thuật IVM Standard trước đây. Tỷ lệ trẻ sinh sống được ghi nhận ở hai nhóm IVM– CAPA và IVM Standard lần lượt là 50% và 33% (p

= 0,17). Không có trường hợp dị tật bẩm sinh nào được ghi nhận ở cả 2 nhóm và cân nặng lúc sinh của trẻ ở 2 nhóm là như nhau[7]. IVM–CAPA hứa hẹn là một hệ thống IVM mới, hướng tới an toàn và hiệu quả cho bệnh nhân dựa trên những hiểu biết sâu sắc về các cơ chế trưởng thành noãn.

Một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng so sánh kết quả thai giữa IVM không sử dụng FSH và hCG so với COS–IVF/ICSI trên nhóm bệnh nhân PCOS[8]. Các bệnh nhân PCOS khi được chọn điều trị bằng IVM không sử dụng FSH và hCG, sẽ đến thăm khám siêu âm qua ngả âm đạo vào ngày 6 – 8 của chu kỳ kinh để loại trừ sự phát triển của nang vượt trội. Khi nội mạc tử cung đạt ít nhất 6 mm thì được lên lịch chọc hút noãn ở những nang nhỏ hơn 10 mm. Các cụm noãn sau khi chọc hút sẽ được nuôi cấy 28 – 32 giờ trong môi trường IVM (có bổ sung FSH 0,075 IU/ml và hCG 0,01 IU/ml). Sau thời gian nuôi cấy noãn được tách các khỏi tế bào cumulus để ICSI. Các bệnh nhân ở cả 2 nhóm sẽ được chuyển đơn phôi nang ngày 5. Tỷ lệ thai diễn tiến 24 tuần ở nhóm IVM không FSH thấp hơn đáng kể so với IVF (22,3% so với 50,6%; khác biệt –28,3%; KTC 95%, –37,9% – –18,7%). Quá kích buồng trứng từ mức độ trung bình – nặng không xảy ra ở nhóm IVM, trong khi ở nhóm IVF tỷ lệ bệnh nhân bị quá kích buồng trứng ở mức trung bình là 5,7% và mức nặng là 0,6%. Và không có sự khác biệt nào được ghi nhận ở các kết cục sản khoa và chu sinh ở 2 nhóm điều trị.

Theo bài tổng quan của Cochrane năm 2018, so sánh hiệu quả giữa điều trị IVM và COS–IVF/ICSI cho nhóm bệnh nhân PCOS[9]. Kết quả phân tích gộp trên 2 nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng cho thấy tỷ lệ thai lâm sàng ở nhóm IVM cao hơn so với COS–IVF/ICSI (OR = 3,1; KTC 95%, 1,06 – 9,00; I^2 = 0%), tuy nhiên mức độ bằng chứng là rất thấp. Theo một phân tích cộng gộp năm 2021, từ 8 bài nghiên cứu 1.579 bệnh nhân PCOS thực hiện IVM (n=753) và COS–IVF/ICSI (n = 826)[10]. Kết quả ghi nhận không có sự khác biệt về tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ thai lâm sàng, sẩy thai giữa nhóm điều trị IVM và COS–IVF/ICSI. Tuy nhiên, tỷ lệ trẻ sinh sống ở nhóm COS–IVF/ICSI cao hơn đáng kể so với IVM (31,8% so với 38,9%; RR 0,82; KTC 95% 0,70 – 0,94; p = 0,0007; I^2 = 26%). Tính đồng nhất giữa các nghiên cứu trong bài phân tích cộng gộp này khá thấp. Qua đó, chứng tỏ IVM có những hiệu quả lâm sàng tương tự như điều trị COS–IVF/ICSI cho những bệnh nhân PCOS. Mặc dù, IVM cho tỷ lệ trẻ sinh sống thấp hơn COS–IVF/ICSI như đem lại tính an toàn và hiệu quả về chi phí cao hơn cho bệnh nhân PCOS. Vẫn cần các nghiên cứu phân tích trong tương lai để đánh giá hiệu quả của IVM so với COS–IVF/ICSI.

Kết quả chu sinh và sự phát triển của trẻ sau IVM

Kết cục sản khoa và chu sinh của các thai kỳ từ IVM so với nhóm COS–IVF/ICSI đã được đánh giá. Thai kỳ của nhóm IVM có nguy cơ rối loạn tăng huyết áp (như tăng huyết áp thai kỳ, tiền sản giật, hội chứng tán huyết tăng men gan và tiểu cầu giảm) cao hơn (17,9% so với 9,6%; p = 0,02) nhưng tỷ lệ sinh non (32– 36,9 tuần) và sinh non sớm (< 32 tuần) là tương đương khi so với nhóm bệnh nhân kích thích buồng trứng có kiểm soát. Kết quả của phân tích hồi quy đa biến cũng ghi nhận kỹ thuật hỗ trợ sinh sản (IVM hay kích thích buồng trứng có kiểm soát) có mối tương quan đáng kể đến tỷ lệ rối loạn tăng huyết áp. Cân nặng của trẻ sinh đơn từ IVM không khác biệt so với bệnh nhân kích thích buồng trứng có kiểm soát. Tỷ lệ trẻ mang dị tật bẩm sinh ở nhóm IVM là 4,1%

còn ở nhóm COS–IVF/ICSI là 2,4%[1].

Kỹ thuật IVM không ảnh hưởng đến sự phát triển thể chất của ở các trẻ từ lúc mới sinh đến 2 tuổi khi so với nhóm trẻ ICSI. Kết quả từ nghiên cứu của Florence và cộng sự (2020), cho thấy không có sự khác biệt về điểm số z–core của cân nặng, chiều cao, chu vi đầu giữa trẻ lúc mới sinh, 4 tháng tuổi, 2 tuổi từ IVM khi so với trẻ ở nhóm bệnh nhân PCOS kích thích buồng trứng ($p > 0,05$). Sau khi điều chỉnh các yếu tố đặc điểm nền, thì chỉ có điểm số z–core chiều cao của trẻ 2 tuổi ở nhóm IVM khác biệt đáng kể so với nhóm kích thích buồng trứng (khác biệt trung bình: –0,4; KTC 95%, –0,9 – 0,0; $p = 0,05$). Tỷ lệ trẻ cần can thiệp phẫu thuật cũng như tỷ lệ nhập viện là tương đương giữa nhóm IVM và nhóm COS–IVF/ICSI ($p > 0,05$)[11].

Sự phát triển về nhận thức và vận động của trẻ IVM–CAPA cũng được ghi nhận không có sự khác biệt khi so sánh với các trẻ IVF khác, trẻ sinh từ thụ thai tự nhiên[12,13]. Việc sử dụng kỹ thuật IVM–CAPA trong điều trị IVF không có bất kỳ tác động đáng kể nào đến sự phát triển nhận thức và vận động của trẻ nhỏ so với trẻ sinh ra do thụ thai tự nhiên[13].

Hiệu quả chi phí

Theo một phân tích hiệu quả chi phí trên dữ liệu nghiên cứu đoàn hệ hồi cứu so sánh kết quả điều trị IVM–hCG và COS–IVF/ICSI trên nhóm bệnh nhân có AFC cao tại IVMD bệnh viện Mỹ Đức, cho thấy chi phí trung bình cho mỗi cặp vợ chồng là 4.300 Euro (KTC 95%, 1.371 – 18.798 Euro) ở nhóm IVM, còn ở nhóm COS–IVF/ICSI là 6.493 Euro (KTC 95%, 2.204 – 20.136 Euro)[14]. Những số liệu này cho thấy IVM ít tốn kém hơn COS–IVF/ICSI trên nhóm bệnh nhân có AFC cao khi điều trị IVF tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

Ở những phụ nữ hiếm muộn PCOS, IVM là một phương án thay thế khả thi cho COS–IVF/ICSI làm giảm rõ rệt hội chứng quá kích buồng trứng, mà vẫn đảm bảo tỷ lệ thành công và hiệu quả chi phí sau điều trị IVF cũng nhưng an toàn cho cả mẹ và trẻ. IVM–CAPA là một giải pháp tiên tiến giúp cải thiện tỷ lệ noãn trưởng thành và tăng số lượng và chất lượng phôi tốt sau khi nuôi trưởng thành noãn *in-vitro*. Việc sử dụng kỹ thuật IVM–CAPA trong điều trị IVF không có bất kỳ tác động đáng kể nào đến sự phát triển nhận thức và vận động của trẻ nhỏ so với trẻ sinh từ COS–IVF/ICSI và trẻ sinh ra do thụ thai tự nhiên. Những số liệu hiện tại bổ sung thêm bằng chứng sẵn có cho các bác sĩ khi xem xét cách tiếp cận kỹ thuật IVM để điều trị IVF, nhưng vẫn cần kiểm chứng trong các nghiên cứu lớn hơn sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L Mostinckx et al. "Obstetric and neonatal outcome of ART in patients with polycystic ovary syndrome: IVM of oocytes versus controlled ovarian stimulation," Hum. Reprod., vol. 34, no. 8, pp. 1595–1607, 2019.
2. F Sanchez et al. "Biphasic in vitro maturation (CAPA–IVM) specifically improves the developmental capacity of oocytes from small antral follicles," J. Assist. Reprod. Genet., vol. 36, no. 10, pp. 2135–2144, 2019.
3. MD Canto et al. "Morphokinetics of embryos developed from oocytes matured in vitro," pp. 247–253, 2016.
4. S Roesner et al. "Time–lapse imaging reveals differences in growth dynamics of embryos after in vitro maturation compared with conventional stimulation," Fertil. Steril., vol. 107, no. 3, pp. 606–612.e3, 2017.
5. VNA Ho et al. "Live birth rate after human chorionic gonadotropin priming in vitro maturation in women with polycystic ovary syndrome," J. Ovarian Res., vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2018.
6. VNA Ho et al. "The effectiveness and safety of in vitro maturation of oocytes versus in vitro fertilization in women with a high antral follicle count.," Hum. Reprod., vol. 34, no. 6, pp. 1055–1064, Jun. 2019.
7. LN Vuong et al. "Live births after oocyte in vitro maturation with a prematuration step in women with polycystic ovary syndrome," J. Assist. Reprod. Genet., vol. 37, no. 2, pp. 347–357, 2020.
8. X Zheng et al. "In vitro maturation without gonadotropins versus in vitro fertilization with hyperstimulation in women with polycystic ovary syndrome: A non–inferiority randomized controlled trial," Hum. Reprod., vol. 37, no. 2, pp. 242–253, 2022.
9. S Cs, A Maheshwari, D Vaidakis, and S Bhattacharya. "In vitro maturation in subfertile women with polycystic ovarian syndrome undergoing assisted reproduction (Review," Cochrane Database Syst. Rev., 2018.
10. Y Xu and J Qiao. "Comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for polycystic ovary syndrome patients: a systematic review and meta–analysis," Ann. Transl. Med., vol. 9, no. 15, pp. 1235–1235, 2021.
11. F Belva et al. "Growth and other health outcomes of 2–year–old singletons born after IVM versus controlled ovarian stimulation in mothers with polycystic ovary syndrome," Hum. Reprod. Open, pp. 1–8, 2020.
12. LN Vuong et al. "Development of children born from IVM versus IVF: 2–year follow–up of a randomized controlled trial.," Hum. Reprod., vol. 37, no. 8, pp. 1871–1879, Jul. 2022.
13. DL Nguyen et al. "Development of children born after in vitro maturation with a prematuration step versus natural conception: a prospective cohort study.," J. Assist. Reprod. Genet., vol. 39, no. 8, pp. 1959–1965, 2022.
14. SC Braam et al. "In–vitro maturation versus IVF: a cost–effectiveness analysis.," Reprod. Biomed. Online, vol. 42, no. 1, pp. 143–149, 2021.