

# HIỆU QUẢ CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY PHÔI CÓ BỔ SUNG GM – CSF Ở NHỮNG TRƯỜNG HỢP THẤT BẠI LÀM TỔ LIÊN TIẾP TRONG HỖ TRỢ SINH SẢN

Huỳnh Gia Bảo<sup>(1),(2)</sup>, Nguyễn Thị Thu Lan<sup>(1),(2)</sup>, Đặng Quang Vinh<sup>(2)</sup>  
 (1) IVFAS, Bệnh viện An Sinh; (2) Trung tâm Nghiên cứu Di truyền & Sức khỏe Sinh sản (CGRH) - Khoa Y ĐHQG- TP.HCM

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Đánh giá hiệu quả của môi trường nuôi cấy phôi có bổ sung GM – CSF ở những trường hợp thất bại làm tổ liên tiếp.

**Phương pháp:** Báo cáo loạt ca các trường hợp nuôi cấy phôi đến ngày 2 bằng môi trường có bổ sung GM-CSF. Đánh giá hiệu quả của việc sử dụng môi trường này dựa trên tỉ lệ làm tổ của phôi, tỉ lệ thai lâm sàng. Đề tài do CGRH, Khoa Y Đại học Quốc gia TPHCM thực hiện và số liệu được thu thập tại đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh.

**Kết quả:** 41 cặp vợ chồng vô sinh do thất bại làm tổ liên tiếp được điều trị TTTON và được sử dụng môi trường có bổ sung GM – CSF để nuôi cấy phôi. Tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi tốt, tỉ lệ thai lâm sàng và tỉ lệ làm tổ ghi nhận được lần lượt là 77,6%; 23,8%; 36,6%; 13,3%.

**Kết luận:** Việc sử dụng môi trường nuôi cấy có bổ sung GM – CSF để nuôi cấy phôi giúp làm tăng tỉ lệ thành công ở những trường hợp thất bại làm tổ liên tiếp.

## ABSTRACT

### EFFICIENCY OF MEDIUM WITH GM – CSF ON REPEATED IMPLANTATION FAILURE IN ASSISTED REPRODUCTION

**Objectives:** To evaluate the efficiency of medium with GM – CSF on repeated implantation failure (RIF).

**Methods:** This was a case series report on ICSI cycles using medium with GM – CSF growth factor for day-2 embryo culture on

the rates of clinical pregnancy rate (CPR) and implantation (IR) were used as main outcomes. This study was conducted by CGRH, School of Medicine, Vietnam National University HCMC. Data was collected at IVFAS, An Sinh Hospital.

**Results:** 41 ISCI cycles using culture medium with GM – CSF growth factor for embryo culture. The fertilization rate, the good embryo rate, the clinical pregnancy rate and the implantation rate respectively were 77.6%, 23.8%, 36.6% and 13.3% .

**Conclusions:** The culture medium with GM – CSF increased the successful rate of repeated pregnancy failure cases.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) được xem là phương pháp điều trị mang lại tỉ lệ thành công cao nhất cho các trường hợp hiếm muộn – vô sinh. Tuy nhiên, không phải tất cả các phôi được tạo ra bằng TTTON đều có khả năng làm tổ sau khi chuyển vào buồng tử cung. Người ta ước tính có khoảng 30% phôi sau khi hình thành bị ngưng phát triển trước giai đoạn làm tổ, 30% bị mất sau khi đã bám và làm tổ vào niêm mạc tử cung nhưng trước khi phát hiện được thai trên siêu âm (thai sinh hóa) và 10% bị hư thai sau khi đã có phôi tim thai trên siêu âm [1].

Trong nhiều thập kỷ qua, nhiều phát kiến, cải tiến đã được ứng dụng nhằm nâng cao hiệu quả thành công của một chu kỳ TTTON. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều trường hợp bệnh

nhân vẫn không thành công sau nhiều lần chuyển phôi. Những trường hợp này thường được biết đến với chẩn đoán thất bại làm tổ liên tiếp (recurrent implantation failure - RIF). Bên cạnh việc làm ảnh hưởng về tâm lý, tinh thần của các cặp vợ chồng hiếm muộn – vô sinh sau nhiều chu kỳ điều trị thất bại, RIF còn làm cho chi phí điều trị tăng đáng kể.

Thất bại làm tổ trước đây thường được định nghĩa là tình trạng không có thai sau 2 – 6 chu kỳ TTTON, với tổng số trên 10 phôi chất lượng tốt được chuyển vào buồng tử cung [2]. Tuy nhiên, với xu hướng giảm số lượng phôi chuyển hiện nay, tại đa số các trung tâm TTTON bệnh nhân được chẩn đoán RIF khi không có hiện tượng làm tổ sau 3 chu kỳ chuyển phôi với số phôi chuyển phù hợp [3].

Sự làm tổ của phôi vào niêm mạc tử cung là một quá trình phức tạp, nhìn chung phụ thuộc vào 3 yếu tố chính là chất lượng phôi được chuyển, sự chấp nhận của niêm mạc tử cung và hệ thống miễn dịch của cơ thể người phụ nữ [4]. Bài viết này tập trung vào phân tích các yếu tố liên quan đến yếu tố hệ thống miễn dịch, trong đó, các nguyên nhân có thể ảnh hưởng đến quá trình làm tổ của phôi cũng như một số tiến bộ trong kỹ thuật hiện nay để tăng cao khả năng phôi bám vào NMTC sẽ được đề cập.

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy nếu thiếu một số yếu tố cytokine có thể dẫn đến các kết quả kém về sản khoa bao gồm hiện tượng sảy thai [5],[6]. Về bản chất, cytokine là chemokine có tầm quan trọng trong các đáp ứng miễn dịch giúp phôi thai thích nghi với điều kiện làm tổ cũng như tái thiết lại khối mô niêm mạc giúp khởi sự cho quá trình làm tổ và phát triển tiếp tục của phôi thai. Do vậy, ở những bệnh nhân có tiền sử sảy thai nhiều lần có sự ghi nhận sự thiếu hụt hay bị hoạt hoá bất thường các yếu tố cytokine này thường dẫn đến những rối

loạn về chức năng và khả năng tăng trưởng của phôi thai cũng như có thể dẫn đến hiện tượng sảy thai sau này [5].

Trong số các cytokines được định danh, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM – CSF) đang ngày càng được chú ý do được chứng minh là có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển và làm tổ của phôi. Ở người, GM – CSF được tìm thấy trong lớp niêm mạc tử cung [7],[8], vòi trứng, tế bào vỏ của nang noãn vượt trội [8], dịch nang noãn cũng như trong nhau thai. Trên mô hình nghiên cứu là chuột, sự hiện diện của GM – CSF trong quá trình phát triển của phôi được cho là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến khả năng làm tổ của phôi cũng như có tác động tích cực đến sự phát triển của thai sau này trong tử cung [5],[9].

Trong giai đoạn phân chia sớm của phôi, các thụ thể của GM – CSF được khởi động giúp cho GM – CSF bắt đầu hoạt động cũng như tương tác với tế bào ICM và tế bào lá nuôi phôi, điều này được tin là giúp cải thiện những tương tác cần thiết cho phôi và các tế bào trong niêm mạc tử cung [10]. Các thụ thể với GM – CSF được tìm thấy trên noãn đã thụ tinh cho đến các giai đoạn phát triển thành phôi nang trên chuột cũng như người. Các thực nghiệm trên phôi chuột cho thấy khi nuôi cấy phôi in vitro trong môi trường có bổ sung GM – CSF ở nồng độ 2ng/ml, các phôi gia tăng hoạt động sử dụng glucose trong quá trình chuyển hóa, gia tăng số lượng tế bào thông qua việc ức chế chu trình chết tế bào (apoptosis) [6]. Ngoài ra, việc bổ sung GM – CSF vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ trên còn làm tăng tỷ lệ làm tổ của phôi chuột, giảm bớt các bất thường về cấu trúc của nhau thai cũng như quá trình phát triển thai kỳ [9].

Trên người, khi nuôi cấy phôi trong môi trường có bổ sung GM – CSF, các tác giả ghi

nhận tỷ lệ phôi sau rã đông ở ngày 2 phát triển đến giai đoạn phôi nang tăng gấp 2 lần, số lượng tế bào sống trong khối ICM tăng thêm 30%, ngoài ra, tỷ lệ phôi làm tổ (in vitro) cũng tăng [8]. Trong một nghiên cứu ngẫu nhiên, có nhóm chứng, sử dụng noãn của cùng một bệnh nhân, khi nuôi cấy phôi từ giai đoạn thụ tinh đến phôi nang, phôi nuôi cấy trong môi trường có bổ sung GM – CSF sẽ có nhiều tế bào hơn vào thời điểm 72 giờ sau thụ tinh (6,1 so với 5,8;  $p < 0,05$ ) và số lượng phôi nang hoàn chỉnh được hình thành tăng 50% (1,6 so với 1,1;  $p = 0,001$ ) [11]. Về tỷ lệ thai lâm sàng, một nghiên cứu có nhóm chứng trên 154 chu kỳ điều trị, các tác giả cho thấy tỷ lệ thai lâm sàng tăng có ý nghĩa thống kê ở nhóm có bổ sung GM – CSF trong môi trường nuôi cấy (46,1% so với 30,8%;  $p < 0,05$ ) [12].

**MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU**

Đánh giá hiệu quả của GM – CSF dựa trên tỉ lệ làm tổ của phôi và tỉ lệ có thai lâm sàng đến 12 tuần của những trường hợp thất bại làm tổ liên tiếp.

**VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Đây là đề tài nghiên cứu do CGRH, Khoa Y, Đại học Quốc gia TPHCM thực hiện, việc thu thập số liệu được tiến hành tại đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh.

**THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU**

Báo cáo loạt ca các trường hợp thất bại làm tổ được điều trị TTON sử dụng môi trường có bổ sung GM – CSF nuôi cấy phôi đến ngày 2 tại Đơn vị IVFAS, Bệnh viện An Sinh từ 8/2012 – 11/2012.

**PHƯƠNG PHÁP CHỌN MẪU**

**Tiêu chuẩn nhận mẫu:**

- Thất bại làm tổ (kết quả  $\beta$ -hCG âm tính)

- o  $\geq 3$  lần chuyển phôi (bao gồm phôi tươi và phôi trữ lạnh)
- o Tổng số phôi tốt chuyển  $\geq 6$
- NMTC  $\geq 8$ mm

**Tiêu chuẩn loại mẫu:**

- Trữ phôi toàn bộ
- Bất thường về tử cung

**QUI TRÌNH KỸ THUẬT**

**Quy trình chuẩn bị tinh trùng**

- Tất cả các mẫu tinh dịch sau khi ly giải trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C được tiến hành lọc rửa với phương pháp thang nồng độ không liên tục.
- Đặt môi trường thang nồng độ Supra Sperm (Medicult-Origio) vào tube ly tâm 15ml đáy nhọn, 1ml lớp 45% ở trên và 1ml lớp 90% ở dưới.
- Trộn đều mẫu tinh dịch.
- Đặt 1ml tinh dịch lên lớp môi trường lọc và ly tâm 1500vòng/phút trong 15 phút. Có thể sử dụng nhiều tube ly tâm nếu mật độ tinh trùng quá ít.
- Loại bỏ phần dịch nổi.
- Chuyển cặn lắng vào tube 5ml đáy tròn chứa 3ml môi trường rửa Sperm Preparation Medium (Medicult-Origio) và ly tâm ở 1200 vòng/phút trong 10 phút.
- Rửa lần 2.
- Hút bỏ phần trên, cặn thu được cuối cùng khoảng 0,2 – 0,3ml sẽ đặt vào tủ cấy CO2 chuẩn bị cho ICSI.

**Quy trình chuẩn bị noãn**

- Chọc hút noãn được tiến hành vào 36 giờ sau tiêm hCG. Bệnh nhân được gây tê cạnh cổ tử cung và tiền mê. Chọc hút trứng được thực hiện dưới hướng dẫn đầu dò siêu âm ngả âm đạo.
- Khối OCC (oocyte corona cumulus) sau khi chọc hút sẽ được rửa trong đĩa petri 35 chứa môi trường Flushing Medium

(Medicult – Origio) và nuôi cấy trong hộp nuôi cấy 4 giếng chứa môi trường Universal IVF (Medicult – Origio) được phủ dầu Liquid Paraffin (Medicult – Origio). Các đĩa rửa noãn và hộp nuôi cấy noãn sẽ được chuẩn bị trước ngày chọc hút noãn và cất trong tủ 6% CO<sub>2</sub> ở 37°C.

- Sau 2 – 3 giờ nuôi cấy với môi trường Universal IVF (Medicult – Origio) trong tủ cấy tri-gas, các khối OCC được tách bỏ các tế bào hạt xung quanh bằng men Synvitro Hyadase (Medicult – Origio) để thu tế bào noãn. Sau đó, noãn được tiếp tục nuôi cấy trong đĩa petri 35mm với môi trường Universal IVF (Medicult – Origio) 1 – 2 giờ đến khi thực hiện ICSI. Các đĩa tách noãn và nuôi cấy noãn sau khi tách khối OCC sẽ được chuẩn bị trước khi chọc hút noãn và cất trong tủ 6% CO<sub>2</sub> ở 37°C.

#### **Quy trình tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI)**

- Tất cả các noãn với sự hiện diện của thể cực đầu tiên được thực hiện ICSI (1-2 giờ sau khi tách bỏ tế bào hạt bên ngoài)

- Mỗi bệnh nhân được chuẩn bị các đĩa chích ICSI, bên trong có 1 giọt PVP 50% (Medicult – Origio) (pha loãng 1:1 với môi trường Universal IVF), được kéo mỏng kèm 5 giọt môi trường Universal IVF (5µl/giọt) được phủ dầu Liquid Paraffin (Medicult – Origio) để chứa noãn. Số lượng noãn tối đa trong một đĩa chích là 4 và số đĩa ICSI cần làm tùy thuộc vào số noãn chọc hút được.

- Các đĩa ICSI sẽ được chuẩn bị ngay sau chọc hút noãn hoàn tất và cất trong tủ 6% CO<sub>2</sub> ở 37°C. Trước khi tiến hành ICSI, tinh trùng được đưa vào PVP (Medicult – Origio) ở rìa bên phải và dưới đáy của giọt PVP (Medicult – Origio) đã kéo dài. Noãn được cho vào các giọt môi trường chứa noãn.

- Dưới kính hiển vi đảo ngược, độ phóng đại 300X, chuyên viên labo sẽ lựa chọn tinh trùng di động và có hình dạng bình thường

nhất tại rìa bên trái của giọt PVP (Medicult – Origio). Tinh trùng được bắt động bằng cách dùng kim tiêm tinh trùng “cửa” lên đuôi 2 – 3 lần cho đến khi bắt động hoàn toàn. Sau đó, tinh trùng sẽ được tiêm vào noãn ở vị trí 3 giờ, sau khi cố định noãn với thể cực ở vị trí 6 – 12 giờ hay 7 – 11 giờ.

#### **Quy trình nuôi cấy phôi bằng môi trường Embryogen (Medicult-Origio)**

- Noãn sau ICSI được rửa và chuyển vào đĩa petri BD 60mm (BD Falcon) có chứa môi trường Embryogen (Medicult – Origio) được phủ dầu Liquid Paraffin (Medicult – Origio). Tiến hành nuôi cấy qua đêm trong tủ cấy với điều kiện 37°C, 8% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub>.

- Sau 16 – 18 giờ ICSI, tất cả noãn được kiểm tra đánh giá sự thụ tinh với sự hiện diện của hình ảnh 2 tiền nhân (2PN) và ghi nhận tỉ lệ thụ tinh.

- Rửa và chuyển noãn sang đĩa petri BD 60mm có chứa môi trường Embryogen (Medicult – Origio) mới có phủ dầu Liquid Paraffin (Medicult – Origio) đã được chuẩn bị ít nhất 2 giờ trước khi sử dụng. Tiếp tục nuôi cấy qua đêm trong điều kiện 37°C, 8% CO<sub>2</sub> và 5% O<sub>2</sub>.

- Vào ngày thứ 2 (42-44 giờ sau ICSI), tiến hành kiểm tra đánh giá chất lượng phôi và ghi nhận tỉ lệ phôi tốt.

#### **CÁC YẾU TỐ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ**

- Tỉ lệ noãn thụ tinh bình thường
- Tỉ lệ phôi có chất lượng tốt
- Tỉ lệ thai lâm sàng
- Tỉ lệ làm tổ của phôi

#### **KẾT QUẢ**

Từ 8/2012 – 12/2012, tổng cộng 41 cặp vợ chồng vô sinh do thất bại làm tổ liên tiếp điều trị tại IVFAS được nhận vào nghiên cứu. Bảng 1 mô tả các đặc điểm của nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu.

**Bảng 1:** Đặc điểm bệnh nhân

Tuổi	35,9 ± 4,85
Số lần điều trị TTON thất bại trung bình	4,34 ± 1,28
Số phôi chuyển trung bình	3,8 ± 0,6
Độ dày niêm mạc tử cung trung bình	11,43 ± 1,39

Kết quả ở bảng 1 cho thấy đối tượng bệnh nhân tham gia trong nghiên cứu của chúng tôi đều có những đặc điểm về độ tuổi, số lần điều trị thất bại trước đây, số phôi chuyển trung bình và độ dày niêm mạc tử cung ở chu kỳ điều trị hiện tại tương tự nhau và thỏa các tiêu chuẩn nhận vào nghiên cứu đã đề ra.

**Bảng 2:** Kết quả của các thông số nghiên cứu

Các chỉ số nghiên cứu	Tỉ lệ (n = 41)
Tỉ lệ phôi tốt	23,8%
Tỉ lệ thai lâm sàng	36,6% (15/41)
Tỉ lệ làm tổ của phôi	13,3% (21/158)

Ở bảng 2, tỉ lệ thụ tinh ở các trường hợp được sử dụng môi trường có bổ sung GM – CSF trong nghiên cứu của chúng tôi là 77,6%, tỉ lệ này tương đương với tỉ lệ thụ tinh trung bình tại IVFAS. Tuy nhiên, tỉ lệ phôi tốt ở nhóm bệnh nhân này trong nghiên cứu chỉ đạt 23,8%. Đặc điểm phôi ghi nhận được trong tất cả các trường hợp tham gia nghiên cứu là tốc độ phát triển chậm, do đó làm cho tỉ lệ phôi tốt thấp hơn so với tỉ lệ phôi tốt trung bình tại trung tâm của chúng tôi.

Đối với những trường hợp RIF, tỉ lệ thai lâm sàng đạt được dưới 20% nếu như chỉ thực hiện qui trình TTON một cách bình thường [13]. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ thai lâm sàng của những bệnh nhân RIF đạt được là 36,6%. Như đã trình bày ở trên, việc thiếu hụt GM – CSF trong

đường sinh dục nữ vào giai đoạn thai sớm được xem là một trong những nguyên nhân quan trọng gây ra RIF. GM – CSF đã được chứng minh là có vai trò chủ yếu trong điều hòa sự phát triển của phôi ở giai đoạn sớm [10]. Do đó, việc sử dụng môi trường có bổ sung GM – CSF để nuôi cấy phôi trong những trường hợp RIF giúp làm tăng tỉ lệ có thai lâm sàng ở những trường hợp bệnh nhân đúng với chỉ định này. Do phác đồ điều trị tại trung tâm của chúng tôi chủ yếu là chuyển phôi ngày 2, hiệu quả thực sự của GM – CSF lên phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2, ngày 3) không rõ. Tuy nhiên, GM – CSF được nhiều tác giả chứng minh là giúp tăng tỉ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang (từ 47% lên 78% trong nghiên cứu của Sjoblom và cộng sự (2005) trên nhóm người tình nguyện) và làm

tăng số lượng tế bào trong khối tế bào mầm (ICM) [9] bằng cách kích thích sự vận chuyển và hấp thụ glucose trong quá trình chuyển hóa, cũng như ngăn quá trình chết của tế bào ở phôi [13]. Với lý do này mà môi trường nuôi cấy có bổ sung GM – CSF phát huy được tác dụng làm tăng tỉ lệ thai lâm sàng ở đối tượng bệnh nhân RIF ngay cả khi được chuyển phôi ở giai đoạn phân chia (ngày 2). Ngoài ra, do tỉ lệ phôi tốt đối với từng trường hợp không cao, chúng tôi tiến hành chuyển nhiều phôi hơn so với những trường hợp điều trị TTTON từ các chỉ định khác. Đây là nguyên nhân khiến cho tỉ lệ làm tổ của phôi thấp hơn so với tỉ lệ hiện có tại trung tâm của chúng tôi, chỉ đạt 13,3%.

## KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam nhằm cải thiện tỉ lệ thành công trên những đối tượng bệnh nhân thất bại làm tổ liên tiếp. Mặc dù, có nhiều nguyên nhân gây ra RIF nhưng kết quả nghiên cứu đã cho thấy việc sử dụng môi trường có bổ sung GM – CSF khi nuôi cấy phôi ở giai đoạn phân chia có thể giúp làm tăng tỉ lệ thai lâm sàng ở những đối tượng này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Human Reproduction Update*. 2002; 8: 333–343.
2. Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R, Keay SD. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG*. 2005; 112(6): 773–780.
3. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF – ET. *Hum Reprod*. 2006; 21: 3036–3043.
4. Das M, Holzer H. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil Steril*. 2012; 97(5): 1021–1027.
5. Robertson SA. GM – CSF Regulation of Embryo Development and Pregnancy. *Cytokine*

*Growth Factor Reviews*. 2007; 18: 287–298.

6. Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 2001; 64: 1206–1215.

7. Giacomini G, Tabibzadeh SS, Satyaswaroop PG, Bonsi L, Vitale L, Bagnara GP, Strippoli P, Jasonni VM. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod*. 1995; 10(12): 3259–3263.

8. Zhao Y, Rong H, Chegini N. Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM – CSF) and GM – CSF alpha and beta-receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol. Reprod*. 1995; 53: 923–930.

9. Sjoblom C, Roberts CT, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Alleviates Adverse Consequences of Embryo Culture on Fetal Growth Trajectory and Placental Morphogenesis. *Endocrinol*. 2005; 146(5): 2142–2153.

10. Chin PY, Macpherson AM, Thompson JG, Lane M, Robertson SA. Stress response genes are suppressed in mouse preimplantation embryos by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM - CSF). *Hum Reprod*. 2009; 24: 2997–3009.

11. Shapiro S, Richter KS, Daneshmand ST, Quinn P, Behr B. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances human embryo development to the blastocyst stage: a randomized study. *Fertil Steril*. 2003; 79: 15–16.

12. Kim D, Kim M, Kang, Lee H, Park W, Kwon H. The supplementation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM – CSF) in culture medium improves the pregnancy rate in human ART programs. *Fertil Steril*. 2001; 76(3): S6.

13. Papayannis M. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on growth, resistance to freezing and thawing and re-expansion of murine blastocysts. *RBM Online*. 2006; 14 (1): 96–101.