

© Н.В. Протопопова^{1,2}, Н.А. Болдонова¹, Е.Б. Дружинина^{1,2},
Е.В. Одареева¹, А.А. Денисова²

ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного
образования» Минздрава России¹,
ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница»,
Областной перинатальный центр²,

г. Иркутск, Россия

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР, В ЦИКЛАХ ЭКО

Аннотация. Исследовано 60 пациенток в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с применением среды, содержащей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), для культивирования эмбрионов и 89 пациенток с культивированием эмбрионов на комбинации сред, не содержащих данный фактор. Оценивались параметры: возраст, причина и вид бесплодия, номер попытки ЭКО, эмбриологический этап, частота наступления беременности (ЧНБ). Исследование показало, что культивирование эмбрионов в среде с содержанием GM-CSF увеличивает ЧНБ у пациенток всех возрастных групп, с неудачными предыдущими попытками ЭКО и со спонтанным прерыванием беременности в анамнезе. Использование данной среды эффективно при всех формах бесплодия, в том числе при мужском факторе. Среда с GM-CSF дает возможность получить в 2 раза больше эмбрионов хорошего качества, пригодных для криоконсервации.

Ключевые слова: экстракорпоральное оплодотворение, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста, частота наступления беременности.

© N.V. Protopopova, N.A. Boldonova, E.B. Druzhinina,
E.V. Odareeva, A.A. Denisova

*Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education
Irkutsk Regional Clinical Hospital,*

Irkutsk, Russia

ESTIMATION OF THE EFFICIENCY OF THE USE OF THE CULTURE MEDIUM WITH THE GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR IN IVF CYCLES

Abstract. We examined 60 patients during in-vitro fertilization cycles (IVF) using the culture medium with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for cultivation of embryos and 89 patients with cultivation of embryos on a combination of culture media not containing GM-CSF. The following parameters were estimated: age, reason and type of infertility, number of the attempt of IVF, embryological stage, frequency of pregnancies. The conducted research showed that cultivation of embryos in the culture medium with GM-CSF increased the frequency of pregnancies in patients of all age groups, with unsuccessful previous attempts of IVF and spontaneous interruption of pregnancy in the

anamnesis. The use of the culture medium with GM-CSF is effective in all forms of infertility including a man's factor and gives the chance to receive twice more high quality embryos suitable for cryopreservation.

Keywords: in-vitro fertilization, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, possibility of pregnancy.

Введение. Поздний репродуктивный возраст, повторные неудачи имплантации при переносе эмбрионов хорошего качества, биохимическая беременность, неоднократные спонтанные аборт, идиопатическое бесплодие являются актуальными проблемами современной репродуктологии [2]. Модификация сред для культивирования эмбрионов является резервом повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у данной когорты пациенток.

Пролиферация и дифференцировка эмбриональных клеток, взаимодействие бластоцисты с эндометрием в момент имплантации, сам процесс имплантации, иммунная толерантность материнского организма по отношению к эмбриону, инвазия трофобласта, формирование плаценты и последующее прогрессирование беременности зависят от адекватного баланса ростовых факторов и цитокинов. При культивировании *in vitro* эмбрион развивается в среде, полностью лишенной ростовых факторов и цитокинов, что может быть причиной снижения его жизнеспособности и имплантационного потенциала. Поэтому добавление цитокинов и ростовых факторов в среды для культивирования эмбрионов *in vitro* стало логичным и очевидным этапом развития культуральных сред [6].

GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) стал одним из основных кандидатов на добавление в культуральные среды [9]. Рецепторы к GM-CSF обнаруживаются на мембране эмбриональных клеток уже на стадии двух бластомеров [12]. GM-CSF синтезируется клетками фолликулов, эпителия фаллопиевых труб и эндометрия, во время беременности GM-CSF вырабатывается клетками трофобласта, а впоследствии плаценты [7, 14]. При естественном зачатии

всплески секреции GM-CSF наблюдаются после попадания спермы в репродуктивный тракт, во время оплодотворения и имплантации [14]. Результаты исследований на эмбрионах млекопитающих, а также положительный опыт доклинических испытаний способствовали созданию среды, содержащей в своем составе 2нг/мл GM-CSF и предназначенной для оплодотворения, культивирования до 3 суток и переноса эмбрионов человека в полость матки.

В 2013 году в практику отделения ВРТ Областного перинатального центра (ОПЦ) г. Иркутска было внедрено культивирование гамет и эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF, у пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

Цель исследования – оценка эффективности культивирования ооцитов и эмбрионов в среде, содержащей в своем составе GM-CSF, по частоте наступления беременности и имплантации эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста, с неудачами применения программ ВРТ или неразвивающейся беременностью в анамнезе.

Материалы и методы. Нами был проведен анализ 149 лечебных циклов в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) за 2013 год на базе отделения ВРТ ОПЦ города Иркутска. Исследуемая группа с применением среды EmbryoGen, содержащей GM-CSF, для культивирования эмбрионов составила 60 пациенток, группу клинического сравнения составили 89 пациенток, культивирование эмбрионов которых проводилось с использованием стандартной комбинации сред компании «ORIGIO»: ISM1 + Blast Assist (BA), не содержащих в своем составе GM-CSF. Оценивались такие параметры как возраст, причина и вид бесплодия, номер попытки ЭКО, эмбриологический этап, частота наступления беременности (ЧНБ).

Трансвагинальная пункция яичников осуществлялась по стандартной методике через 36 ч. после введения овуляторной дозы хорионического гонадотропина (ХГ) с применением двухпросветных игл фирмы COOK.

Промывание фолликулов проводилось буферным раствором Flushing Medium фирмы «ORIGIO» (MediCult Media) в объеме, не превышающем объем отобранной фолликулярной жидкости. Культивирование гамет и эмбрионов осуществлялось на линейке сред фирмы «ORIGIO» (MediCult Media) в соответствии с рекомендациями производителя в четырехлуночных планшетах «Nunc», в CO² – инкубаторе ThermoForma. Перенос эмбрионов проводился по стандартной методике. Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием прикладной статистической программы БИОСТАТ. Статистическую значимость оценивали по z – критерию. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Возрастной фактор пациенток в программах ЭКО оказывает существенное негативное влияние на эффективность преодоления бесплодия. Угасание репродуктивной функции у женщин начинает регистрироваться в возрасте старше 35–36 лет и проявляется увеличением частоты бедного ответа яичников на стимуляцию овуляции, снижением вероятности имплантации перенесенных эмбрионов, прерыванием беременности на ранних сроках гестации. Возможно, это связано с ухудшением качества ооцит/эмбрионов, а также с нарушением морфологии эндометрия, обусловленного несбалансированным действием эстрогенов и прогестерона [1, 2, 3, 4]. Нами был проведен анализ ЧНБ в зависимости от возраста пациенток в циклах с применением сред, содержащих в своем составе GM-CSF и нет (табл. 1).

Таблица 1

**Частота наступления беременности в зависимости
от возраста пациенток**

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)				Применение ISM1 + BA (n = 89)			
	Применение GM-CSF		ЧНБ		Применение ISM1 + BA		ЧНБ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Возраст ≤ 34 лет	30	50	9	30*	48	53,9	4	8,3*
Возраст ≥ 35 лет	30	50	10	33,3*	41	46,1	4	9,8*

Примечание к таблице: значимость различий * – $p < 0,05$.

Средний возраст пациенток исследуемой группы с применением среды, содержащей GM-CSF, составил $34,6 \pm 4,31$ лет, в группе контроля с использованием сред ISM1 + BA – $34,3 \pm 4,34$. Многоцентровое рандомизированное исследование на эффективность культивирования эмбрионов в среде с GM-CSF показало эффективность данной среды во всех возрастных группах [5]. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, частота наступления беременности в возрасте до 35 лет и в позднем репродуктивном периоде не имела статистических отличий и составила 30–33,3 % соответственно. Более того, у пациенток исследуемой группы в обеих возрастных подгруппах ЧНБ достоверно выше, чем у пациенток в контрольной группе, (30 % – 8,3 % ($p = 0,026$), 33,3 % – 9,8 % ($p = 0,031$) соответственно).

Хроническая ановуляция – фактор бесплодия, когда нарушаются оогенез, стероидогенез, секреторная трансформация эндометрия, процесс имплантации и течение ранних сроков беременности. На фоне трубного фактора бесплодия очень часто функция яичников остается неизменной и отмечается достаточный овариальный резерв, однако нарушается процесс миграции эмбриона в полость матки и как следствие имплантации. При мужском факторе бесплодия снижается индекс оплодотворения, ухудшается качество получаемых эмбрионов, снижается имплантационный потенциал эмбрионов.

Таблица 2

Частота наступления беременности в зависимости от причин бесплодия и сопутствующих гинекологических заболеваний

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)				Применение ISM1 + BA (n = 89)			
	Применение GM-CSF		ЧНБ		Применение ISM1 + BA		ЧНБ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Трубный фактор	50	83,3	16	32*	63	70,8	9	14,3*
Мужской фактор	15	25	5	33,3*	34	38,2	2	5,9*
Хроническая ановуляция	16	26,7	5	31,3	14	15,7	4	28,6
Эндометриоз	6	10	2	33,3	13	14,6	1	7,7
Миома матки	6	10	3	50	21	23,6	5	23,8

Примечание к таблице: значимость различий * – $p < 0,05$.

Из представленной таблицы 2 видно, что у пациенток исследуемой группы с применением среды с GM-CSF при всех факторах бесплодия (трубный, мужской, хроническая ановуляция) ЧНБ не имела статистических отличий (32 % – 33,3 % – 31,3 %). Однако следует отметить, что при трубном и мужском факторах бесплодия в исследуемой группе ЧНБ отмечалась достоверно чаще, чем у пациенток с подобными факторами бесплодия в группе клинического контроля (32 % – 14,3 % ($p = 0,043$), 33,3 % – 5,9 % ($p = 0,037$) соответственно). Данный факт может быть объяснен тем, что гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, входящий в состав исследуемой среды, влияет на все этапы от оплодотворения до развития беременности. Улучшает качество эмбрионов (способствует ускорению темпов дробления и позволяет получить большее количество жизнеспособных эмбрионов, при этом увеличивается частота формирования бластоцист, которые имеют более развитую внутреннюю клеточную массу, снижает уровень апоптоза и способствует увеличению экспрессии антиапоптотических генов), возрастает частота хэтчинга и имплантации [11].

Многоцентровое рандомизированное исследование на эффективность культивирования эмбрионов в среде с GM-CSF показало эффективность

данной среды у пациенток со спонтанным прерыванием беременности в анамнезе, а также у пациенток с прерыванием предыдущих беременностей сразу же после имплантации [5].

Таблица 3

Частота наступления беременности в зависимости от вида бесплодия у пациенток

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)				Применение ISM1 + BA (n = 89)			
	Применение GM-CSF		ЧНБ		Применение ISM1 + BA		ЧНБ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Первичное бесплодие	21	35	4	19*	37	41,6	4	10,9
Вторичное бесплодие	39	65	17	43,6*	52	58,4	10	19,2*

Примечание к таблице: значимость различий * – $p < 0,05$.

Проведенный анализ показал (табл. 3), что в исследуемой группе ЧНБ у пациенток с вторичным бесплодием отмечалась достоверно выше, чем у пациенток с первичным бесплодием (43,6 % – 19 %), а также чем у пациенток со вторичным бесплодием группы контроля (43,6 % – 19,2 %) ($p = 0,022$).

Таблица 4

Частота наступления беременности в зависимости от номера попытки ЭКО

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)				Применение ISM1 + BA (n = 89)			
	Применение GM-CSF		ЧНБ		Применение ISM1 + BA		ЧНБ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1-я попытка	22	36,7	7	31,8	50	56,2	12	24
2-я попытка	13	21,7	5	38,5*	31	34,8	2	6,5*
3-я и больше	25	41,7	7	28	8	9	–	–

Примечание к таблице: значимость различий * – $p < 0,05$.

ЧНБ у пациенток со 2-ой попыткой ЭКО в исследуемой группе достоверно выше, чем у подобной группы пациенток контроля (38,5 % – 6,5 %) ($p = 0,026$). У пациенток с 3-ей и больше попыток ЭКО с применением среды с GM-CSF ЧНБ отмечена в 28 % случаев, однако в группе контроля у

пациенток с 3-ей и больше попыток ЭКО беременности не наступали (табл. 4).

Положительный результат для пациенток со второй попыткой ЭКО может быть объяснен, помимо качества самого эмбриона, участием гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в цитокиновой регуляции иммунологических процессов, сопровождающих имплантацию бластоцисты и развитие беременности [18]. Показано, что гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор является одним из регуляторов взаимодействия между трофобластом, дендритными, эпителиальными клетками эндометрия и эндометриальными лейкоцитами, представленными uNK, макрофагами и Т-клетками, что способствует иммунной толерантности материнского организма по отношению к эмбриону, несущему, в том числе, отцовские антигены [6, 8, 10].

Одним из определяющих факторов эффективности ВРТ является овариальный резерв, который определяет способность яичника к развитию здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой. Одними из значимых маркеров овариального резерва являются базальный уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) (на 2–3 день менструального цикла) и антимюллерового гормона (АМГ). Т.А. Назаренко с соавт. (2013) концентрацию ФСГ выше 10 МЕ/л, а АМГ ниже 1 нг/мл определяет как низкий овариальный резерв и прогностически сниженный ответ на стимуляцию (рост менее 5 фолликулов). АМГ не зависит от уровня ФСГ и не меняется в течение менструального цикла, поэтому АМГ отражает величину пула примордиальных фолликулов, то есть репродуктивный потенциал пациентки. Уровень лютеинизирующего гормона (ЛГ) не является параметром, определяющим овариальный запас и не может быть использован для прогноза вероятности наступления беременности при ВРТ [4]. Мы проанализировали эффективность применения культуральных сред, содержащих в своем составе GM-CSF и нет, в зависимости от исходного

уровня гормонов ФСГ и АМГ у исследуемых пациенток (табл. 5). Средняя величина базального уровня данных гормонов соответствовала нормальной концентрации.

Таблица 5

Базальный уровень гормонов

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)	Применение ISM1 + BA (n = 89)
ФСГ, МЕ/л	6,7±3,68	6,7±4,4
ЛГ, МЕ/л	5,1±3,63	4,9±3,93
АМГ, нг/мл	3,0±2,18	2,6±2,81

Таблица 6

Частота наступления беременности в зависимости от базального уровня ФСГ и АМГ

Показатели	ЧНБ, % Применение среды с GM-CSF (n = 60)	ЧНБ, % применение ISM1 + BA (n = 89)
ФСГ ≥ 11 МЕ/л	2(3,3 %)	2(2,2 %)
ФСГ < 11 МЕ/л	17(28,3 %)	12(13,5 %)
АМГ ≥ 1 нг/мл	14(23,3 %)	11(12,3 %)
АМГ < 1 нг/мл	5(8,3 %)	3(3,4 %)

Примечание к таблице: значимость различий * – p < 0,05.

Анализ показал, что у пациенток с уровнем АМГ менее 1 нг/мл и применением для культивирования эмбрионов среды с GM-CSF беременность наступала в 2 раза чаще, чем у пациенток с применением сред ISM1 + BA (8,3 % – 3,4 %), однако у пациенток с высоким уровнем ФСГ (выше 11 МЕ/л) ЧНБ в исследуемой группе и в контрольной группе статистически не отличалась (табл. 6). Поэтому у пациенток с низким овариальным резервом, подтвержденным низким показателем АМГ (менее 1 нг/мл), оправдано применение среды, содержащей GM-CSF, в программах ЭКО.

В настоящее время существует достаточное количество методов ВРТ, направленных на преодоление различных причин бесплодия (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), применение

донорской спермы, вспомогательный хэтчинг, промывание фолликулов буферным раствором при прогнозируемом бедном ответе яичников на стимуляцию). Нами был проведен анализ эффективности данных методик у пациенток с применением в программе ЭКО сред, содержащих и не содержащих в своем составе GM-CSF (табл. 7).

Таблица 7

Частота наступления беременности в зависимости от применения различных методик ВРТ

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)				Применение ISM1 + BA (n = 89)			
	Применение GM-CSF		ЧНБ		Применение ISM1 + BA		ЧНБ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ИКСИ	36	60	9	25*	49	55,1	3	6,1*
Донорская сперма	50	8,3	1	20	6	6,7	1	16,7
Вспомогательный хэтчинг	30	50	10	33,3	32	36	6	18,8
Промывание фолликулов	27	45	4	14,8	41	46,1	8	19,5

Примечание к таблице: значимость различий * – $p < 0,05$.

Из приведенной таблицы видно, что при проведении ИКСИ ЧНБ в исследуемой группе пациенток достоверно чаще, чем у пациенток группы контроля (25 % – 6,1 %) ($p = 0,031$). Проведение вспомогательного хэтчинга также увеличивает ЧНБ в исследуемой группе по сравнению с контролем, 33,3 % – 18,8 % соответственно. Однако промывание фолликулов буферным раствором с целью получения большего количества яйцеклеток и последующее культивирование полученных эмбрионов с применением среды, содержащей GM-CSF, не способствует увеличению ЧНБ.

Исследования на эмбрионах человека показали, что наличие гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – GM-CSF в культуральной среде повышает скорость развития и существенно увеличивает количество бластомеров во внутренней клеточной массе и трофэктодерме, снижает уровень апоптоза и увеличивает жизнеспособность

внутренней клеточной массы, повышает частоту формирования экспандированных бластоцист в пересчете на количество полученных яйцеклеток [13, 15, 16, 17]. Одним словом, GM-CSF улучшает качество и имплантационный потенциал полученных эмбрионов. Мы провели анализ эмбриологического этапа ЭКО у пациенток с применением культуральной среды, содержащей и не содержащей в своем составе GM-CSF (табл. 8).

Таблица 8

Показатели эмбриологического этапа

Показатели	Применение среды с GM-CSF (n = 60)	Применение ISM1 + BA (n = 89)
Среднее кол-во полученных яйцеклеток	4,7±3,34	5,2±3,28
Среднее кол-во зрелых яйцеклеток	3,8±2,39	4±2,54
Среднее кол-во дегенеративных яйцеклеток	0,1±0,33	0,1±0,31
Среднее кол-во полученных эмбрионов	3,3±2	3,6±2,24
Отсутствие оплодотворения	0,4±0,66	0,3±0,78
Патологическое оплодотворение	0,1±0,33	0,2±0,17
Криоконсервация	14(23,3 %)	27(30,3 %)
Среднее кол-во криоэмбрионов	2,6±2,55	1,3±0,53
Число имплантаций	19(31,7 %)*	14(15,7 %)*
Число биохимических беременностей	4(6,7 %)	4(4,5 %)

Примечание к таблице: значимость различий * – $p < 0,05$.

Полученные нами результаты соответствуют данным многоцентровых исследований. Среднее количество полученных эмбрионов у пациенток исследуемой группы составило 3,3±2, в группе клинического контроля – 3,6±2,24, различия статистически не значимые. Однако частота наступления имплантаций в группе с применением среды, содержащей GM-CSF, в 2 раза чаще, чем в группе контроля (31,7 % – 15,7 %) ($p = 0,035$), что свидетельствует о хорошем качестве полученных эмбрионов в исследуемой группе. Среднее количество эмбрионов, подвергшихся криоконсервации после культивирования в условиях среды с GM-CSF, составило 2,6±2,55, количество криоэмбрионов в группе клинического контроля составило – 1,3±0,53, различия статистически значимые. Таким образом, культивирование эмбрионов с использованием среды, содержащей в своем

составе GM-CSF, дает возможность получать большее количество «лишних» эмбрионов хорошего качества, пригодных для консервации.

Выводы:

1. Культивирование эмбрионов в среде, содержащей GM-CSF, увеличивает частоту наступления клинической беременности у пациенток как раннего, так и позднего репродуктивного возраста, с неудачными предыдущими попытками ВРТ и со спонтанным прерыванием одной или более беременностями в анамнезе.

2. Использование данной среды эффективно при всех формах бесплодия, в том числе при мужском факторе.

3. У пациенток с низким показателем АМГ (менее 1 нг/мл), оправдано применение среды с GM-CSF в программах ЭКО.

4. Использование данной среды в сочетании с методиками ИКСИ и вспомогательного хетчинга увеличивает частоту имплантаций.

5. Среда, содержащая в своем составе GM-CSF, дает возможность получить большее количество эмбрионов хорошего качества, пригодных для криоконсервации.

Список литературы:

1. *Краснопольская К.В., Калугина А.С.* Феномен «бедного» ответа яичников на стимуляторы суперовуляции в программах ЭКО: Обзор литературы // Проблемы репродукции. – 2004. – № 1. – С. 51–58.

2. *Кулаков В.И.* Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия / В.И. Кулаков, Б.В. Леонов. – М., 2004. – 781 с.

3. *Милютин М.А.* Экстракорпоральное оплодотворение у пациенток со сниженным ответом яичников на стимуляцию суперовуляции // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 3. – С. 26–28.

4. *Назаренко Т.А., Смирнова А.А.* Индукция моно- и суперовуляции. Оценка овариального резерва, ультразвуковой и гормональный мониторинг // Проблемы репродукции. – 2004. – № 1. – С. 36–42.

5. *Agerholm I. et al.* Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution // *Reprod. Biomed. Online.* – 2010. – № 20. – P. 477–484.
6. *Laird S.M. et al.* Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage // *Reprod. Biomed. Online.* – 2006. – Vol. 13, № 1. – P. 13–23.
7. *Ledee N. et al.* Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95, № 1. – P. 94–98.
8. *Moldenhauer L.M. et al.* GM-CSF regulates uterine macrophage and dendritic cell maturation and antigen presentation // *J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 86, № 1. – P. 31–32.
9. *Robertson S.A.* Basic science to clinical application the utility of GM-CSF in reproductive medicine // *J. Reprod. Immunol.* – 2001. – Vol. 90, № 2. – P. 132–133.
10. *Robertson S.A. et al.* Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy – the contribution of seminal fluid // *J. Reprod. Immunol.* – 2009. – Vol. 83, № 1. – P. 109–116.
11. *Robertson S.A. et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos // *Biol. Reprod.* – 2001. – Vol. 64, № 4. – P. 1206–1215.
12. *Robertson S.A.* GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy // *Cytokine and Growth Factor (Reviews).* – 2007. – № 18. – P. 287–298.
13. *Shapiro B.S. et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances human embryo development to the blastocyst stage: a randomized study // *Fertil. Steril.* – 2003. – № 79. – P. 15–16.
14. *Sharkey D.J. et al.* Sperm and seminal plasma differentially regulate cytokine and chemokine protein expression by human cervical epithelial cells // *J. Reprod. Immunol.* – 2010. – Vol. 86, № 1. – P. 68.
15. *Sjoblom C., Wikland M., Robertson S.A.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, № 12. – P. 3069–3076.
16. *Sjoblom C., Wikland M., Robertson S.A.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos // *Biology of Reproduction.* – 2002. – Vol. 67, № 6. – P. 1817–1823.
17. *Sjoblom C., Wikland M., Robertson S.A.* Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) promotes inner cell mass blastomere viability in human pre-implantation embryos // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 76, № 3. – P. 70.

18. Ziebe S. et al. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99, № 6. – P. 1600–1609.

References

1. Krasnopol'skaia K.V., Kalugina A.S. Phenomen «bednogo» otveta yaichnikov na stimulatory superovulacii v programmah EKO: Obzor literatury [Phenomenon of poor ovarian response to induction of superovulation in IVF program (a review)]. *Russian Journal of Human Reproduction*, 2004, no. 1, pp. 51–58 (in Russian).

2. Kulakov V.I., Leonov B.V. Ekstrakorporalnoe oplodotvorenje i ego novye napravlenija v lechenii jenskogo i mujskogo besplodia [In-vitro fertilization and its new directions in treatment of female and male infertility]. Moscow, 2004, 781 p. (in Russian).

3. Milutina M.A. Ekstrakorporalnoe oplodotvorenje u pacientok so snijennym otvetom yaichnikov na stimulaciju superovulacii [In-vitro fertilization in patients with a lowered ovarian answer to superovulation induction]. *Obstetrics and Gynecology*, 2007, no. 3, pp. 26–28 (in Russian).

4. Nazarenko T.A., Smirnova A.A. Indukcija mono- i superovulacii. Ocenka ovarial'nogo rezerva, ul'trazvukovoi i gormonalnyi monitoring [Induction of mono- and superovulation: assessment of the ovarian reserve, ultrasound and hormonal monitoring]. *Russian Journal of Human Reproduction*, 2004, no. 1, pp. 36–42 (in Russian).

5. Agerholm I. et al. Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution. *Reproductive Biomedicine Online*, 2010, vol. 20, pp. 477–484.

6. Laird S.M. et al. Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine Online*, 2006, vol. 13, no. 1, pp. 13–23.

7. Ledee N. et al. Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 2011, vol. 95, no. 1, pp. 94–98.

8. Moldenhauer L.M. et al. GM-CSF regulates uterine macrophage and dendritic cell maturation and antigen presentation. *Journal of Reproductive Immunology*, 2010, vol. 86, no. 1, pp. 31–32.

9. Robertson S.A. Basic science to clinical application the utility of GM-CSF in reproductive medicine. *Journal of Reproductive Immunology*, 2001, vol. 90, no. 2, pp. 132–133.

10. Robertson S.A. et al. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy – the contribution of seminal fluid. *Journal of Reproductive Immunology*, 2009, vol. 83, no. 1, pp. 109–116.
11. Robertson S.A. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 2001, vol. 64, no. 4, pp. 1206–1215.
12. Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine and Growth Factor (Reviews)*, 2007, vol. 18, pp. 287–298.
13. Shapiro B.S. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances human embryo development to the blastocyst stage: a randomized study. *Fertility and Sterility*, 2003, vol. 79, pp. 15–16.
14. Sharkey D.J. et al. Sperm and seminal plasma differentially regulate cytokine and chemokine protein expression by human cervical epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 2010, vol. 86, no. 1, p. 68.
15. Sjoblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*, 1999, vol. 14, no. 12, pp. 3069–3076.
16. Sjoblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biology of Reproduction*, 2002, vol. 67, no. 6, pp. 1817–1823.
17. Sjoblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) promotes inner cell mass blastomere viability in human pre-implantation embryos. *Fertility and Sterility*, 2001, vol. 76, no. 3, p. 70.
18. Ziebe S. et al. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 2013, vol. 99, no. 6, pp. 1600–1609.

Протопопова Наталья Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой перинатальной и репродуктивной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, заместитель главного врача по родовспоможению ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница» (тел.: 8-3952-40-78-24, e-mail: doc_protopyova@mail.ru).

Болдонова Наталья Александровна – аспирант кафедры перинатальной и репродуктивной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (тел.: 8 (3952) 46-53-26, e-mail: nata-doc-712@mail.ru).

Дружинина Елена Борисовна – доктор медицинских наук, ассистент кафедры перинатальной и репродуктивной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, заведующая отделением вспомогательных репродуктивных технологий ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Областной перинатальный центр (тел.: 8(3952) 40-78-24; e-mail: ebdru@mail.ru).

Одареева Елена Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры перинатальной и репродуктивной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (тел.: 8 (3952) 46-53-26, e-mail: eodareeva@mail.ru).

Денисова Анна Алексеевна – врач клинической лабораторной диагностики, эмбриолог, отделение вспомогательных репродуктивных технологий, заведующая лабораторией ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Областной перинатальный центр (тел.: 8 (3952) 40-78-94, e-mail: ebdru@mail.ru).

ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» МЗ РФ, 664079, Россия, Иркутск, м/р. Юбилейный, 100.

ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Областной перинатальный центр, 664079, Россия, Иркутск, м/р. Юбилейный, 100.

Protopopova Natalia Vladimirovna – Doctor of Medical Science, professor, head of the department of perinatal and reproductive medicine, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, deputy chief doctor on obstetric aid, Irkutsk Regional Clinical Hospital (tel.: 8-3952-40-78-24, e-mail: doc_protopopova@mail.ru).

Boldonova Natalia Alexandrovna – graduate student, department of perinatal and reproductive medicine, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education (tel.: 8 (3952) 46-53-26, e-mail: nata-doc-712@mail.ru).

Druzhinina Elena Borisovna – Doctor of Medical Science, teaching assistant, department of perinatal and reproductive medicine, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, head of the department of IVF, Irkutsk Regional Clinical Hospital (tel.: 8(3952) 40-78-24; e-mail: ebdru@mail.ru).

Odareeva Elena Vladimirovna – Candidate of Medical Science, assistant professor of the department of perinatal and reproductive medicine, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education (tel.: 8 (3952) 46-53-26, e-mail: eodareeva@mail.ru).

Denisova Anna Alekseevna – doctor of the clinical-diagnostic laboratory, embryologist, department of IVF, head of the laboratory of Regional Perinatal Center, Irkutsk Regional Clinical Hospital (tel.: 8 (3952) 40-78-94, e-mail: ebdru@mail.ru).

Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health Care of the Russian Federation, 100, Ubyleiniy community, 664079, Russia.

Irkutsk Regional Clinical Hospital, Regional Perinatal Center, 100, Ubyleiniy community, 664079, Russia.