

## Original Article

### Efficacy of uteral injection of G-CSF in repeated implantation failure: A clinical trial study

Faranak Jalilvand, Aleye Gasemzadeh, Kobra Hamdi, Nazli Navali, Helen Pia, Laya Farzadi\*

AL-Zahra Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

\*Corresponding author; E-mail: Farzadi-29@yahoo.com

Received: 14 March 2016      Accepted: 9 April 2016      First Published online: 5 February 2018  
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 April-May;40(1):16-21

#### Abstract

**Background:** Despite advances in clinical and laboratory techniques, including stimulating ovulation and transferring embryo, success rate of pregnancy remains is about 30%. The aim of this study was to assess the effect of intra uterine G-CSF on implantation and clinical pregnancy rate in patients with implantation failure in IVF.

**Methods:** This study was a randomized clinical trial on patients undergoing in vitro fertilization within an age range of 45-18 years and a history of failure in implantation for two or more times. A total of 34 patients receiving G-CSF in the intervention group and 38 patients in the control group were enrolled.

**Results:** Mean age of the participants was 34.1 years with a standard deviation of 6.4 years. The average number of years of fertility was 10 years with a standard deviation of 5.2 years. The average number of embryos implanted in the intervention group was 2.88 with a standard deviation of 0.33. The figures for the control group were 2.97 and 0.37, respectively. The two groups did not differ significantly. With respect to the potential clinical and laboratory fertility outcomes, including existing gestational sac with observed heart rate and positive serum  $\beta$ HCG, no statistically significant difference was observed between the two groups.

**Conclusion:** It seems that the effect of G-CSF on improving fertility outcomes in patients with implantation failure does not exist and more related studies are recommended in this regard.

**Keywords:** In vitro fertilization, Infertility, G-CSF, Clinical trial

**How to cite this article:** Jalilvand F, Gasemzadeh A, Hamdi K, Navali N, Pia H, Farzadi L. [Efficacy of uteral injection of G-CSF in repeated implantation failure: A clinical trial study]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 April-May;40(1):16-21. Persian.

## مقاله پژوهشی

## امکانسنجی استفاده از تزریق داخل رحمی G-CSF در بیماران با شکست لانه گزینی: یک مطالعه کارآزمایی بالینی

فرانک جلیوند، عالیه قاسم زاده، کبری حمدی، نازلی نوالی، هلن پیا، لعیا فرزدی\*

بیمارستان الزهراء، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Farzadi-29@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۱ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶  
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷؛ ۴۰(۱): ۱۶-۲۱

## چکیده

**زمینه:** علی رغم پیشرفتهای بسیار در زمینه تکنیکهای بالینی و آزمایشگاهی از جمله روشهای تحریک اوولاسیون و تکنیکهای انتقال رویان هنوز میزان موفقیت حاملگی در حد ۳۰٪ باقی مانده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر تزریق داخل رحمی G-CSF بر میزان لانه گزینی و بارداری بالینی در بیماران با شکست لانه گزینی مکرر در لقاح آزمایشگاهی بود.

**روش کار:** این مطالعه بصورت کارآزمایی بالینی تصادفی بر روی بیماران تحت درمان لقاح آزمایشگاهی با سن ۴۵-۱۸ و سابقه دو بار (یا بیشتر) شکست در لانه گزینی انجام گرفت. تعداد ۳۴ نفر در گروه مداخله با دریافت G-CSF و ۳۸ نفر در گروه کنترل قرار گرفتند.

**یافته ها:** میانگین سنی شرکت کنندگان ۳۴/۱ سال با انحراف معیار ۶/۴ سال بود. میانگین تعداد سالهای باروری شرکت کنندگان ۱۰ سال با انحراف معیار ۵/۲ سال بود. میانگین تعداد جنین جایگزین شده در گروه مداخله ۲/۸ با انحراف معیار ۰/۳۳ بود. این مقادیر در گروه کنترل بترتیب ۴/۹۷ و ۰/۳۷ بودند. دو گروه تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشتند. در بررسی تاثیر بر حاملگی بالینی و آزمایشگاهی از جمله وجود و تعداد ساک حاملگی حاوی قطب جنینی با ضربان قلب و  $\beta$ HCG سرمی مثبت تفاوت معنی دار آماری در دو گروه مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** با در نظر گرفتن یافته های مطالعه حاضر و نتایج مطالعات قبلی به نظر می رسد هنوز شواهد متقنی مبنی بر اثر G-CSF بر بهبود پیامد باروری در در بیماران با شکست لانه گزینی مکرر وجود ندارد.

**کلیدواژه ها:** لقاح آزمایشگاهی، نازائی، G-CSF، کارآزمایی بالینی

**نحوه استناد به این مقاله:** جلیوند ف، قاسم زاده ع، حمدی ک، نوالی ن، پیا ه، فرزدی ل. امکانسنجی استفاده از تزریق داخل رحمی G-CSF در بیماران با شکست لانه گزینی: یک مطالعه کارآزمایی بالینی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۱): ۱۶-۲۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

## مقدمه

حاملگی و تولید مثل یکی از اصلی ترین نیازهای زنان بشمار می‌رود و موجب احساس تمامیت و کمال در زن می‌گردد. نازایی و برآورده نشدن این نیاز اثرات اجتماعی، بیولوژیکی، اقتصادی و روانی بسیار دارد که منجر به بحران و بروز دوره‌هایی از افسردگی و اضطراب می‌گردد (۱). نازایی یکی از مشکلات اجتماعی و اقتصادی خانواده‌ها محسوب می‌شود که در حدود ۱۵-۱۰٪ زوجها را درگیر می‌کند. در جوامع در حال توسعه با افزایش سن ازدواج و مشکلات دیگر همراه، اضافه شدن هزینه های درمان نازایی بار مضاعفی بر دوش خانواده‌ها تحمیل می‌کند. بنابراین ارائه روشهای جدید درمانی و کاهش مراجعات زوجهای نازا و در نتیجه کاهش فشار روانی و مالی یکی از وظایف اصلی متولیان سلامت و پزشکان درگیر در این حیطه است. علی‌رغم پیشرفتهای بسیار در زمینه تکنیکهای بالینی و آزمایشگاهی از جمله روشهای تحریک اوولاسیون و تکنیکهای انتقال رویان هنوز میزان موفقیت حاملگی در حد ۳۰٪ باقی مانده است. تخمین زده می‌شود که بیش از نیمی از موارد حاملگیهای ناموفق در این شرایط مربوط به عدم لانه‌گزینی رویان در رحم باشد که این امر در مورد شکستهای مکرر لانه‌گزینی بیشتر به چشم می‌خورد (۲).

تعدادی از زوجها بدون علت مشخص نابارور هستند در اکثر این زوجها نیز جنین قابل انتقال به رحم با روش IVF حاصل می‌شود ولی پس از انتقال جنین به داخل رحم لانه‌گزینی اتفاق نمی‌افتد. تلاشهایی برای غلبه بر این مشکل صورت گرفته است از جمله laser hatching که در آن قسمتی از زونا توسط اشعه لیزر سوراخ می‌شود با فرض بر اینکه احتمال چسبندگی جنین به دیواره رحم افزایش یابد. در روشهای دیگر موادی به مدیا در هنگام انتقال جنین به رحم اضافه می‌شود و ادعا می‌شود که احتمال لانه‌گزینی را بالا ببرد (۳). لانه‌گزینی موفقیت آمیز به دنبال باروری داخل آزمایشگاه و انتقال رویان وابستگی مستقیم به عوامل متعدد از جمله کیفیت رویان منتقل شده و قابلیت پذیرش رحم دارد. مطالعات متعددی تلاش داشته‌اند تا با بکارگیری عوامل فارماکولوژیک قابلیت پذیرش رحمی را افزایش دهند که از آن جمله می‌توان به عامل تحریک کننده تشکیل کلنی (Colony-stimulating factor) اشاره نمود. عامل تحریک کننده تشکیل کلنی یک گروه از عوامل رشد گلیکوپروتئینی هستند که به افزایش تولید تعداد گلبول‌های سفید خون کمک می‌کنند. این مواد گروهی از سیتوکینها هستند که که از سلول‌های گوناگون و بیشتر در پاسخ به یک تحریک ترشح می‌شوند و وظیفه انتقال پیام بین سلول‌ها را برعهده دارند. سایتوکینهای CSFs به گیرنده‌های موجود بر روی سلولهای پیش ساز خونی متصل می‌شوند و رشد و تمایز آنها به گلبولهای سفید را تسریع می‌کنند. این عوامل چندگونه هستند از جمله CSF1 (عامل رشد ماکروفاژها)، CSF2 یا GM-CSF (عامل

رشد گرانولوسیت ها و مونوسیتها) و CSF3 یا G-CSF (عامل رشد گرانولوسیتها). این ترکیبات بصورت دارویی در تحریک مغز استخوان نیز کاربرد دارند. نوع محرک گرانولوسیتی آن نیز G-CSF نام دارد که به عنوان یک داروی تحریک کننده تولید گرانولوسیتها کاربرد وسیعی در حیطه هماتولوژی دارد. در سالهای اخیر استفاده از G-CSF در حیطه سلامت زنان گسترش یافته است و تعداد اندکی از مطالعات نیز به کاربرد آن در لقاح آزمایشگاهی پرداخته اند اما هنوز مطالعات انجام یافته در این حیطه و بویژه در موارد مقاوم به درمان در لقاح آزمایشگاهی اندک است (۴-۹). هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر تزریق داخل رحمی G-CSF بر میزان لانه‌گزینی و بارداری بالینی در بیماران با شکست لانه‌گزینی مکرر در لقاح آزمایشگاهی بود.

## روش کار

این مطالعه بصورت کارآزمایی بالینی تصادفی انجام گرفت. جامعه مورد مطالعه بیماران مراجعه کننده به درمانگاه نازایی بیمارستان الزهرا بودند که سابقه دو بار (یا بیشتر) شکست در لانه‌گزینی داشته و دارای رویان فریز شده بودند که بصورت تصادفی در دو گروه کنترل و گروه مداخله با تریق داخل اندومتري G-CSF قرار گرفتند. معیارهای ورود عبارت بودند از: سن ۱۸-۴۵ سال، سابقه دو بار (یا بیشتر) شکست در لانه‌گزینی و نبود کنتراندیکاسیونهای استفاده از G-CSF مانند: نارسایی کلیه و نوتروپنی مزمن و سیکل سل آنمی و سرطان و پنومونی و عدم تحمل مادرزادی فروکتوز. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: سابقه جراحی رحم، هیدروسالپنکس و اندومتريوز.

بیماران با سونوگرافی اولیه در روز ۱-۳ سیکل قاعدگی مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت عدم وجود کیست تخمدان و ضایعه فضاگیر در حفره رحم درمان لازم برای آماده سازی اندومتر شروع می‌گردید. آمادگی اندومتر با قرص استرادیول والرات ۴ میلی گرم در روز شروع میشد و بعد از سه روز به ۶ میلی گرم در روز افزایش می‌یافت. کنترل سونوگرافیک از نظر ضخامت اندومتر ۷ روز بعد صورت می‌گرفت. با رسیدن ضخامت اندومتر به ۸ میلی متر آمپول پروژسترون با دوز ۱۰۰ میلی گرم روزانه تزریق می‌شد انتقال رویان ۸ سلولی ۳ روز بعد و انتقال بلاستوسیست ۵ روز بعد انجام می‌شد. در زمان شروع تزریق پروژسترون در گروه مداخله ۱۰۰ میکرو گرم G-CSF به صورت داخل رحمی انفوزیون می‌شد. بعد از انتقال رویانها حمایت فاز لوتئال با پروژسترون ادامه می‌یافت. آزمایش  $\beta$ HCG دو هفته بعد از انتقال رویان درخواست می‌گردید. و در صورت مثبت بودن سونوگرافی واژینال ۳ هفته بعد از انتقال رویان صورت می‌گرفت. پیامدهای مورد بررسی در هر دو گروه مداخله و کنترل عبارت بودند از لانه

با انحراف معیار ۶/۴ بود. حد اقل نمایه توده بدنی شرکت کنندگان ۱۹/۹ و حد اکثر آن ۳۶/۷ کیلوگرم بر متر بود. میانگین نمایه توده بدنی در گروه مداخله ۲۶/۸ و در گروه کنترل ۲۶/۱ بدون اختلاف معنی دار آماری در دو گروه بود.

میانگین تعداد سالهای باروری شرکت کنندگان ۱۰ سال با انحراف معیار ۵/۲ سال بود. حد اقل تعداد سالهای باروری شرکت کنندگان ۱/۵ و حد اکثر آن ۲۷ سال بود. میانگین تعداد سالهای باروری در گروه مداخله ۹/۹ سال و در گروه کنترل ۲/۱ سال و اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود. توزیع افراد مورد مطالعه بر حسب عامل نازائی در جدول شماره یک آمده است.

میانگین تعداد جنین جایگزین شده در گروه مداخله ۲/۸۸ با انحراف معیار ۰/۳۳ بود. این مقادیر در گروه کنترل بترتیب ۲/۹۷ و ۰/۳۷ بودند. میانه تعداد جنین در هر دو گروه برابر ۳ با فاصله بین چارکی صفر بود. دو گروه تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشتند.

در بررسی تاثیر بر حاملگی بالینی و آزمایشگاهی تفاوت معنی دار آماری در دو گروه مشاهده نشد (جدول ۲). در گروه مداخله سه مورد ساک حاملگی حاوی قطب جنینی با ضربان قلب و در گروه کنترل تنها یک مورد مشاهده گردید. اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود. همین الگوی توزیع نیز برای تست  $\beta$ HCG مثبت وجود داشت.

گزینی جنین، وجود و تعداد ساک حاملگی حاوی قطب جنینی با ضربان قلب و مقدار سرمی  $\beta$ HCG. اطلاعات پایه مانند سن و سوابق مرتبط با نازائی نیز جمع آوری می گردید. با تخصیص تصادفی کلا ۷۲ نفر در دو گروه مداخله و کنترل تحت مطالعه قرار گرفتند. داده‌ها وارد کامپیوتر شده و با نرم افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در تجزیه و تحلیل اطلاعات علاوه بر روشهای آمار توصیفی از روشهای تحلیلی مانند آزمون تی مستقل، آزمون مجذور کای و آزمون دقیق فیشر استفاده گردید. همچنین از محاسبه نسبت خطر با حدود اطمینان ۹۵٪ نیز برای تعیین اثر استفاده شد. در تمامی مراحل تحقیق حد معنی داری آماری معادل  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

پروتکل این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تصویب قرار گرفت. بر اساس اصول اخلاقی مداخلات لازم به بیماران توضیح داده شد و برای همه بیماران بعد از ارائه توضیحات لازم بر گه رضایت آگاهانه پر گردید.

## یافته ها

تعداد ۳۴ نفر در گروه مداخله با دریافت G-CSF و ۳۸ نفر در گروه کنترل قرار گرفتند. میانگین سنی شرکت کنندگان ۳۴/۱ سال با انحراف معیار ۶/۴ سال بود. حد اقل سنی شرکت کنندگان ۲۰ و حد اکثر آن ۴۵ سال بود. میانگین سنی در گروه مداخله ۳۴/۳ سال و در گروه کنترل ۳۳/۹ سال بدون اختلاف معنی دار آماری بود. میانگین نمایه توده بدنی شرکت کنندگان ۲۶ کیلوگرم بر متر مربع

جدول ۱: توزیع افراد مورد مطالعه بر حسب عامل نازائی به تفکیک گروه

عامل نازائی	گروه کنترل		گروه مداخله		کل موارد
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
عامل مردانه	۲۲	۵۳/۶۶	۱۹	۴۶/۳۴	۴۱
عامل لوله ای	۱	۱۶/۶۷	۵	۸۳/۳۳	۶
تخمندان پلی کیستیک	۱	۲۵	۳	۷۵	۴
کمبود ذخیره	۴	۸۰	۱	۲۰	۵
نامعین	۴	۴۰	۶	۶۰	۱۰
جمع	۳۲	۴۸/۴۸	۳۴	۵۱/۵۲	۶۶

جدول ۲: مقایسه پیامد بارداری آزمایشگاهی در تزریق داخل رحمی G-CSF با گروه کنترل در بیماران با شکست لانه گزینی مکرر

پیامد مورد مطالعه	گروه مداخله	گروه کنترل	مقدار پی	خطر نسبی (حدود اطمینان ۹۵٪)
$\beta$ HCG مثبت	۳ (۸/۸٪)	۱ (۲/۲٪)	۰/۱۴	۴/۴ (۰/۳-۴۹/۰)
$\beta$ HCG منفی	۳۱ (۹۱/۲٪)	۳۶ (۹۷/۳٪)		
دارای ساک حاملگی حاوی قطب جنینی با ضربان قلب	۳ (۸/۸٪)	۱ (۲/۲٪)	۰/۱۵	۴/۳ (۰/۲-۳۹/۴۷)
فاقد ساک حاملگی حاوی قطب جنینی با ضربان قلب	۳۱ (۹۱/۲٪)	۳۶ (۹۷/۳٪)		

## بحث

شده است. در یک مطالعه کارآزمایی بالینی ۳۵ بیمار تحت درمان با G-CSF زیر جلدی با گروه دریافت کننده پلاسبو مقایسه شدند و نشان داده شد که G-CSF می تواند در درمان سقط مکرر کاربرد داشته باشد (۷). مطالعه دیگری نیز استفاده از G-CSF را در درمان سقط مکرر موثر دانسته است (۱۲).

درخصوص مکانیسم تاثیر احتمالی G-CSF بر اندومتر اطلاعات کمی در دسترس است. G-CSF یک گلیکوپروتئین با فاکتور رشد و عملکرد سیتوکینی است و در بافتهای مختلف، از جمله اندوتلیوم ماکروفاژها و سایر سلولهای ایمنی تولید می شود. G-CSF و GM-CSF به نظر می رسد در طیف گسترده ای از فرایند باروری نقش داشته باشد. Yanagi و همکاران (۲۰۰۲) تغییرات دوره ای در mRNA مربوط به G-CSF را در مایع فولیکولی در طول چرخه قاعدگی گزارش نموده اند (۱۳). Salmassi و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ گیرنده G-CSF را در سلولهای گرانولوزا لوتئینه انسانی شناسایی کردند (۶). همچنین G-CSF مایع فولیکولی به عنوان نشانگر مفیدی از صلاحیت تخمک قبل از لقاح پیشنهاد شده است (۵). با بررسی اثر G-CSF در تکثیر و تمایز سلول های طبیعی استرومای اندومتر انسان، تاناکا و همکاران به این نتیجه رسیدند که G-CSF باعث افزایش Decidulization سلولهای استرومایی اندومتر از طریق cAMP به هر دو طریق اتوکرین و پاراکرین می گردد (۴).

## نتیجه گیری

با در نظر گرفتن یافته های مطالعه حاضر و نتایج مطالعات قبلی به نظر می رسد هنوز شواهد متقنی مبنی بر اثر G-CSF بر بهبود پیامد باروری در بیماران با شکست لانه گزینی مکرر وجود ندارد.

## قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات سلامت باروری که حمایت مالی و اجرایی این پروژه را عهده دار بود تقدیر و تشکر می گردد.

مطالعه حاضر به بررسی اثر G-CSF بر پیامد حاملگی آزمایشگاهی در بیماران با شکست لانه گزینی مکرر در یک طرح مطالعه کارآزمایی بالینی با گروه کنترل پرداخت. در این مطالعه هرچند از نظر توصیفی حاملگی بالینی و آزمایشگاهی در افراد دریافت کننده G-CSF بصورت تزریق در اندومتر بیشتر مشاهده شد، اما اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود. مطالعات قبلی حاکی از تاثیر G-CSF در زنان با آندومتر نازک مقاوم در برابر درمان های استاندارد هستند، که قادر به رساندن ضخامت آندومتر به حداقل ۷ میلی متر جهت انتقال جنین بوده است (۱۰). با این حال در حضور یک آندومتر نرمال، G-CSF اثر تقویتی خود را از دست می دهد و یا حداقل زمانی که به داخل حفره آندومتر تزریق شده است می توان چنین نتیجه گیری داشت (۸).

در یک مطالعه کارآزمایی بالینی کوچک که با طرح نیمه تجربی انجام شده بود، ۲۱ بیمار دارای آندومتر کمتر از ۷ میلی متر همزمان با تجویز هورمون hCG تحت درمان با G-CSF نیز قرار گرفتند که در نتیجه افزایش قابل توجهی در ضخامت آندومتر و ۱۹/۱٪ افزایش در نرخ بارداری روی داد (۹). لیکن مطالعه دیگری با اندازه بزرگتر که بصورت کارآزمایی بالینی تصادفی انجام یافته بود مشابه مطالعه ما تفاوت معنی داری بین گروه مداخله و گروه کنترل از نظر پیامدهای حاملگی بالینی یا آزمایشگاهی نیافته بود (۸). البته مطالعه مذکور بر روی افرادی با میانگین سنی بالا انجام یافته بود که باید در تفسیر نتایج مد نظر قرار گیرد.

مطالعه اخیر دیگری در سال ۲۰۱۴ در آنکارا با هدف بررسی اثر G-CSF بر لانه گزینی در بیماران با شکست لانه گزینی مکرر روی ۳۲ بیمار انجام دادند G-CSF به صورت داخل رحمی در روز تزریق HCG انفوزیون می شد و به صورت زیر جلدی در روز برداشت تخمک تزریق می شد. در ۹ بیمار فقط داخل رحمی و در ۱۵ نفر زیر جلدی و در ۸ نفر با هر دو روش تزریق انجام شد. میزان حاملگی به ترتیب ۴۴٪، ۶۰٪، ۷۵٪ بود ولی به علت کم بودن جمعیت مورد مطالعه نتایج قابل تعمیم نبود (۱۱).

علاوه بر لقاح آزمایشگاهی در حالات دیگری از سلامت زنان نیز از G-CSF استفاده شده و شکل سیستمیک آن بکار رفته است. در سقط عادی G-CSF سیستمیک بصورت زیر جلدی نیز تجویز

## References

1. Yktaatlb Sun, Parsanezhad M. The effect of group therapy on depression and anxiety in infertile women. *Journal of Jondi Shapour University of Medical Sciences* 2003; **38**: 7.
2. Mansour R, Tawab N, Kamal O, El-Faissal Y, Serour A, Aboulghar M, et al. Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer significantly improves the implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility* 2011; **96**(6): 1370-1374. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.09.044
3. Fritz MA, Speroff L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2011. PP: 1439
4. Tanaka T, Miyama M, Masuda M, Mizuno K, Sakamoto T, Umesaki N, et al. Production and physiological function of granulocyte colony-stimulating factor in non-pregnant human endometrial stromal cells. *Gynecological endocrinology. The Official Journal of The International Society of Gynecological Endocrinology* 2000; **14**(6): 399-404. doi: 10.3109/09513590009167710

5. Ledee N, Petitbarat M, Rahmati M, Dubanchet S, Chaouat G, Sandra O, et al. New pre-conception immune biomarkers for clinical practice: interleukin-18, interleukin-15 and TWEAK on the endometrial side, G-CSF on the follicular side. *Journal of Reproductive Immunology* 2011; **88**(2): 118-123. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.007
6. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertility and Sterility* 2004; **81** Suppl 1: 786-791. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.039
7. Scarpellini F, Sbracia M. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Human Reproduction* 2009; **24**(11): 2703-2708. doi: 10.1093/humrep/dep240
8. Barad DH, Yu Y, Kushnir VA, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, Lee HJ, et al. A randomized clinical trial of endometrial perfusion with granulocyte colony-stimulating factor in in vitro fertilization cycles: impact on endometrial thickness and clinical pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 2014; **101**(3): 710-715. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.016
9. Gleicher N, Kim A, Michaeli T, Lee HJ, Shohat-Tal A, Lazzaroni E, et al. A pilot cohort study of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of unresponsive thin endometrium resistant to standard therapies. *Human Reproduction* 2013; **28**(1): 172-177. doi: 10.1093/humrep/des370
10. Gleicher N, Vidali A, Barad DH. Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertility and Sterility* 2011; **95**(6): 2123-2137. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.143
11. Zeyneloglu H, Onalan G, Durak T, Alyazici I, Unal E. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (G-CSF) administration for art patients with repeated implantation failure (RIF): which route is best? *Fertility and Sterility* 2013; **100**(3). doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1031
12. Santjohanser C, Knieper C, Franz C, Hirv K, Meri O, Schleyer M, et al. Granulocyte-colony stimulating factor as treatment option in patients with recurrent miscarriage. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 2013; **61**(2): 159-164. doi: 10.1007/s00005-012-0212-z
13. Yanagi K, Makinoda S, Fujii R, Miyazaki S, Fujita S, Tomizawa H, et al. Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Human Reproduction* 2002; **17**(12): 3046-3052. doi: 10.1093/humrep/17.12.3046