



الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق
كلية العلوم
قسم علم الحياة الحيوانية

دراسة الميلاتونين ومستقبله في الخلايا الحبيبية المبيضية

حالة دراسية: تأثيره على نتائج الحمل لدى المريضات الخاضعات للإخصاب المساعد

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في علم الحياة الحيوانية

إعداد الباحثة

ولاء عصام ناجي

إشراف

المشرف المشارك

أ.د. مروان الحلبي

كلية الطب - جامعة دمشق

المشرف الرئيس

أ.د. أميرة أومري

كلية العلوم - جامعة دمشق

2026/2025

إهداء من القلب



الحمد لله فوق حمد الحامدين، والشكر لله عدد ما ذكره الذاكرون وشكره الشاكرون في الأرض والسماء. وما كان لإنجاز بحثي هذا أن يكتمل لولا لطفه وعنايته وإحاطته الكاملة بكل تفصيل، صغير وكبير، مما لا أستطيع إحصاءه. لطفه العميم الذي غمرني لإتمام هذا العمل، كما كان يحيطني في شؤون حياتي كافة.



إلهي، مهما ذكرت أو وصفت أو فصلت للناس، فلن أوفيك جزءاً، ولا حتى جزءاً من جزء من حقك عليّ، وأكتفي بأن أظل في سجودٍ لجلالك وقدرتك، سجود الحامدين الشاكرين ما حييت، لعلّي أبلغ رضاك يوم تكرمني بلباقك.



وأتبع ثنائي على الله بالصلاة والسلام على صاحب المقام المحمود، حبيبنا المصطفى محمد □، منار الهدى وشفيع الأنام، الذي أخرجنا الله به من ظلمات الجهل إلى أنوار العلم واليقين، فصلوات ربي وسلامه عليه وعلى آله وصحبه المنتجبين كلما ذكره الذاكرون وغفل عن ذكره الغافلون.



- إلى أستاذتي القديرة أ.د. أميرة أومري:

صاحبة القلب الكبير، والخير الحقيقي، والسعي الحثيث. الداعمة لي في كل لحظة استوقفتني فيها عجلة الحياة عن إتمام بحثي، فكانت نعم المعينة والمساندة. ولم أكن لأعرف عمق نبيلها إلا بعد أن أكرمني الله عز وجل بلقائها، لتكون في وقت قل فيه وجود الإنسان الفاضل؛ مشرفة على بحثي. وإن لي الشرف الحقيقي بمعرفتها، والاستمرار بالامتنان لها على كل شيء.

- إلى أستاذي القدير أ.د. مروان الحلبي:

القُدوة العلمية التي تنير درب الأجيال، والهمة العالية، والابتسامة الطيبة. من غمرني بالمساعدة والدعم العلمي في كل الأوقات، متجاوزاً مشاغل العمل التي تحيط به؛ تسبقه إنسانيته العالية لتقديم يد العون وتهوين الصعاب. وإنه لتوفيق إلهي أن يكرمني الله بإنجاز بحثي الماجستير والدكتوراه تحت إشرافه وإرشاده وتوجيهه.

- إلى رئيس قسم علم الحياة أ.د. شادي سكرية:

كل العرفان والامتنان لمن يحمل كل معاني الإنسانية والعطاء، ليس فقط كرئيسٍ للقسم، بل منذ أيام الدراسة في الإجازة الجامعية؛ عندما كان -وسيبقى- أستاذي الذي أعتزُّ به وبعطائه الذي لا تحدُّ حدودُ.

- إلى أعضاء لجنة التحكيم الموقرة:

أتوجه بالشكر الجزيل والتقدير الوفير لجنايبكم الكريم، لقبولكم مناقشة أطروحة الدكتوراه هذه، وعلى سعيكم وحرصكم لتقويمها وإظهارها بأفضل شكلٍ علميٍّ ممكن. رفع الله مكانتكم في الدارين، وجزاكم عني كل الخير.

- إلى إخوة العلم وزملاء الدراسة:

لن أنسى الجنود المجهولين المساهمين في هذا البحث من زملائي وزميلاتي؛ وتكثر الأسماء؛ ممن ساعد ودعم ووقف معي جنباً إلى جنب لتيسير الأمور كافة، سواءً في الجامعة أو في مشفى الشرق. جزاكم الله جميعاً كل الخير، ووفقكم لما فيه رضاه.

إهداء

✚ إلى الروح التي ترافقتي مع كل نبضة قلبٍ وتتصاعد نفس:

والدي الحبيب د. عصام عباس -رحمه الله وأسكنه فسيح جنانه-؛ الذي لم يكن من نصيبي أن أفرح بفرحه في الدنيا بأطروحة الماجستير أو أطروحة الدكتوراه، لتبقى كل سعادة تغصّ بدمعة فقده، لكنه يظل في روحي الدافع الأكبر والأكثر سعادةً بما أحقق .

✚ إلى رفيقة روحي وصاحبة الأيادي البيضاء:

أمي الحبيبة د. أميرة محمد؛ الداعمة لي على الأصعدة كافة بلا استثناء وفي كل خطوات حياتي، والأمل الذي أتمنى أن أنال رضا الباري فيه؛ من تعلقت روحي بروحها ولا أرى للحياة معنى إن لم تكن حولي في كل حين.

✚ إلى من اختارهم الله ليكونوا لي إخوة وأحبة:

أخي علاء، وأخي د. هدف الخال الحنون لأولادي؛ أتمنى من الله لكم كل الخير والتوفيق، وأسأله أن يوفقك يا د. هدف الغالي لإكمال مسيرة والدنا -رحمه الله- الطبية بإنجازاتك الرائعة.

✚ إلى صديقتي وأختي الوحيدة والحبيبة:

د. رهن؛ التي أحدثها كما أحدث نفسي، وتوأم روحي، أتمنى من الله لك كل السعادة والخير.

✚ إلى شريك العمر ورفيق الدرب وسكن القلب:

زوجي الحبيب إقبال الغالي؛ من اختاره الإله ليكون زوجاً ورفيقاً وسكناً لي في الدنيا، وأسأله تعالى أن يجمعنا كذلك في الآخرة.

✚ إلى فلذات كبدي، ونور عيني، وقطع روحي وهبني الله إياها:

- ابنتي ونورة أيامي وصديقتي الحبيبة رقية الحنونة الذكية.
- ولدي الحبيب قاسم الرائع، ملك الإحساس والطيبة.
- صغيرتي ريحانة الحنونة الحبيبة، شكلي وطفولتي المصغرة.

فهرس المحتويات

VI الملخص

1 الفصل الأول: المقدمة Introduction

1	الإطار العام للبحث:	2
2	مقدمة البحث:	2-1
3	إشكالية البحث:	2-1
3	تساؤلات البحث:	3-1
4	مسلمات البحث:	4-1
4	أهمية البحث:	5-1
4	أهداف البحث:	6-1
5	مسوغات البحث:	7-1
5	حدود البحث:	8-1

6 الفصل الثاني: الدراسة المرجعية Literature Review

7	الميلاتونين:	7
7	تعريف الميلاتونين:	2-1
8	الغدة الصنوبرية و تركيب الميلاتونين:	2-2
9	أثر الضوء والظلام على إفراز الميلاتونين:	3-2
11	خصائص الميلاتونين:	2-4
12	الميلاتونين والمبيض:	5-2
15	الميلاتونين والسائل الجريبي:	6-2
17	مصادر الميلاتونين في السائل الجريبي:	7-2
18	الميلاتونين والإجهاد التأكسدي:	8-2
23	الميلاتونين والحمل:	9-2
26	الميلاتونين والمشيمة:	10-2
28	الأدوار المفترضة للميلاتونين في الجريب المبيضي:	11-2
29	الميلاتونين والميتاكوندريا والتقدم بالعمر:	12-2
30	مستقبلات الميلاتونين Melatonin receptors:	13-2

37 الفصل الثالث: المواد والطرائق Materials and Methods

38	عينة الدراسة:	1-3
38	التحريض المبيضي:	2-3
38	طريقة جمع العينات:	3-3
42	مراحل العمل:	4-3
42	المرحلة الأولى: عزل الخلايا الحبيبية بطريقة بيركول	1-4-3
44	المرحلة الثانية: عزل الرنا الكلي totalRNA من الخلايا باستخدام كيت RNeasy plus Mini Kit (50)	2-4-3
46	المرحلة الثالثة: اصطناع cDNA حسب كيت Transcriptor High Fidelity c DNA – Synthesekit	3-4-3
47	المرحلة الرابعة: اجراء RT-PCR لتحديد مستوى التعبير عن مستقبلات الميلاتونين MT1	4-4-3

48 المرحلة الخامسة: معايرة الميلاتونين بالدم والسائل الجريبي بطريقة الاليزا 5-4-3

52.....Results الفصل الرابع: النتائج

53 نتائج المرحلة الأولى عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي باستخدام محلول بيركول: 1-4

57 عزل الرنا من الخلايا الحبيبية المستخلصة واصطناع cDNA: 2-4

58 RT-PCR: 3-4

63 المعالجة الإحصائية المستخدمة: 4-4

63 الإحصاءات الوصفية: 5-4

65 دراسة خضوع متغيرات الدراسة الكمية للتوزيع الطبيعي: 6-4

66 دراسة ارتباط متغيرات الدراسة مع نتيجة الحمل (سلبي، ايجابي): 7-4

67 دراسة الارتباط بين متغيرات الدراسة الكمية: 8-4

71 تحليل الحساسية والنوعية باستخدام منحنى ROC Curve: 9-4

71 تحليل حساسية ونوعية نسبة الميلاتونين بالدم ونتيجة الحمل: 1-9-4

75 تحليل حساسية ونوعية نسبة الميلاتونين بالدم ونتيجة الحمل: 2-9-4

79 تحليل حساسية ونوعية RQ ونتيجة الحمل: 3-9-4

84.....Discussion الفصل الخامس: المناقشة

85 المناقشة: 5

94.....Conclusions & Recommendations الاستنتاجات والتوصيات

95 الاستنتاجات: 1-6

95 التوصيات: 2-6

96.....المراجع

96.....References

97 English Sources:

105.....الملاحق

109.....Abstract

فهرس الأشكال

- الشكل رقم (1) : (1) الصيغة الكيميائية للميلاتونين 7
- الشكل رقم (2) : (2) المسار الحيوي لاصطناع الميلاتونين في الغدة الصنوبرية 9
- الشكل رقم (3) : (3) تحديد موقع الغدة الصنوبرية والنوى فوق التصالبية واستقبال الضوء 10
- الشكل رقم (4) : (4) شكل لجريبات المبيض 13
- الشكل رقم (5) : (5) التوازن بين أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) ومضادات الأكسدة في الجريب 19
- الشكل رقم (6) : (6) الوظائف المقترحة للميلاتونين في جريب غراف وأثناء الحمل 21
- الشكل رقم (7) : (7) تأثير الميلاتونين على المشيمة أثناء الحمل 25
- الشكل رقم (8) : (8) تمثيل تخطيطي لمسار التزامن المقترح ودور الميلاتونين في نظام الأم والمشيمة والجنين 27
- الشكل رقم (9) : (9) شكل تخطيطي يوضح الأدوار المفترضة للميلاتونين في الجريب المبيضي 28
- الشكل رقم (10) : (10) مسار الإشارات الخلوية المنشط بواسطة مستقبل الميلاتونين 30
- الشكل رقم (11) : (11) وظائف مستقبلات الميلاتونين MT1, MT2, MT3 في الجملة العصبية المركزية والنسج الأخرى 33
- الشكل رقم (12) : (12) أنابيب الهيبارين المستعملة وفيها عينات السائل الجريبي 40
- الشكل رقم (13) : (13) أبندروفات لعينات السائل الجريبي بعد تثقيفها 41
- الشكل رقم (14) : (14) كيت استخلاص الـ mRNA 44
- الشكل رقم (15) : (15) جهاز RT-PCR 47
- الشكل رقم (16) : (16) كيت الأليزا لمعايرة الميلاتونين (LDN) 48
- الشكل رقم (17) : (17) جهاز معايرة الميلاتونين 49
- الشكل رقم (18) : (18) عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي باستخدام مدرج الكثافة بيركول 54
- الشكل رقم (19) : (19) الساحة المجهرية رقم (1) 55
- الشكل رقم (20) : (20) الساحة المجهرية رقم (2) 55
- الشكل رقم (21) : (21) الساحة المجهرية رقم (3) 56
- الشكل رقم (22) : (22) الساحة المجهرية رقم (4) بتكبير x40 56
- الشكل رقم (23) : (23) رحلان RNA على هلامه الاغاروز 57
- الشكل رقم (24) : (24) مخطط تمثيلي لبرنامج تفاعل RT-qPCR 58
- الشكل رقم (25) : (25) منحنيات التضخم 59
- الشكل رقم (26) : (26) مخطط الانصهار 60
- الشكل رقم (27) : (27) المرشحات النوعية للجين الهدف 61
- الشكل رقم (28) : (28) النسب المئوية لتوزع عينة الدراسة حسب نتيجة الحمل 64
- الشكل رقم (29) : (29) منحني ROC لقيم نسبة الميلاتونين في الدم والذي يمثل الحساسية على المحور العمودي ومتمم النوعية على المحور الأفقي حسب متغير نتيجة الحمل 71
- الشكل رقم (30) : (30) منحني ROC لقيم نسبة الميلاتونين في الدم حسب متغير نتيجة الحمل مع تحديد النقطة أفضل نقطة قطع 72
- الشكل رقم (31) : (31) توزيع نتيجة الحمل حسب نسبة الميلاتونين في الدم 75
- الشكل رقم (32) : (32) منحني ROC لقيم نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي والذي يمثل الحساسية على المحور العمودي ومتمم النوعية على المحور الأفقي حسب متغير نتيجة الحمل 75
- الشكل رقم (33) : (33) منحني ROC لقيم نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي حسب متغير نتيجة الحمل مع تحديد النقطة أفضل نقطة قطع 76
- الشكل رقم (34) : (34) توزيع نتيجة الحمل حسب نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي 79
- الشكل رقم (35) : (35) منحني ROC لقيم RQ والذي يمثل الحساسية على المحور العمودي ومتمم النوعية على المحور الأفقي حسب متغير نتيجة الحمل 79
- الشكل رقم (36) : (36) منحني ROC لقيم RQ حسب متغير نتيجة الحمل مع تحديد النقطة أفضل نقطة قطع 80
- الشكل رقم (37) : (37) توزيع نتيجة الحمل حسب RQ 83

فهرس الجداول

34.....	الجدول رقم (1): توزع مستقبلات الميلاتونين MT1,MT2 المعبر عنها في الأنسجة البشرية.
46.....	الجدول رقم (2): مكونات المزيج (1) لاصطناع cDNA
46.....	الجدول رقم (3): مكونات تحضير المزيج (2) وإضافته إلى المزيج (1).
62.....	الجدول رقم (4): نتائج تحليل الـ RT-PCR لعينات الـ cDNA (42-1)
63.....	الجدول رقم (5): وصف عينة الدراسة حسب نتيجة الحمل
64.....	الجدول رقم (6): الإحصاء الوصفي للمتغيرات الكمية*
65.....	الجدول رقم (7): دراسة طبيعية متغيرات الدراسة الكمية
66.....	الجدول رقم (8): نتائج اختبار الفرق بين المتغيرات الكمية وفقاً لمتغير نتيجة الحمل
68.....	الجدول رقم (9): دراسة العلاقة بين المتغيرات الكمية
69.....	تتمة الجدول رقم (10): دراسة العلاقة بين المتغيرات الكمية
72.....	الجدول رقم (11): المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المعنوية حسب متغير نتيجة الحمل وفق نسبة الميلاتونين بالدم.
73.....	الجدول رقم (12): قيم الحساسية ومتم النوعية لنسبة الميلاتونين في الدم وفق نتيجة الحمل (سلبى، ايجابى)
74.....	الجدول رقم (13): توزع نتيجة الحمل وفق أفضل نقطة قطع لنسبة الميلاتونين بالدم
76.....	الجدول رقم (14): المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المعنوية حسب نتيجة الحمل وفق نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي
76.....	الجدول رقم (15): قيم الحساسية ومتم النوعية لنسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي وفق نتيجة الحمل (سلبى، ايجابى)
78.....	الجدول رقم (16): توزع نتيجة الحمل بين المشاهد والمتوقع وفق أفضل نقطة قطع لنسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي
80.....	الجدول رقم (17): المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المعنوية حسب متغير نتيجة الحمل وفق RQ
81.....	الجدول رقم (18): قيم الحساسية ومتم النوعية لـ RQ وفق نتيجة الحمل (سلبى، ايجابى)
82.....	الجدول رقم (19): توزع نتيجة الحمل بين المشاهد والمتوقع وفق أفضل نقطة قطع لـ RQ

جدول المصطلحات والاختصارات العلمية

(Glossary of Terms and Abbreviations)

المصطلح بالإنكليزية (English Term)	الاختصار (Abbreviation)	الترجمة المعتمدة بالعربية (Arabic Translation)
In Vitro Fertilization	IVF	الإخصاب المساعد / الإخصاب في المختبر
Intracytoplasmic Sperm Injection	ICSI	حقن النطفة داخل السيتوبلازم (الحقن المجهرى)
Reactive Oxygen Species	ROS	أنواع الأكسجين التفاعلية (الجذور الحرة)
Real-Time Polymerase Chain Reaction	RT-PCR	تفاعل البوليميراز المتسلسل بالوقت الحقيقي
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA	المقايضة المناعية المرتبطة بالإنزيم (الإليزا)
Melatonin Receptor 1	MT1	مستقبل الميلاتونين الأول
Melatonin Receptor 2	MT2	مستقبل الميلاتونين الثاني
Relative Quantification	RQ	كمية التعبير النسبي / التعبير النسبي
Receiver Operating Characteristic Curve	ROC Curve	منحنى مميزات تشغيل المستقبل
Messenger Ribonucleic Acid	mRNA	الحمض الريبى النووي المرسال
Complementary Deoxyribonucleic Acid	cDNA	الدنا المتمم (الحمض النووي الريبى منقوص الأكسجين المتمم)
Phosphate-Buffered Saline	PBS	المحلول الملحي الفوسفاتي الدارى
Fetal Bovine Serum	FBS	مصل الجنين البقرى
Oxidative Stress	-	الإجهاد التأكسدي
Superoxide Dismutase	SOD	سوبر أكسيد ديسموتاز
Glutathione Peroxidase	GPX	غلوتاثيون بيروكسيداز
Glutathione Reductase	GSR	مختزل الغلوتاثيون (غلوتاثيون ريدوكتاز)
Nitric Oxide Synthase	NOS	اصطناع أكسيد النيتريك (نيتريك أوكسيد سينثاز)
Follicular Fluid	FF	السائل الجريبى
Granulosa Cells	GCs	الخلايا الحبيبية
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	وسط ديلبيكو المعدل (وسط زرع الخلايا)

الملخص

الميلاتونين هو هرمون تفرزه الغدة الصنوبرية وتنظمه الساعة البيولوجية، وله دور مهم جداً كمضاد قوي للأكسدة ومنظم لوظائف المبيض. تحدد جودة البويضة ونضجها داخل الجريب المبيضي نجاح عمليات الإخصاب المساعد ونتائج الحمل، حيث تلعب الخلايا الحبيبية المبيضة دوراً حيوياً ومباشراً في توفير البيئة الحيوية الملائمة لنمو البويضة وحمايتها من الإجهاد التأكسدي. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم كفاءة طريقة معدلة محلياً لعزل الخلايا الحبيبية باستخدام مدرج الكثافة بيركول (Percoll)، ومقايضة مستويات هرمون الميلاتونين كمضاد قوي للأكسدة في مصل الدم والسائل الجريبي بالإليزا، بالإضافة إلى تحديد التعبير الجيني لمستقبل الميلاتونين الأول (MT1) في هذه الخلايا، وربط هذه المؤشرات بجودة البويضات وتحقيق الحمل الناجح. شملت الدراسة عينة مكونة من 42 امرأة (بأعمار أقل من 38 عاماً) يعانين من عقم مجهول السبب أو عقم ذكوري، ويخضعن لتقانة الإخصاب المساعد (IVF/ICSI). أظهرت النتائج نجاحاً عالياً لمدرج بيركول في عزل وفصل الخلايا الحبيبية بنقاوة ممتازة وحمايتها من التلوث بخلايا الدم الأخرى. كما كشف التحليل الجزيئي بواسطة تقنية الـ RT-qPCR عن وجود تعبير جيني واضح لمستقبل الميلاتونين الأول (MT1) في 15 حالة من الحالات المدروسة (حيث تجاوزت قيمة التعبير النسبي RQ الواحد الصحيح). وبين تحليل منحني ROC التشخيصي أن زيادة قيمة الـ RQ عن 3.1795 تعد مؤشراً حيوياً قوياً يتنبأ بارتفاع احتمالية الحصول على نتيجة حمل إيجابية. في المقابل، لم يثبت إحصائياً وجود فروق ذات دلالة حاسمة تربط مستويات هرمون الميلاتونين الإجمالية في الدم أو السائل الجريبي مباشرة مع نتائج الحمل الإجمالي، مما يعكس أن تحقق الحمل هو نتاج متعدد العوامل تتكامل فيه الاستجابة الجزيئية الموضعية للمستقبلات داخل الجريب المبيضي.

الكلمات المفتاحية: الميلاتونين - السائل الجريبي - مدرج بيركول - الخلايا الحبيبية - الإليزا - الجذور

الحرة في المبيض ROS.

الفصل الأول المقدمة

Introduction

1. الإطار العام للبحث:

1-1- مقدمة البحث:

يعرف العقم على أنه عدم القدرة على تحقيق الانجاب بعد عام من الزواج بدون استعمال موانع الحمل مع علاقات زوجية متواترة، وهناك عقم غير مفسر بعد استبعاد الأسباب الشائعة للعقم، مثل عدم حصول الإباضة وضعف جودة السائل المنوي أو أمراض قناة فالوب، وإلى ما هنالك. على الرغم من أن أسباب العقم مجهولة السبب غير معروفة حالياً، إلا أن هناك عوامل أخرى تؤثر على خصوبة المرأة مثل وجود وفرة زائدة من أنواع الأكسجين التفاعلية (الجذور الحرة) Reactive Oxygen Species (ROS) في السائل الجريبي لدى النساء المصابات بالعقم مجهول السبب، وأيضاً وجود مستويات منخفضة من مضادات الأكسدة في السائل الجريبي لدى النساء الخاضعات لتقييم العقم مجهول السبب. علاوة على ذلك تجدر الإشارة إلى أن جودة الأجنة ونضج البويضات يرتبطان سلباً بارتفاع مستويات ROS في بطانة الرحم لدى النساء المصابات بالعقم (Espino et al., 2019).

ويعد العقم مشكلة طبية إضافة إلى أنه مشكلة اجتماعية، ويزداد انتشاره بالدول المتقدمة والدول النامية وتعد طرق الإخصاب المساعد In Vitro Fertilization (IVF) كعلاج مهم منتشر بشكل واسع منذ 35 عاماً تقريباً، ولكن من أهم المعضلات التي تواجه نجاح هذه التقنية هو رداءة جودة البويضة، حيث إن جودة البويضة ضرورية جداً لنجاح IVF وإلى حد الآن لم نجد مؤشر يفيد في تحديد جودة البويضة.

يحتوي السائل الجريبي Follicular Fluid (FF) على خلايا الركام البيضي Cumulus Cells التي تحيط بالخلية البيضية (البويضة) وعلى الخلايا الحبيبية الجدارية Mural Granulosa Cells التي تصنع جدار الجريب. يتم انتاج ROS في الجريب أثناء عملية الإباضة Ovulation لأنها تلعب دوراً فيزيولوجياً في عملية الإباضة وتمزق الجريب، ومع ذلك فإن كمية زائدة منه تسبب الإجهاد التأكسدي Oxidative Stress وقد تتلف البويضة والخلايا الحبيبية وخلايا الركام البيضي. أظهرت الدراسات أن ROS تسرع شيخوخة البويضة وتدهور جودتها وأن الميلاتونين قابط ROS ويحمي البويضة من الإجهاد التأكسدي، مما يحسن جودتها ويحسن معدل الإخصاب.

الإجهاد التأكسدي هو حالة تحدث عندما يكون هناك فائض من ROS ونقص في مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية، مما يؤدي إلى العديد من التأثيرات الضارة على الجزيئات الحيوية المختلفة، بما في ذلك الدهون والبروتينات والحمض الريبي النووي، ونظراً لدوره البارز في مسببات العديد من الأمراض المزمنة، أصبح ROS ظاهرة مدروسة على نطاق واسع ويبحث الباحثون باستمرار عن مضاد للأكسدة مثالي وآمن وفعال لمكافحته.

الميلاتونين هو هرمون يفرز من قبل الغدة الصنوبرية، وله تأثيرات مختلفة على العديد من العمليات الفيزيولوجية المختلفة في الجسم، كما يلعب دوراً مهماً في العديد من الوظائف المختلفة بما في ذلك الايقاعات اليومية والخصوبة والتكاثر والانجاب، كما أن الميلاتونين له تأثيرات عديدة عبر مستقبلات غشائية محددة ويعمل أيضاً، كمزيل مباشر لـ ROS.

الميلاتونين هو أحد هذه المركبات التي تم اعتبارها على نطاق واسع كمضاد للأكسدة فعال لعلاج الاجهاد التأكسدي. يتم إنتاج الميلاتونين الذي يعد قابط قوي لـ ROS أيضاً في المبيض ويعمل على قبط الزيادة من ROS وتحقيق التوازن بين انتاج ROS وزيادتها في المبيض وبالتالي تحسين معدل الإخصاب، ويتم تحديد التعبير الجيني لمستقبلات الميلاتونين (MT1) Melatonin Receptor1 و Melatonin Receptor2 (MT2) في الأنسجة التناسلية البشرية Human Reproductive Tissues بما في ذلك ظهارة الثدي Breast Epithelium وعضلة الرحم Uterine Myometrium والخلايا الحبيبية والخلايا الأصفرية المبيضية.

2-1- إشكالية البحث:

تبدأ الخصوبة عند النساء بالانخفاض بعمر 35 عاماً وتتناقص بسرعة أكبر بعمر 40 عاماً وذلك بسبب نقص عدد البويضات أو (الخلايا البيضية) وسوء نوعيتها حيث يزداد العقم والاجهاض والعيوب الخلقية عند الاجنة بالإضافة للشذوذات الصبغية.

ويعد العقم مشكلة طبية إضافة إلى أنه مشكلة اجتماعية ويزداد انتشاره بالدول المتقدمة والدول النامية، وتعد الـ IVF كعلاج مهم منتشر بشكل واسع منذ 35 عاماً تقريباً، ولكن من أهم المعضلات التي تواجه نجاح هذه التقنية هو رداءة جودة البويضة.

3-1- تساؤلات البحث:

هل هناك علاقة بين كمية الميلاتونين في الدم أو السائل الجريبي ونتاج الحمل؟

هل هناك علاقة بين كمية التعبير الجيني عن مستقبلات MT1 في الخلايا الحبيبية ومعدل نجاح تقانات الإخصاب المساعد؟

هل يمكن لمكملات الميلاتونين أثناء تقنيات IVF أن تزيد من معدل نجاح حصول الحمل وقياس جودة البويضة؟

وبما أن الجسم قادر على إنتاج الميلاتونين فهل لذلك الأمر أي تأثير على عمليات الإخصاب بشكل عام؟

4-1- مسلمات البحث:

ROS هي مجموعة من الجزيئات والأيونات الصغيرة المشتقة من الأوكسجين تتميز بقدرتها الفائقة على أكسدة المركبات العضوية الحيوية، وتنتج في الجريب بشكل طبيعي خلال عملية الإباضة ونقص تحديدًا من (0-14) يوم، ويكون له دور في عملية الإباضة وتمزق الجريب؛ وفي حال زاد عن الحد المعين يسرع من تقدم عمر البويضة، ويؤدي إلى تراجع جودتها ويقلل معدل الإخصاب كما يؤثر على انقسامها بعد الالتحاق وأيضاً يخرب الخلايا الجريبية، فيحدث أذية تضر بالجسم الأصفر.

يعزز الميلاتونين التعبير ونشاط العديد من الأنزيمات المضادة للأكسدة مثل سوبر أوكسيد ديسموتاز (SOD) Superoxide Dismutase والغلوتاثيون بيروكسيداز (GPX) Glutathione Peroxidase والغلوتاثيون ريدوكتاز (GSR) Glutathione Reductase، بينما يثبط نشاط أنزيم نيتريك أوكسيد سينثاز (NOS) Nitric Oxide Synthase، وبأدواره هذه يعزز نضج البويضة. ولوجه الشبه الكبير بين الخصائص البيولوجية للإنسان والفئران، أكدت الدراسات السابقة التي أجريت على الفئران أن وفرة الميلاتونين تنقص مع العمر، ونقص الميلاتونين بالسائل الجريبي له أهمية كبيرة في مجال طب الإنجاب الشيخوخي.

الميلاتونين محب للدهون ومحب للماء لهذا يعبر أغشية الخلايا كما ويزداد مع ازدياد نمو الجريبات، ويتم التوسط في عمل الميلاتونين في المبيض والخلايا الحبيبية عبر مستقبلات الغشاء MT1, MT2 الخاصة به.

5-1- أهمية البحث:

انطلاقاً من دور الميلاتونين غير الواضح في فيزيولوجيا المبيض للإنسان وخاصة أن السائل الجريبي يحتوي على تراكيز عالية من الميلاتونين وأعلى بثلاثة أضعاف تقريباً من تراكيزها في الدم وبشكل رئيسي في الجريبات قبل عملية الإباضة.

ومن الدراسات التي تربط بين تراكيز الميلاتونين في السائل الجريبي وتراكيز البروجسترون والاستراديول وحتى الأوكسيتوسين وآلية عمله في المبيض، فإن البحث يسلط الضوء على العلاقة بين كمية الميلاتونين وجودة الخلية البويضية ورفع نسبة الحصول على نتاج الحمل الناجح في الإخصاب المساعد بالدرجة الأولى.

6-1- أهداف البحث:

يهدف البحث إلى:

1. عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي باستعمال البيركول.
2. عزل الحمض الريبي النووي (RNA) Ribonucleic Acid من الخلايا الحبيبية (GCs) Granulosa Cells المستخلصة واصطناع الدنا المتمم (cDNA) Complementary Deoxyribonucleic Acid لأجل الدراسة الجزيئية التي تهدف لقياس كمية التعبير الجيني لمستقبل الميلاتونين MT1
3. التحري عن تأثير الميلاتونين على جودة الخلية البويضية وعلى نتائج الحمل عند بعض النساء الخاضعات لتقانة الاخصاب المساعد.

7-1- مسوغات البحث:

على الرغم من التقدم الكبير في تقنيات IVF على مدى العقود القليلة الماضية فإن الغالبية العظمى من النساء لا يحققن الحمل بعد الدورة الأولى وتكون دورات IVF التالية أقل نجاحاً من معدل النجاح العام. يبدو من المهم جداً الكشف عن مدى تأثير الميلاتونين في جودة الخلية البويضية وحصول الحمل الناجح لأنها تشكل المفتاح الأهم في الوصول إلى توصيات بروتوكولات معالجة صحيحة قبل إجراء عمليات IVF وفشلها، وخاصة أن الميلاتونين وأهميته في كل خلايا الجسم وتحديداً في المبيض والسائل الجريبي أصبحت موضوع اهتمام الباحثين حول العالم، ومحاولة ربطه بحصول الحمل الناجح تغزو أغلب الأبحاث ولكن علاقته بجودة الخلية البويضية موضوع غير مطروق في سوربة بداية، ولم يتم وصول التأكيد عليه في الأبحاث العالمية بالرغم من أن معضلة جودة ورياءة الخلية البويضية تعد الأهم والأبرز في فشل هذه العمليات.

8-1- حدود البحث:

تمت هذه الدراسة بمراحلها الثلاث على 42 امرأة متزوجة سبب العقم عند الزوجين، هو العقم الذكري، أي أن الزوجة سليمة وبعمر أقل من 38 عام وكلهن خاضعات لتقانة IVF في مركز العقم وطفل الأنبوب في مشفى الشرق، من خلال عينات تم الحصول عليها في ساعات الصباح، حيث أن الميلاتونين يعمل في الجسم كميقاتية، ونحن نعلم أن تأثيره صباحاً ومساءً، ومن الممكن أن تتوسع الدراسة لتشمل عينات مأخوذة مساءً في حال إمكانية العزل المباشر ليلاً أو في حال تجميد العينات على - 80 مئوية، وذلك للمقارنة بين أقوى التأثيرين الصباحي والمساءلي للميلاتونين على المبيض والسائل الجريبي؛ ولكن دراستنا اقتصرنا على العينات الصباحية.

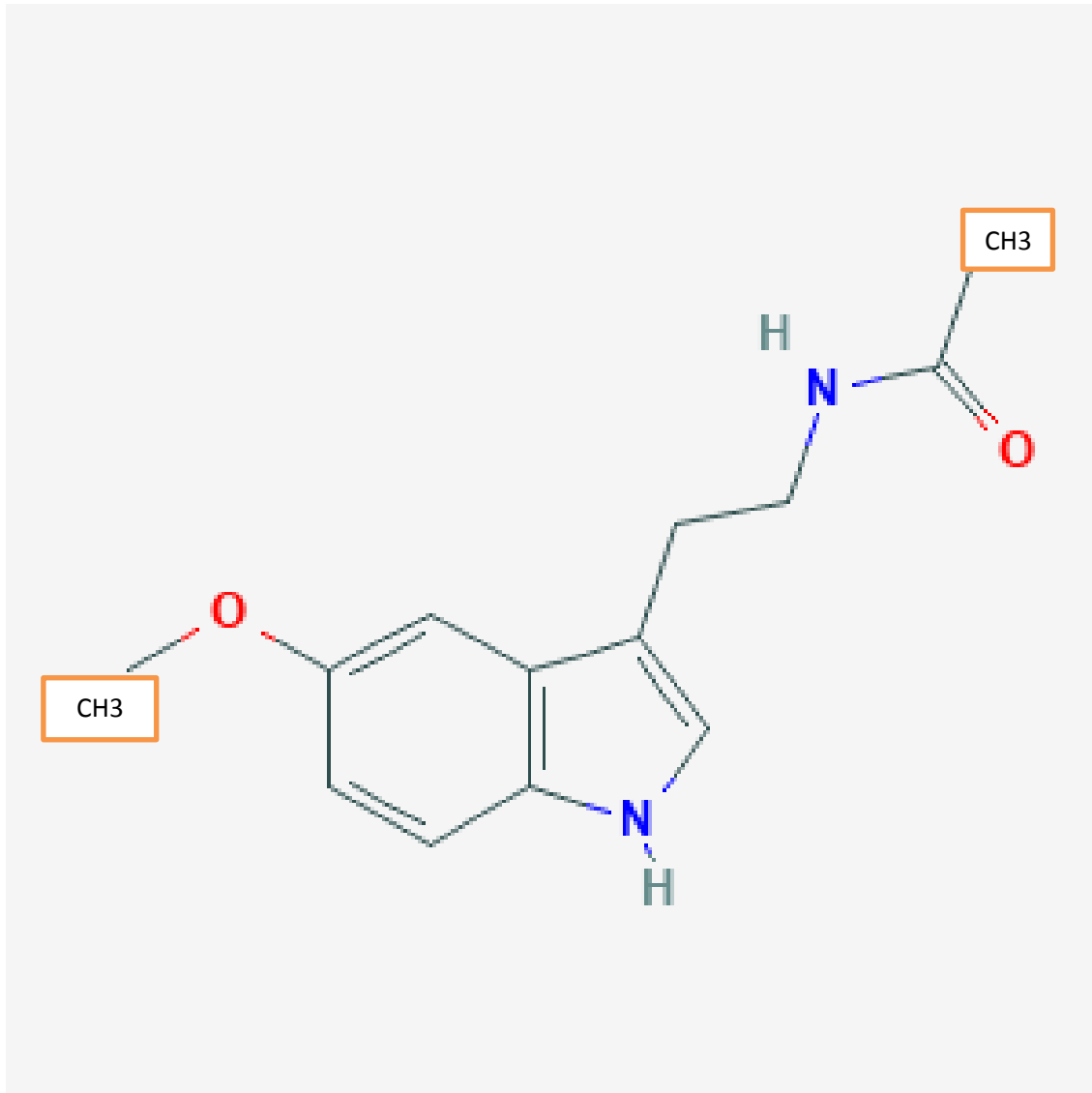
الفصل الثاني:
الدراسة المرجعية

Literature Review

الميلاتونين:

1-2- تعريف الميلاتونين:

الميلاتونين Melatonin هو (N _ أسيتيل -5- ميثوكسي تريتامين) (N-acetyl -5-methoxy tryptamine) الشكل رقم (1) يوضح الصيغة الكيميائية للميلاتونين ولأنه ينشأ من جزيء التريتامين فإنه يصنف كمركب أندولامين Indolamine في الغدة الصنوبرية Pineal Gland يتم تركيبه إنزيمياً من سيروتونين Serotonin (5- هيدروكسي تريتامين) (Xiao et al., 2019) (Cecon et al., 2018) (Najafi et al., 2020)



الشكل رقم (1) :الصيغة الكيميائية للميلاتونين

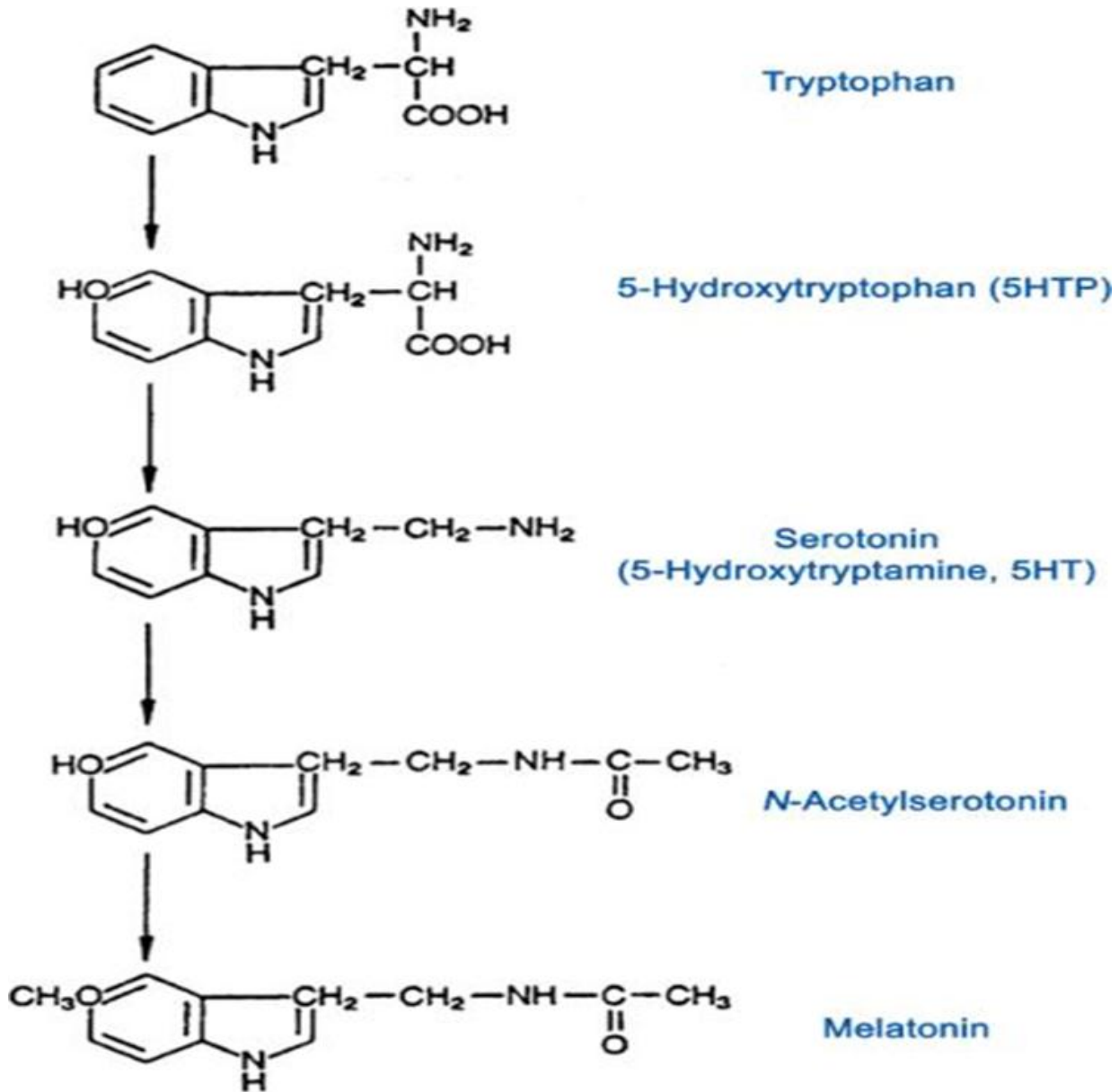
المصدر: (Najafi et al., 2020)

2-2- الغدة الصنوبرية وتركيب الميلاتونين:

تعد الغدة الصنوبرية الموقع الرئيسي لتكوين الميلاتونين، ومع ذلك فإن هناك العديد من النسيج الأخرى تفرز الميلاتونين مثل شبكية العين Retina (Mennenga et al., 1991)، الطحال Spleen والكبد Liver والكلية Kidney (Bubenik, 2002)، Gastrointestinal Tract (Sanchez-Hidalgo et al., 2009)، الخصى Testes (Tijmes et al., 1996)، والقلب Heart (Brzezinski et al., 1987)، Ovaries المبايض، بما في ذلك الخلايا الحبيبية وتلك الخلايا التي تشكل الركام البيضي التي تحيط بالخلاية البيضية (El-Raey et al., 2011)، كذلك الميلاتونين ناقل موجود بالدماغ يفرز خلال الساعات المظلمة بالليل.

الغدة الصنوبرية التي تفرز الميلاتونين هي غدة صماوية صغيرة تنظم الأعمال المهمة بالدماغ ومحيط الجسم ومتعلقة بالنظم اليوماوي، أي أنها لا تفرز خلال 24 ساعة إلا في وقت محدد (Tamura et al., 2012) (Ganguly et al., 2002) (Lampiao, 2013).

تأخذ الغدة الصنوبرية التريبتوفان من الدم، والذي يتحول تحت تأثير هيدوكسيلاز تريبتوفان Tryptophan hydroxylase إلى 5-hydroxy tryptophan والذي يتحول بدوره إلى سيروتونين، والذي يؤسثل بواسطة أريل ألكيل أمين N أستيل ترانسفيراز (AANAT) aryl alkyl amin N-acetyl transferase إلى N أسيتيل سيروتونين N-acetyl serotonin الذي يتحول إلى الميلاتونين بواسطة أسيتيل سيروتونين 5 ميتيل ترانسفيراز acetyl serotonin 5-methyl transferase؛ وتخضع تلك الأنزيمات المذكورة إلى سيطرة الجهازين العصبي والصماوي اللذان ينظمان وقت ومدة وكمية الميلاتونين المنتج (Fernando et al., 2018). كما في الشكل رقم (2):



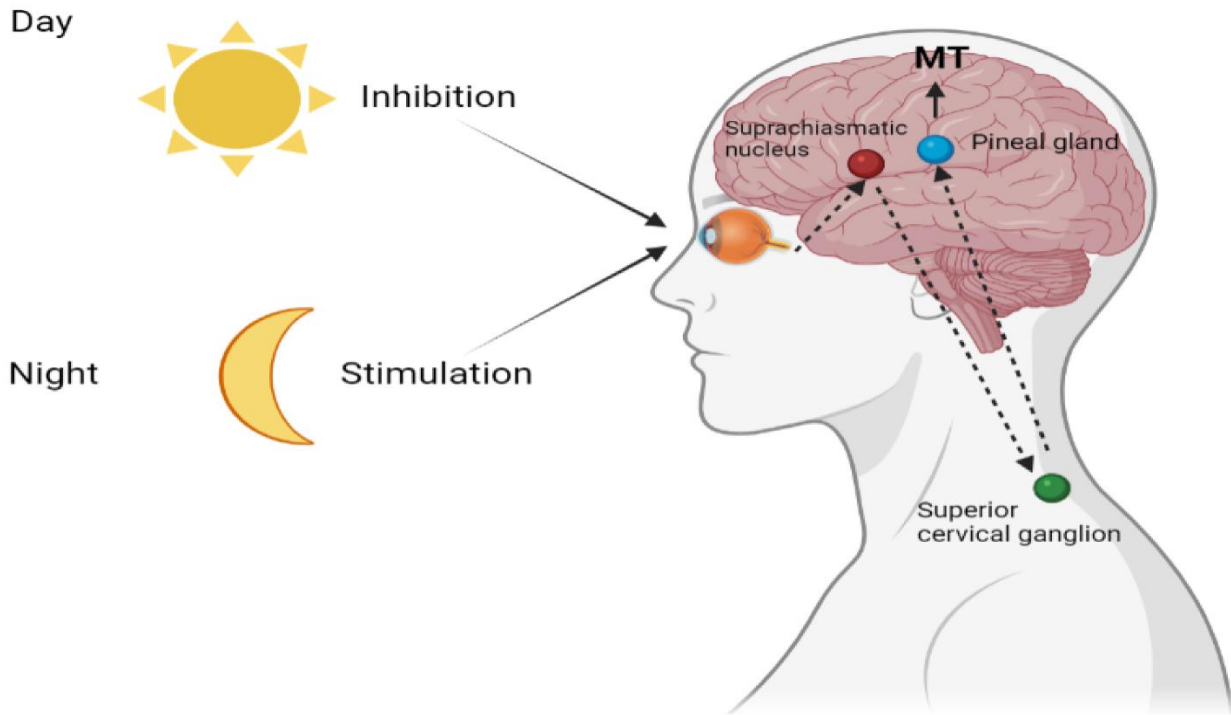
الشكل رقم (2) : المسار الحيوي لاصطناع الميلاتونين في الغدة الصنوبرية

المصدر: (Konturek et al., 2006)

2-3- أثر الضوء والظلام على إفراز الميلاتونين:

للحفاظ على جدول النوم المبكر على مدار 24 ساعة، تُحوّل الأجسام البشرية المعلومات المتعلقة بالوقت من اليوم إلى إنتاج الميلاتونين. تبدأ هذه العملية في شبكية العين. عندما تتعرض الشبكية للضوء، تنتقل إشارة من الشبكية إلى منطقة في الدماغ تُسمى النواة فوق التصالبية (SCN) Suprachiasmatic Nucleus، والتي تلعب دوراً في الشعور بالنعاس أو اليقظة التامة.

تُرسل SCN إشارات إلى أجزاء أخرى من الدماغ تُنظّم الهرمونات ودرجة حرارة الجسم. ثم تنتقل الإشارات من الدماغ عبر النخاع الشوكي، ثم تعود إلى الغدة الصنوبرية، وهي عضو صغير على شكل مخروط صنوبر في الدماغ، حيث يتم إنتاج الميلاتونين. خلال النهار، تمنع هذه الإشارات الغدة الصنوبرية من إنتاج الميلاتونين. ولكن عندما يحل الظلام، لا تُفعل هذه الإشارات، فتتمكن الغدة الصنوبرية من إنتاج الميلاتونين. بمعنى آخر، يمنع التعرض للضوء إفراز الميلاتونين، مما يُبقي البشر مستيقظين، بينما يؤدي قلة التعرض للضوء إلى إفرازه، مما يُحفز النوم عند الإنسان. الشكل رقم (3)



الشكل رقم (3): تحديد موقع الغدة الصنوبرية والنوى فوق التصالبية واستقبال الضوء

المصدر: (Kvetnoy et al., 2022)

في الغدة الصنوبرية Pineal Gland يتم التحكم في إنتاج الميلاتونين بواسطة الخلايا الصنوبرية من خلال إشارة يومية من النواة فوق التصالبية (Suprachiasmatic Nucleus (SCN) والتي ترتبط بالفترة الضوئية، يؤدي تنشيط الخلايا العصبية SCN بواسطة الضوء المحيط الذي تدركه شبكية العين إلى تثبيط إنتاج الميلاتونين.

يلعب الميلاتونين الصنوبري دوراً حاسماً في تنظيم الإيقاعات اليومية بالإضافة إلى التمثيل الغذائي والاستجابة المناعية والوظيفة الإنجابية وغيرها من العمليات الفيزيولوجية (Kvetnoy et al., 2022).

4-2- خصائص الميلاتونين:

يمتلك الميلاتونين العديد من الوظائف الفيزيولوجية منها:

- 1- الحفاظ على توازن الجسم وتعديل الإيقاع اليومي (Sun et al., 2002) (Tarocco et al., 2019).
- 2- التحكم بالمحور العصبي الصماوي (Sun et al., 2002) (Tarocco et al., 2019).
- 3- التأثير المضاد للأكسدة في مختلف الأعضاء (Sun et al., 2002) (Tarocco et al., 2019).
- 4- تنظيم الوظيفة الإنجابية (Sun et al., 2002) (Tarocco et al., 2019).
- 5- يعد مضاداً للالتهابات والأورام والشيخوخة (Sun et al., 2002) (Tarocco et al., 2019).
- 6- يعتبر أحد مضادات الأكسدة القوية ولديه القدرة على كنس ROS وأنواع النتروجين التفاعلي Reactive Nitrogen Species (RNS) عن طريق أداء مستقبلاته (Galano et al., 2011) (Tain & Hsu, 2024).
- 7- يتميز بأنه محب للدهون ومحب للماء بالتالي يستطيع أن يعبر أغشية الخلايا (Tamura et al., 2020).
- 8- الميلاتونين يحمي الجنين من الإجهاد التأكسدي الذي يسببه ROS, NOS، وهناك تباين في مستويات الميلاتونين بين الليل والنهار وهو يزود الـ SCN للجنين بمعلومات ضوئية ومظلمة، كما يعزز الاندول تركيب البروجسترون من خلال الجسم الأصفر ولاحقاً من خلال المشيمة وهذا ما يساعد في الحفاظ على الحمل (Sun et al., 2002) (Tarocco et al., 2019).
- 9- العلاج بالميلاتونين يعاكس زيادة مستويات ROS ويعالج خلل الانقسام المنصف في البويضات المتقدمة بالعمر مما يعدل نوعيتها كما يؤدي إلى إنقاص أذية الـ DNA والموت الخلوي. ويمكن فعله خلال الانقسام عبر تأثيره على مغازل الانقسام ومرحلة الاصطفاف السيء للكروموسومات أو بمرحلة التصاق النيببات الدقيقة والتي تتضافر لتشكّل شذوذ صبغي. ويضاف إلى ذلك من الدراسات السابقة أن الإفراز اليومي للميلاتونين له علاقة بالفصول (Yasuhiko Nakamura, 2003).
- 10- يتوافق الميلاتونين مع ارتفاع البروجسترون، والبروجسترون هو الهرمون الرئيس الذي ينظم اللوتنة ويحافظ على المراحل المبكرة من الحمل (Fang et al., 2019).
- 11- العلاج بالميلاتونين يؤدي إلى زيادة كبيرة في مستويات مستقبلات LH receptor mRNA دون تغيير التعبير عن جين مستقبل FSH (Fang et al., 2019).
- 12- كما أظهرت دراسات سابقة ركزت على مرضى متلازمة فرط تحفيز المبيض Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) أن هؤلاء المريضات لديهن ميلاتونين أعلى في السائل الجريبي وكذلك تعبير المستقبل MT2 وهو نوع من مستقبلات الميلاتونين أعلى في الخلايا

الحبيبية لذلك يمكن استخدام الميلاتونين في السائل الجريبي كمتنبئ فعال لحدوث OHSS كما أشارت له دراسة حديثة (Li, Fang, et al., 2019).

13- يتميز الميلاتونين بأنه يعبر المشيمة عند حصول الحمل ويساعد في تنظيم SCN للجنين، وفي حال غياب التأثير المتناغم اليومي للميلاتونين يحدث إجهاض ومشاكل عصبية ونفسية للأم؛ و SCN ترسل رسائل للغدة الصنوبرية تحرضها على إنتاج الميلاتونين، أي أنها منظم يومي موجود في الدماغ بداخل الوطاء وهو مسؤول عن تعاقب الليل والنهار ويسمى أيضا الساعة البيولوجية، تعد SCN مع افراز الميلاتونين من الغدة الصنوبرية مهمين للإخصاب والتكاثر (Reiter, Tamura, et al., 2014).

14- بشكل عام يؤثر الميلاتونين على فيزيولوجيا الخلايا بوجوده فيها، ويعطي تعبير جيني يؤثر على الجينات ويفيد في حماية الخلية الببيضية من التأثيرات الضارة وكذلك يحمي الجسم الأصفر ويحسن الإخصاب لأنه يحسن نوعية البويضة ويحمي البويضة من ROS الزائد كما تم ذكره (Reiter, Tan, et al., 2014) (Galano et al., 2013).

15- يحفز الميلاتونين LH و FSH وبذلك يكون مسؤولاً عن مرحلة الإباضة والتعشيش وبشكل عام، فإن نقص الميلاتونين يؤثر بإحداث:

- داء مبيض متعدد الكيسات.
- قصور مبيض مبكر وبطانة الرحم المهاجرة Endometriosis.
- السرطان.
- الأمراض المناعية الذاتية مثل السكري والزهايمر.

16- والأهم من ذلك أن إعطاء الميلاتونين والعلاج به آمن جداً (Tamura et al., 2009) (Andersen et al., 2016).

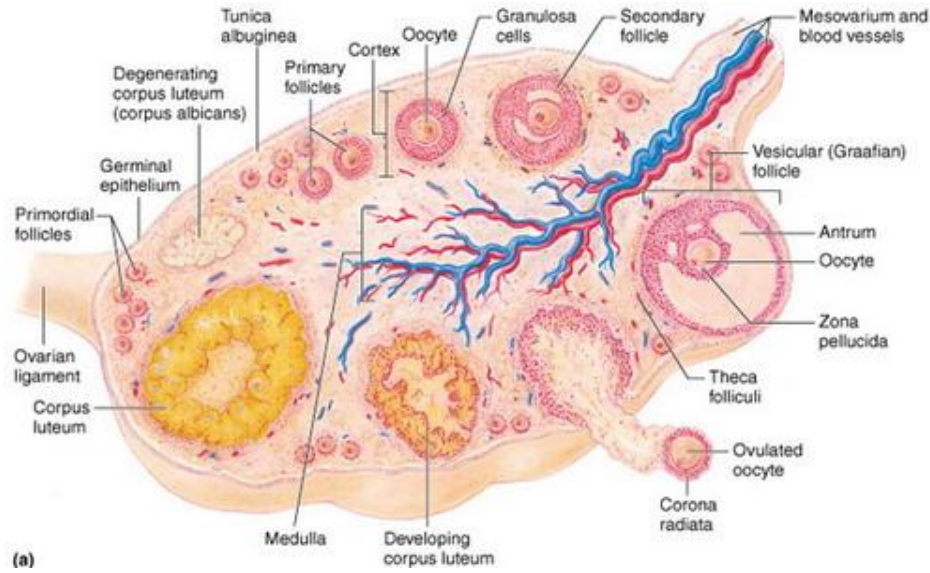
17- وبالخلاصة فإن الميلاتونين مسؤول عن تنظيم الإيقاعات اليومية، وتحسين الجهاز المناعي والمزاج، وتقليل الإجهاد التأكسدي (Calvo et al., 2013).

5-2- الميلاتونين والمبيض:

تقع المبايض على جانبي جدار الحوض الجانبي، وتتصل بالرحم عبر قناتي فالوب، ويعد الجريب المبيضي الوحدة الوظيفية للمبيض، ويتكون من خلية بيضية محاطة بطبقات من الخلايا الحبيبية، ومن الخلايا القريبية Theca Cells والغشاء القاعدي Basement Membrane (Magalhaes & Atala, 2019).

عند الولادة تحتوي قشرة المبيض على مجموعة من الجريبات الابتدائية Primordial Follicles التي تشكلت خلال الحياة الجنينية، والتي تحدد مدة حياة إنجابية محدودة. وتتكون الجريبات الابتدائية من بويضة غير ناضجة محاطة بطبقة واحدة من الخلايا الحبيبية تحت الغشاء القاعدي. تنضج البويضات وتتكاثر الخلايا الحبيبية بين الجريبات العديدة التي تتطور وتصبح معظمها رخوة (Magalhaes & Atala, 2019).

بين سن البلوغ وانقطاع الطمث، تحفز الإشارات الهرمونية تلك الجريبات، ضمن عملية شديدة التنظيم تسمى تكوين الجريبات Follicular Genesis، خلال عملية تكون الجريبات تتكاثر الخلايا الحبيبية وتتمايز إلى عدة طبقات حول البويضة، كما تتمايز الخلايا القارية إلى خلايا قارية داخلية وخلايا قارية خارجية، كما يتشكل جوف جريبي مملوء بسائل جريبي، كما تتشكل وصلات فجوية Gap Junctions بين الخلايا، مما يسهل التواصل بين الخلايا الحبيبية والبويضة وهو أمر ضروري لنضج وإطلاق البويضة القادرة على الإخصاب في كل دورة تكاثرية الشكل رقم (4) (Magalhaes & Atala, 2019).



الشكل رقم (4) : شكل لجريبات المبيض

المصدر: (Magalhaes & Atala, 2019)

مقطع للمبيض في مراحل مختلفة من الدورة الشهرية يوضح الأجزاء المكونة (باتجاه عقارب الساعة من الجريب الابتدائي والجريب الأولي والثانوي والناضج). كما يوضح الشكل تمايز الجريب المنفجر إلى الجسم الأصفر، والتي تتحلل بعد أسبوعين إلى الجسم الأبيض في حالة عدم وجود حمل.

يقوم المبيض بقبط الميلاتونين من الدم إضافة إلى أنه يصنع الميلاتونين في الخلايا الحبيبية (Tong et al., 2017) ولذلك نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي يبقى أعلى من نسبته بالدم بثلاث أضعاف (MianqunZhang, January 2020).

تُعد عملية الشيخوخة أو التقدم بالعمر من الظواهر الحيوية الطبيعية التي تؤثر على وظيفة الجهاز التناسلي في النساء، حيث تتراجع القدرة الإنجابية بشكل تدريجي مع تقدم العمر. يُعزى هذا التراجع إلى انخفاض عدد وجودة البويضات وإلى تدهور وظيفة الجريبات، وإلى تغيرات هرمونية متعددة، وإلى زيادة نسبة الإجهاد التأكسدي في نسيج المبيض. يرتبط ذلك بتفاقم ظاهرة الأكسدة، والتي تؤثر بشكل سلبي على الخلايا الحبيبية، وتؤدي إلى تلف الأوعية الدموية، وتقليل استجابة المبايض للعوامل المنشطة، مما يحد من قدرة المبيض على إنتاج بويضات ناضجة عالية الجودة (Guo et al., 2021).

يُعرف بأن التوازن بين إنتاج الـ ROS ومضادات الأكسدة في الجسم يلعب دوراً رئيساً في الحفاظ على الصحة الوظيفية للمبيض. مع التقدم في العمر، حيث يزداد تراكم الـ ROS، مما يساهم في إحداث تلف الخلايا، وتقليل احتمالية الإخصاب، وزيادة معدلات الإجهاض، وظهور اضطرابات مثل تكيس المبايض (PCOS) من هنا، برزت الحاجة لتطوير استراتيجيات علاجية تدعم الوظيفة التناسلية للنساء المتقدّمات في العمر، وتخفف من آثار التقدم في العمر على خصوبتهن (Guo et al., 2021).

في العديد من الدراسات المرجعية، ظهرت أهمية الهرمونات والأدوية المضادة للأكسدة، خاصة الميلاتونين، بصفته أحد مضادات الأكسدة القوية والطبيعية (Guo et al., 2021)، ليس فقط كمضاد للأكسدة المباشر إنما يقوم بتنشيط أنظمة مضادات الأكسدة الذاتية داخل الخلايا. كما ثبت أنه يساهم في سلسلة عمليات التقدم في السن على مستوى الخلايا، لاسيما عن طريق تنظيم التعبير الجيني للمورثات المرتبطة بالإجهاد التأكسدي مثل جينات SIRT1 و SIRT3، وتقليل تلف الحمض النووي، وتحسين وظيفة الميتوكوندريا (Reiter et al., 2023).

تشير الدراسات الحديثة إلى أن ضعف وظيفة المبيض ونقص إفراز الميلاتونين يرتبطان ارتباطاً وثيقاً بتدهور صحة المبيض والعجز التناسلي مع التقدم في العمر. كما أن اختلال التوازن الهرموني المرتبط بالتقدم في العمر يساهم في اضطرابات وظيفية قد تؤدي إلى حالات مرضية أكثر تعقيداً، مثل تكيس المبايض، والتي تتطلب تدخلات علاجية مناسبة (Guo et al., 2021).

إضافة إلى ذلك، فإن الدور الذي يلعبه تنظيم النظم الحيوية اليومية (الساعة البيولوجية) في صحة المبايض هام وعلى درجة كبيرة من الخطورة فاختلال الإيقاعات الحيوية قد يساهم في تعطيل وظائف الغدد الصماء، ويؤدي إلى اضطرابات هرمونية، مما يؤثر سلباً على الإخصاب والحمل. ومن هنا، فإن مراجعة ودراسة دور الميلاتونين كعلاج داعم لعلاج أمراض الشيخوخة خاصة من ناحية التكاثر والإخصاب توفر أملاً في استدامة القدرات الإنجابية لدى النساء مع التقدم في العمر (Guo et al., (Reiter et al., 2023 (2021).

6-2- الميلاتونين والسائل الجريبي:

السائل الجريبي هو سائل بيولوجي معقد يحيط بالبويضة والنامية وخلاياها الحبيبية الركامية، وهو عبارة عن ترشيح فائق للمصل. يُنتج في الجريبات الغارية النامية، ويحتوي على جزيئات متنوعة، مثل البروتينات، والهرمونات الستيرويدية، والسكريات المتعددة، والمستقلبات، وROS، ومضادات الأكسدة. يتمثل الدور الرئيسي لهذه الجزيئات في تنظيم نضج البويضة والجريب وحماية الخلايا الحبيبية من التلف الفيزيائي أو التأكسدي، كما أنها مسؤولة عن التواصل بين الخلايا الحبيبية والبويضة (Chen et al., 2023).

يحتوي السائل الجريبي على عدد كبير من الهرمونات بما في ذلك الهرمون الملوتن والهرمون المنبه للجريب، مثل البرولاكتين والأوكسيتوسين والفازوبريسين، والإستروجينات والبروجسترونات، بالإضافة إلى عدد من المواد الأخرى مثل البروتينات والإنزيمات والسكريات المتعددة ومجموعة متنوعة من العوامل المحفزة والمثبطة. السبب الدقيق لإطلاق البويضة وقت الإباضة غير مؤكد، ولكنه على الأرجح يتعلق بالهضم الإنزيمي لجدار الجريب، بالإضافة إلى زيادة مستويات البروستاجلاندين وتأثير الأوكسيتوسين، هناك علاقة تغذية راجعة إيجابية متبادلة بين البروستاجلاندين والأوكسيتوسين (Chen et al., 2023).

فيما يلي نظرة أكثر تفصيلاً عن دور السائل الجريبي أثناء الإباضة وفق ما يلي:

- (1) **نمو البويضة:** يوفر السائل الجريبي البيئة اللازمة لنمو البويضة ونضجها، مما يُهيئها للإباضة.
- (2) **التواصل:** يعمل كوسيط للتواصل بين البويضة والخلايا الأخرى داخل الجريب، مما يضمن النمو السليم والإشارات.
- (3) **التوازن الهرموني:** يحتوي السائل الجريبي على هرمونات مختلفة مثل الهرمون المنبه للجريب، والأستروجين، والبروجسترون، وهي هرمونات ضرورية لتنظيم الدورة الشهرية والإباضة (Chen et al., 2023).

يتكون السائل الجريبي جزئياً من إفرازات من الجريب، وجزئياً من نضحات من البلازما. يعكس تركيبه تغيرات في العمليات الإفرازية للطبقة الحبيبية والبطانة الداخلية، وتغيرات في مكونات البلازما نتيجة لعمليات فسيولوجية أو مرضية. يدل وجود السائل الجريبي في العديد من الأنواع على أهميته المحتملة في فيزيولوجيا المبيض، بما في ذلك تكوين الستيروئيدات، ونمو الجريب والإباضة، ونضج البويضة ونقلها إلى قناة فالوب. يمكن جمع السائل بسهولة، خاصةً مع تضخم الجريب، وقد كان هناك اهتمام مطول بتركيبه ووظائفه (Macklon & Fauser, 1998).

نوقش مصدر السائل في جريبات غراف على نطاق واسع في المناقشات المبكرة، حيث أكد بعض الخبراء أنه يُنتج داخل الجريب، بينما اعتقد آخرون أنه رشح من البلازما. هذا الجدل زائف الآن، إذ يكاد يكون من المؤكد أن مكونات السائل المختلفة تنشأ من كلا المصدرين. فعلى سبيل المثال، توجد بروتينات البلازما في السائل الجريبي، ولكن من غير المرجح أن يتم تصنيعها في الموقع. من ناحية أخرى، تعكس التركيزات العالية من الستيروئيدات وعديدات السكاريد المخاطية، على نحو شبه مؤكد، النشاط التركيبي للخلايا الحبيبية (Zhang et al., 2025)

يكمن النهج الرئيسي لمكافحة العقم في تقنيات الإنجاب المساعد، بهدف تعزيز معدل نجاحها، وهو هدف مشترك بين الأطباء والمرضى على حد سواء. وتُعد جودة البويضات، التي تنمو داخل البيئة الدقيقة المعقدة للجريبات، عاملاً حاسماً في فعالية تقنيات IVF. وهنا، يلعب السائل الجريبي دوراً محورياً في جودة البويضات. ويبرز الإجهاد التأكسدي كعامل محوري، إذ يؤثر على وظائف الخلايا ويحفز شيخوخة الخلايا وموت الخلايا المبرمج (Macklon & Fauser, 2001).

يبدأ نمو الجريبات المبيضية أثناء وجود الجنين الأنثوي في الرحم. خلال الأسبوع الخامس من الحمل، يحتوي مبيض الأنثى على نحو 500 إلى 1300 خلية جنسية بدئية (منسليات بيضية). تخضع تلك الخلايا لانقسامات فتيلية Metosis، وبحلول الأسبوع العشرين من الحمل، يكون لدى الجنين الأنثوي ما يقرب من 6 إلى 7 ملايين من بذور البويضات ومن ثم تبدأ عملية الرئق والتموت الخلوي (Hirshfield, 1997).

تولد الأنثى ومعها من مليون إلى مليوني جريب ابتدائي يحتوي على بويضة في مرحلة الطور التحضيري الأول للانقسام المنصف ومحاطة بطبقة واحدة من الخلايا الحبيبية المغذية. وبحلول الوقت الذي تصل فيه إلى سن البلوغ، يتبقى ما يقرب من 400000 إلى 500000 جريب ابتدائي. بعد بدء الحيض، يُفقد حوالي 1000 جريب شهرياً. بعد سن 35 عاماً، يزداد معدل فقدان الجريبات (Drummond, 2006) (Sun et al., 2017).

يحتوي السائل الجريبي على خلايا الركam البيضي والخلايا الحبيبية الجدارية، وفي الجوف الغاري (الجوف الجريبي) Antral Follicle تحيط خلايا الركam البيضي بالخلية البيضية (البويضة) وتصنع الخلايا الحبيبية الجدارية جدار الجريب. لذلك توجد ثلاثة أنواع رئيسية من الخلايا في الجريب بما في ذلك البويضة والخلايا الحبيبية والخلايا القرابية (Aghadavod et al., 2015).

يُلاحظ أن هرمون الميلاتونين، الذي يُكثر من إفرازه في الظلام، والمعروف أكثر بدوره في تنظيم دورات النوم واليقظة، قد يكون له وظيفة إضافية تتجاوز ذلك، إذ تشير بعض الدلائل إلى وجود ارتباط بين مستويات الميلاتونين في الجسم ووظائف الجهاز التناسلي، خاصة في المبيض والبويضات. فالميلاتونين يتواجد بكميات

عالية في السائل الجريبي، مما يعزز فرضية أن له تأثيراً مباشراً على وظائف المبايض، بعيداً عن وظائفه التقليدية في تنظيم الإيقاع اليومي (Woo et al., 2001).

ترتفع مستويات الميلاتونين في السائل الجريبي تدريجياً مع تطور الجريب، وفي جريب غراف تتجاوز تراكيز الميلاتونين تلك الموجودة بالدم بمقدار 3 أضعاف وبالتالي من المفترض أن يساعد الميلاتونين في الجريبات على نمو البويضة ويحميها من ضرر الـ ROS وقد يساعد الميلاتونين في تنامي الجسم الأصفر وانتاج البروجيسترول (Reiter, Tamura, et al., 2014).

الميلاتونين متوزع بشكل متجانس في الجريب والخلايا الحبيبية والخلايا المحيطة بالجريب والجسم الأصفر وله مستقبلات خاصة متطابقة تماماً بين الجرذ والانسان، ويؤثر الميلاتونين على الخلايا الحبيبية عن طريق زيادة البروجيسترول والاستروجين.

وأثبتت الدراسات أن تعزيز مستويات مضادات الأكسدة داخل الجريبات قد يؤدي إلى تحسين جودة البويضة، وتقليل التلف الناتج عن الـ ROS، مما يساهم في زيادة معدلات الاخصاب والنجاح في عمليات IVF (Tamura et al., 2012).

2-7- مصادر الميلاتونين في السائل الجريبي:

1. الدم Blood.
2. الخلايا البدينة النخاعية Medullary Mast Cells.
3. الخلايا الحبيبية.
4. خلايا الركام البيضي.
5. البويضة oocyte.

ينتج الميلاتونين من قبل خلايا الركام البيضي والخلايا البشرية الحبيبية، ومن ثم ينتشر في السائل الجريبي (Tong et al., 2017) (Reiter, Tamura, et al., 2014).

السائل الجريبي يحمي ويغذي البويضة، لذلك فإن محتوى السائل والعمليات الاستقلابية والهرمونات فيه حتماً تؤثر على البويضة. ولجودة Quality وعدد Quantity الخلايا الحبيبية علاقة مباشرة بجودة الخلية الببيضية، ويتم التعبير الجيني في الخلايا الحبيبية وتكون مستويات تعبيرها مختلفة في الظروف الفيزيولوجية المختلفة؛ وتعتمد جودة الخلية الببيضية، وبالتالي تحسين معدل الاخصاب وإعطاء محصول جيد، على النضج

النهائي للجريب (Aghadavod et al., 2015). لذلك يمكن من خلال تقييم التعبير الجيني في الخلايا الحبيبية التنبؤ بصحة الجريب، كما يعطي معلومات اضافية ضرورية لفهم الاخصاب الناجح للبويضات (Aghadavod et al., 2015).

تعيش البويضة (الخلية الببيضية) Oocyte في بيئة محمية ومغذية بواسطة السائل الجريبي المحيط بها وفيها تراكيز عالية من الميلاتونين (Tong et al., 2017) (Reiter, Tamura, et al., 2014) (Reiter et al., 2009). ولا تزال معضلة نوعية البويضات الرديئة تسبب العقم بالنسبة لمعظم النساء على الرغم من التقدم الكبير في طرق IVF (Tamura, Nakamura, et al., 2008)

نقص مخزون المبيض من حيث عدد البويضات يحدث نتيجة لمشكلتين:

- زيادة الاثار السامة بالعوامل المؤكسدة في البويضة والذي سببه زيادة ROS
- نقص مضادات الأكسدة (Muller et al., 2007)

ومن المشعرات التي تعتبر مهمة لمعرفة مخزون المبيض الهرمون المنبه للجريب FSH مع الاستراديول والهرمون المضاد لمولر Anti Mullerian Hormone (AMH) (Smeenk et al., 2007) (Abdalla & Thum, 2004).

ينتج ROS في المتقدرات (الميتاكوندريا) كمنتج ثانوي للعمليات الاستقلابية وتعد الميتاكوندريا وهي مهمة للعمليات الاستقلابية في كل الخلايا (Reiter, Tamura, et al., 2014) وبسبب زيادة ROS وعدم قدرة القابطات على إزالة الزائد منه سوف يحصل ما يلي:

- أذية الـ DNA في البويضة.
- توقف الدارة الخلوية.
- الاستماتة الخلوية (Wang et al., 2017).

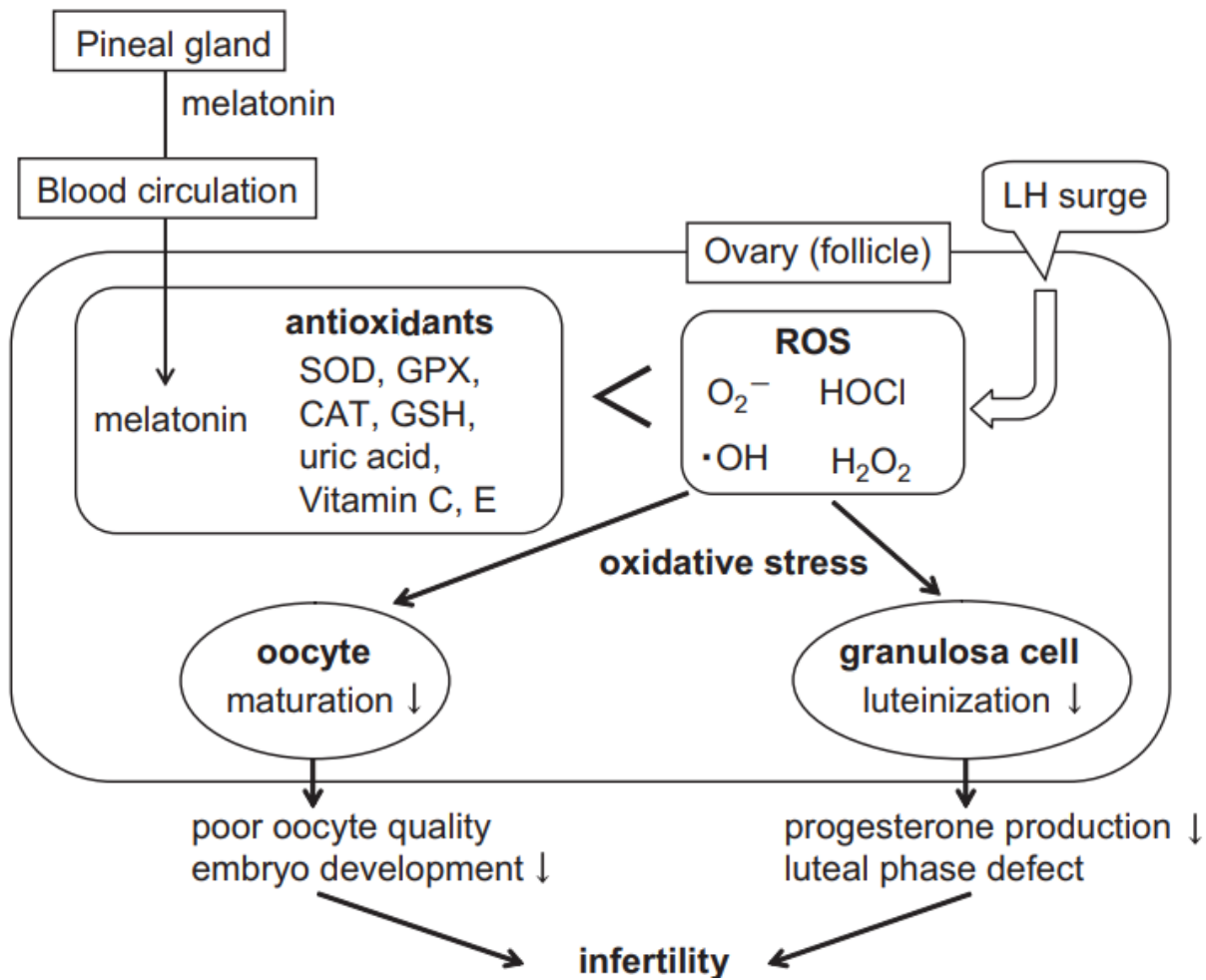
8-2- الميلاتونين والإجهاد التأكسدي:

يتم إنتاج ROS في الجريب أثناء عملية الإباضة Ovulation (Reiter et al., 2009) لأنها تلعب دوراً فيزيولوجياً في عملية الإباضة وتمزق الجريب ومع ذلك فإن كمية زائدة منه تسبب الإجهاد التأكسدي Oxidative Stress وقد تتلف البويضة والخلايا الحبيبية وخلايا الركام الببيضي الشكل رقم (5).

من بين المكونات العديدة في السائل الجريبي، تُعتبر المكونات المرتبطة بالإجهاد التأكسدي من أهم العوامل التي تؤثر سلباً على نتائج تقنيات IVF. أشارت الأبحاث إلى أن متلازمة تكيس المبايض ترتبط

بارتفاع مؤشرات الإجهاد التأكسدي في كل من المصل والسائل الجريبي. علاوة على ذلك، تُظهر المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي في السائل الجريبي ارتباطاً أعلى بجودة الجنين مقارنةً بمؤشرات المصل، مما يوفر تنبؤات أكثر دقة لجودة الجنين (Chen et al., 2023).

أظهرت الدراسات أن ROS تسرع شيخوخة البويضة وتدهور جودتها (Tamura et al., 2012) وأن الميلاتونين قابط الـ ROS (Tong et al., 2017) (Reiter, Tamura, et al., 2014) ويحمي البويضة من الإجهاد التأكسدي مما يحسن جودتها (Reiter, Tamura, et al., 2014) ويحسن معدل الإخصاب (Reiter et al., 2009).



الشكل رقم (5) : التوازن بين أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) ومضادات الأكسدة في الجريب

المصدر: (Tamura et al., 2013)

تنتج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) داخل الجريب، وخاصةً أثناء عملية الإباضة التي تُحفّزها زيادة الهرمون الملوتن (LH). تحتوي الجريبات على إنزيمات مضادة للأكسدة، مثل سوپر أوكسيد ديسميوتاز (SOD)، وغلوتاثيون بيروكسيداز (GPx)، وكاتالاز، ومضادات أكسدة غير إنزيمية، مثل فيتامين E وفيتامين C، والغلوتاثيون، وحمض اليوريك، والألبومين.

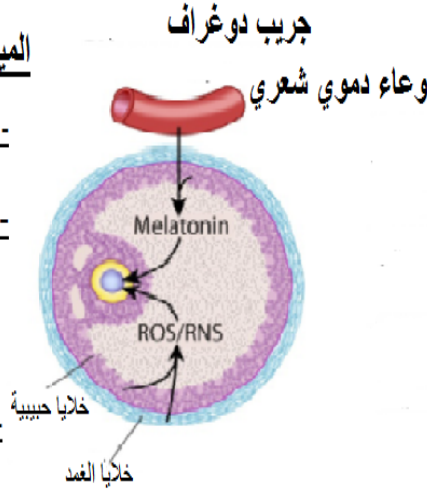
يُعد الميلاتونين، الذي تفرزه الغدة الصنوبرية، والذي يُمتص في السائل الجريبي من الدم، أحد مضادات الأكسدة في الجريب. قد تُساهم الكميات الزائدة من ROS في الإجهاد التأكسدي للخلايا البويضية والحبيبية. قد يكون التوازن بين ROS ومضادات الأكسدة داخل الجريب أمراً بالغ الأهمية لنضج البويضة وتحول الخلايا الحبيبية إلى اللون الأصفر (Luteinization) (Tamura et al., 2013).

أي يلعب التوليد الفيزيولوجي لـ ROS دوراً حاسماً في العديد من عمليات التنامي، بما في ذلك نضوج البويضة (Shkolnik et al., 2011)، وانغراس الجنين (Guerin et al., 2001)، وتمايز المشيمة (Myatt, 2010)، وتنامي الجنين (Thompson & Al-Hasan, 2012). ينتج ROS في الجريب بشكل طبيعي خلال عملية الإباضة ونقص تحديداً من (0-14) يوم الشكل رقم (6)، حيث يكون دورها في الإباضة مهم وصولاً إلى تمزق الجريب، وفي حال زاد عن الحد المعين يسرع من تقدم عمر البويضة ويؤدي إلى تدهور جودتها وبالتالي يقلل معدل الإخصاب (Goud et al., 2008).

يعمل الميلاتونين بطرق متنوعة لتخفيض الإجهاد التأكسدي، كما أنه كاسح قوي ومباشر لـ ROS والجدير بالذكر بأن الـ ROS هي جزيئات تحتوي على إلكترون واحد أو أكثر غير متزاوج في مداراتها الذرية أو الجزيئية (Goud et al., 2008). يمتلك الميلاتونين القدرة على إخماد كل من ROS و RNS (Tamura et al., 2009).

الميلاتونين والبويضة

- من الدم أو من السائل الجريبي
- تنظيف ROS/RNS
- زيادة أنزيمات مضاد الأكسدة
- انخفاض ضرر دنا وضرر الليبيد
- تحسين جودة البويضة
- زيادة هرمون محفز للنضج
- حماية البويضة أثناء إياضتها
- تحسين معدل الإخصاب



الميلاتونين والسائل الجريبي

- من الدم أو الخلايا الحبيبية
- تركيزها في السائل الجريبي أعلى من تركيزها في الدم
- جريب أكبر/ ميلاتونين أعلى
- انخفاض ضرر دنا وضرر الليبيد
- تنظيف ROS/RNS
- تحسن مستويات البروجيستيرون
- تحسين اللونة بعد الاباضة
- انخفاض رتق الجريبات

الميلاتونين والجنين

- من الدم (بغير المشيمة)
- تنظيف ROS/RNS
- زيادة أنزيمات مضادة للأكسدة
- تقليل سمية السيبتوكين
- الحد من الضرر الناجم من المواد السامة
- خفض تأخر النمو داخل الرحم
- تنسيق تقلصات عضل الرحم عند الولادة



الميلاتونين والمشيمة

- ينظف ROS/RNS
- يرفع مضادات الأكسدة
- حماية من نقص التروية
- خفض بيروكسيدات الدهون
- تقليل من شدة تسمم الحمل
- خفض تلف بطانة الأوعية الدموية
- الحفاظ على مضادات الأكسدة الأخرى
- الحد من تقليل الأنزيمات المضادة للأكسدة
- الحد من احتمالية الإصابة بتشنج الحمل

الشكل رقم (6): الوظائف المقترحة للميلاتونين في جريب غراف وأثناء الحمل

المصدر: (Reiter et al., 2009)

تؤدي زيادة ROS في السائل الجريبي إلى تدهور نوعية البويضة، كما يؤثر على انقسامها بعد الإلقاح، وأيضاً يخرب الخلايا الحبيبية فيحدث أذية تضر بالجسم الأصفر (Taketani et al., 2011).

وتظهر مستويات الأكسجين تنسيقاً دقيقاً طوال فترة الحمل وفقاً للمتطلبات المحددة للجنين التام في المراحل المبكرة، يتم الحفاظ على الأكسجين عند مستويات أقل، وخاصة حتى الأسبوع الثاني عشر بعد الحمل تعمل مستويات الأكسجين المنخفضة عمداً على تحفيز تكوين الأوعية الدموية، مما يعزز تكوين الأوعية الدموية الجديدة، وهي عملية حيوية لدعم النمو المبكر (Diniz et al., 2023).

حوالي الأسبوع السادس عشر من الحمل، يحدث تحول كبير، حيث تزداد مستويات الأكسجين داخل الرحم بشكل كبير، ثم تظل مستقرة حتى الولادة. حتى في هذه البيئة المنظمة بعناية، يخضع جزء صغير من الأكسجين المطلوب لعملية التمثيل الغذائي التأكسدي لانخفاض غير كامل، مما يؤدي إلى ظهور ROS (Diniz et al., 2023). حتى عند استخراج البويضات للعمل بالإلقاح الصناعي قد تتعرض البويضة لزيادة الـ ROS عن طريق التجميد (Chao et al., 2005).

يزداد ROS في الجريب نتيجة:

- ✓ التهابات.
- ✓ معالجات كيميائية.
- ✓ أشعة.
- ✓ فرط الإباضة بسبب معالجة العقم للمرضى (Tamura et al., 2012).

هذه الظروف يمكن معاكستها بما تحويه الخلية البيضية (البويضة) من مضادات أكسدة أو دفاعات حيوية أهمها الميلاتونين Melatonin، كونه مضاد أكسدة واسع الطيف (Manchester et al., 2015)، حيث يؤثر على كثير من عوامل الأكسدة داخل الجريب، ولاقط لـ ROS والذي يمكن أن نعه مؤثر مباشر على نوعية البويضة ومتنوع الوظائف، وله تأثيرات على فعاليات الخصوبة، حيث يُفعل الأماكن المستقبلية الموجودة على المحور الإخصابي من الوطاء للنخامي حتى المبيض Hypothalamic -Pituitary- Gonadal Axis (Malpoux et al., 2001) (Manchester et al., 2015).

وبالتالي فإن ضعف جودة البويضة تعد مشكلة خطيرة للعقم عند النساء، وقد يكون الإجهاد التأكسدي الناتج من ROS أثناء الإباضة داخل الجريب سبباً في ضعف جودة البويضة. تسرع ROS عملية الموت الخلوي المبرمج وتسبب تدهوراً في دهون غشاء الخلية كما تدمر الـ DNA، وإن التوازن بين ROS وقدرة مضادات الأكسدة يساعد على التخلص من الفضلات خلال عملية نضج البويضة وحتى الإخصاب، وتعد الأدوية التي تحمي البويضة والخلايا المغذية المحيطة بها من التلف ذات أهمية بالغة، ومن تلك الأدوية وأهمها هي الميلاتونين المستخدم في علم الأجنة (Rai & Ghosh, 2021).

تراكيز الميلاتونين بالسائل الجريبي تتوافق مع عدد ونوعية البويضة، وهي مؤشرات مهمة لتحسين نتائج الإخصاب (Tong et al., 2017)، والمهم فيها هو نوعية البويضة. لذلك التوازن بين إنتاج ROS والنقاطه يسمى الاستتباب الداخلي وهو مهم للغاية (MianqunZhang, January 2020)، حيث يعرف الإجهاد التأكسدي أنه اختلال التوازن بين إنتاج وإزالة ROS الزائدة (Ghorbaninejad et al., 2020).

إن وفرة الميلاتونين تتناقص مع التقدم بالعمر في الفئران، كما أن نقصه بالسائل الجريبي مرتبط مع عدم توازن الصبغيات عند التقدم بالعمر (MianqunZhang, January 2020). تركيز الميلاتونين في السائل الجريبي أعلى من مستوياته في الدم (Mojaverrostami et al., 2019) (Reiter et al., 2023).

وبحصول ما ذكرنا أظهرت الدراسات أن السائل الجريبي يحتوي على مستويات عالية من الميلاتونين، ويزداد تركيزه مع نمو الجريبات، مما يشير إلى تأثير محتمل على المبيض والوظيفة التناسلية لدى الثدييات. وبصفته مزيلاً قوياً للـ ROS، يضمن الميلاتونين تكاثر الخلايا الحبيبية والنمو والنضج الطبيعي للبويضات، مما يثبط شيخوخة المبيض بشكل فعال (Reiter et al., 2023).

في دراسات نضج البويضات البشرية في المختبر، تبين أن الميلاتونين يُعزز نمو البويضة، مما يؤدي إلى تكوين المزيد من الكيسات الأريمية، وانخفاض ملحوظ في معدل اختلال الصيغة الصبغية، وتشير الأبحاث إلى أن الميلاتونين قد يُحسن حالة الإجهاد التأكسدي للبويضات والأجنة المزروعة في المختبر أثناء عمليات IVF، وذلك بفضل قدراته المضادة للأكسدة (Chen et al., 2023)، مما يُعزز في النهاية كفاءة نمو البويضة والأجنة، ويُحسن نتائج العلاج السريري. ومع ذلك، لا تزال آلية عمله الدقيقة غير واضحة. وقد برزت مخاوف بشأن الآثار الجانبية المحتملة لتناول الميلاتونين على المدى الطويل، نظراً لتأثيراته الواسعة على استقلاب الكائن الحي وأنشطته الفيزيولوجية (Chen et al., 2023).

9-2- الميلاتونين والحمل:

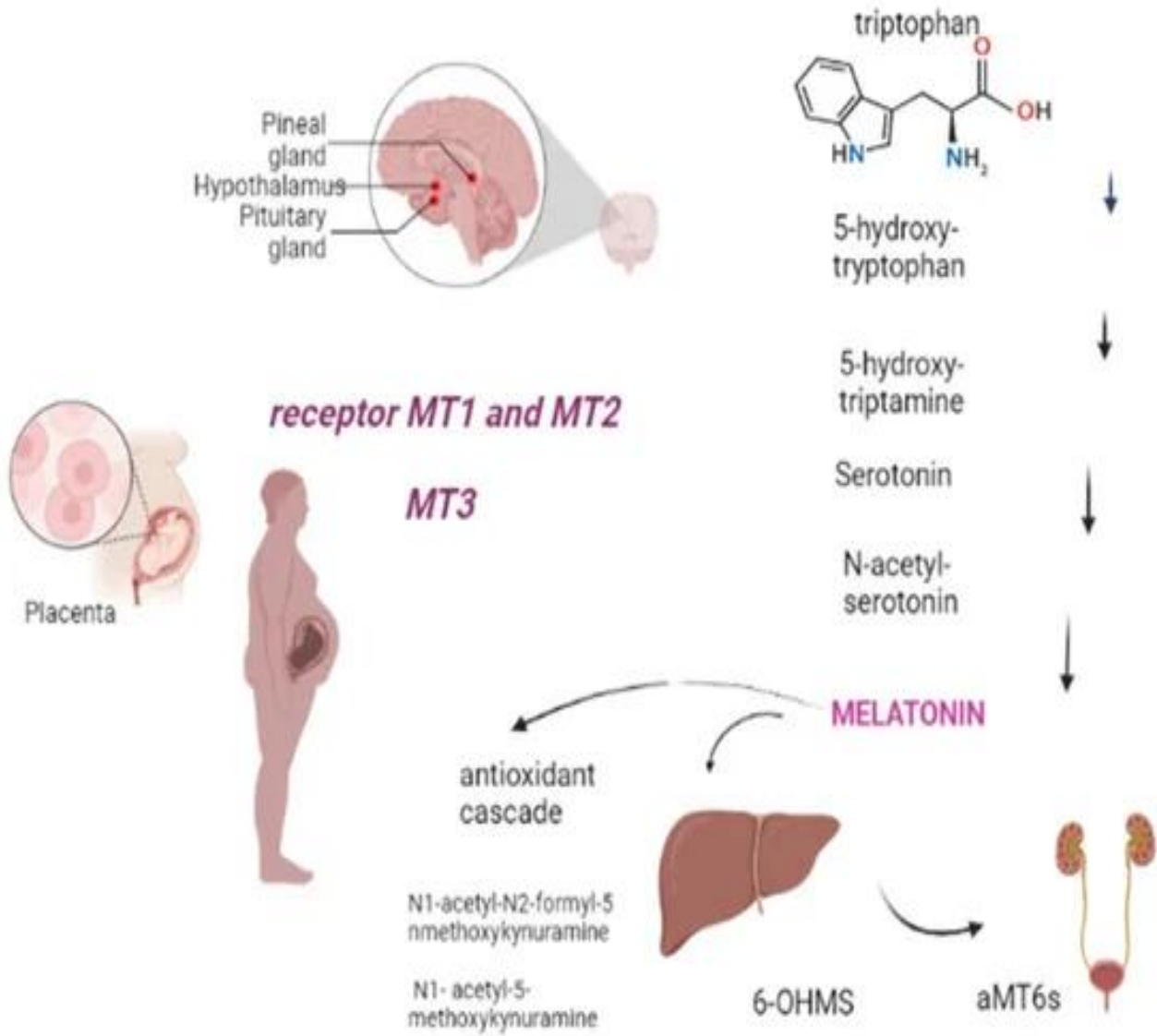
لا توجد بيانات أو دراسات كافية حول آثار مكملات الميلاتونين أثناء الحمل وما هي نتائجها المحتملة، لكن ألقت بعض الدراسات الحديثة الضوء على آليات العمل والوظائف في فترة الحمل (Verteramo et al., 2022). وبيّنت أن لهذا الجزيء نشاط فيزيولوجي ولعل أهمها تعديل الإيقاع اليومي للأم، من يؤسس دورة الليل والنهار للجنين ولأن الميلاتونين أيضاً يصنع في المشيمة وقادر على المرور بسرعة عبر المشيمة فإنه يرسل معلومات ضوئية دورية للجنين مما يدعم تمايز الأنسجة واستقلاب الهرمونات (Verteramo et al., 2022).

تُعتبر اضطرابات النوم من الظواهر الشائعة خلال فترة الحمل، حيث تُقدّر نسبة النساء الحوامل اللواتي يعانين من اضطرابات النوم بين 66-94%، وتزداد النسب مع تقدم الحمل إلى المراحل المتأخرة من الحمل. تُعزى هذه الاضطرابات إلى التغيرات الهرمونية والفسيولوجية التي تطرأ على الجسم خلال الحمل، والتي تؤثر على أنماط النوم والاستيقاظ. تعتبر اضطرابات النوم خلال الحمل ليست مجرد مشكلة صحية تفرض عدم الراحة فحسب، وإنما لها تبعات صحية وخيمة على كل من الأم والجنين (Tain & Hsu, 2024).

أظهرت الدراسات أن نقص النوم المزمن خلال الحمل مرتبط بزيادة أخطار مضاعفات الحمل، مثل السكري الحلي، وتسمم الحمل، والولادة المبكرة. بالإضافة إلى ذلك، فإن اضطرابات النوم قد تؤدي إلى نتائج سلبية للجنين، بما في ذلك انخفاض وزن الولادة وزيادة احتمالية ولادة أطفال بظروف صحية حرجية. ومن الجدير بالذكر أن نقص النوم يرتبط أيضاً بتدهور الصحة النفسية للأمهات، حيث ثبت أن اضطرابات النوم في النصف الأخير من الحمل ترتبط بزيادة أعراض الاكتئاب بعد الولادة. تشير الأدلة إلى أن سوء النوم أثناء الحمل لا يقتصر على الجانب الفيزيولوجي فحسب، بل يمتد ليشمل الآثار النفسية والعاطفية، مما يؤدي إلى زيادة احتمالية الإصابة بالاكتئاب بعد الولادة، وهو ما يؤثر بشكل كبير على استقرار الأم وسلامة الرضيع (Tain & Hsu, 2024).

تُعَدُّ الغدة التناسلية، وخاصة المبايض، من الأعضاء الحيوية التي تلعب دوراً رئيسياً في تنظيم الوظائف التناسلية والهرمونية لدى الأنثى، حيث تعتمد على تفاعل معقد بين الهرمونات المختلفة، وبشكل خاص على محفزات الغدة النخامية مثل هرموني FSH وLH، وكذلك على هرمون GnRH الذي يُنظم إفراز هذين الهرمونين. وتتمثل وظيفة هذه الهرمونات في تنظيم نمو البويضات، الإباضة، وتكوين الجسم الأصفر، بالإضافة إلى إنتاج الهرمونات الستيرويدية الضرورية للحفاظ على التوازن الهرموني العام (Woo et al., 2001).

يتركز دور الميلاتونين في التكاثر على تأثيره المباشر في المبيض. يستطيع الميلاتونين المرور عبر جميع الأغشية الخلوية والدخول إلى جميع الأنسجة بفضل خاصيته المحبة للدهون، إلا أنه يتركز تحديداً في المبيض عند حقه (Wurtman et al., 1964). وُجدت مستويات عالية من الميلاتونين في السائل الجريبي قبل الإباضة لدى البشر بتركيزات أعلى من مستويات المصل (Brzezinski et al., 1987) (Ronnberg et al., 1990). الشكل رقم (7) يبين تأثير الميلاتونين على المشيمة أثناء الحمل:



الشكل رقم (7) : تأثير الميلاتونين على المشيمة أثناء الحمل

المصدر: (Verteramo et al., 2022)

يشترك الميلاتونين من التربتوفان، الذي يتم إنتاجه في الغدة الصنوبرية بعد خمس مراحل من التفاعل الكيميائي. يتم استقلابه لاحقاً في الكبد والكلية أو بطريقة غير إنزيمية (سلسلة مضادات الأكسدة). ومن الأنسجة المستهدفة أثناء الحمل، المشيمة من خلال مستقبلاته MT1, MT2, MT3 (Verteramo et al., 2022).

10-2- الميلاتونين والمشيمة:

المشيمة عضو أنثوي ويكون من جانب أمومي وجانب جنيني، ولها وظائف بيولوجية عديدة، وتعد كغدة صماء ومناعية أيضاً، وهي تقوم بتشكيل انغراس الجنين في جدار الرحم وتعزيز نموه، كما تحافظ على تحمل الأم للجنين، كما أنها تقوم بإزالة الفضلات الضارة و CO_2 من الدورة الدموية للجنين وإمداده بالمواد الغذائية والأوكسجين، كما تغلف المشيمة الجنين بغشاء مناعي واق طوال فترة الحمل (Joseph et al., 2024).

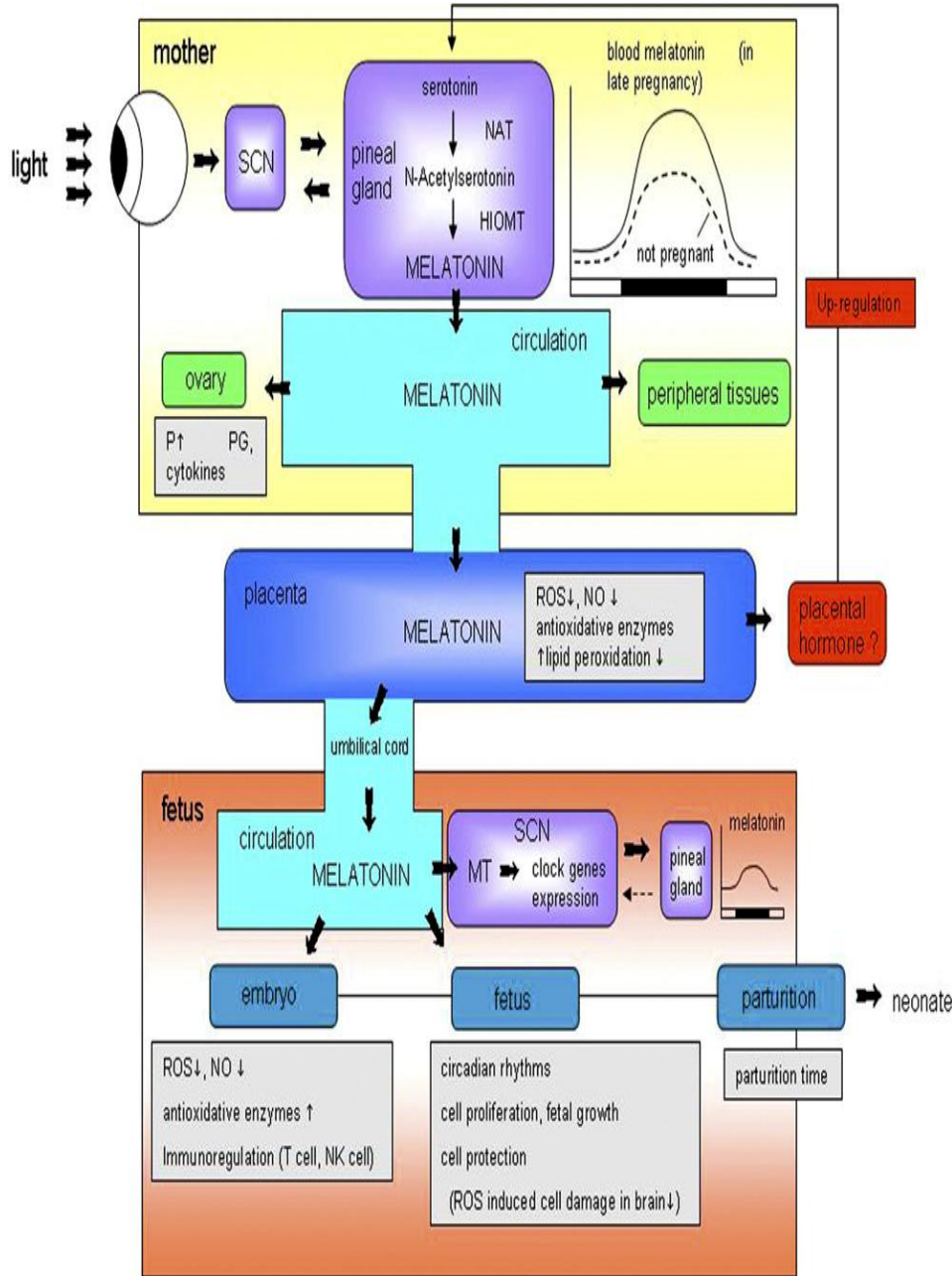
نظراً لأن تراكيز الميلاتونين في المصل أعلى لدى النساء الحوامل منها لدى غير الحوامل، فقد أشارت الدراسات إلى أن المصدر الرئيسي لهذا الميلاتونين هو المشيمة، وإن الحاجة إلى الميلاتونين في المشيمة أمر بالغ الأهمية لكل من الأم والجنين، لأنه يعتمد على ميلاتونين المشيمة وميلاتونين مصل الأم لتوفير معلومات ضوئية دورية للتحكم في الإيقاعات الداخلية للجنين (Kvetnoy et al., 2022) (Verteramo et al., 2022).

يرتفع مستوى الميلاتونين في البلازما بشكل ملحوظ خلال الحمل، و يبلغ أعلى مستوياته في الثلث الثالث من الحمل، وينخفض فجأة بعد الولادة ثم يعزز في حليب الأم، وينخفض تركيزه في مصل حديثي الولادة بعد الأيام الأولى (Verteramo et al., 2022).

يشير الباحثون إلى أن للميلاتونين دوراً محورياً في الحمل والنمو الجنيني، إذ يتم امتصاصه عبر المشيمة ويصل إلى الجنين، ليقوم بدور الوسيط في نقل إشارات الوقت وتنظيم وظائف الساعة البيولوجية لدى الجنين. بالإضافة إلى ذلك، يُعتقد أن للميلاتونين خصائص مضادة للأكسدة، مما يساهم في حماية الأنسجة من الضرر الناتج عن الـ ROS، وهو أمر بالغ الأهمية خلال فترات الحمل الحرجة، إذ يشكل الإجهاد التأكسدي مصدر خطر رئيسي على صحة الأم والجنين (Verteramo et al., 2022).

تعزز الأدلة العلمية أن التغيرات في مستويات الميلاتونين، خاصة تقليلها أو اضطراب نمط إفرازها، قد يكون لها تأثيرات سلبية على الحمل، مما يزيد من احتمالات الإجهاض، ارتفاع ضغط الدم الحملي، أو مضاعفات أخرى قد تؤدي إلى ولادة مبكرة أو ضعف النمو العصبي للجنين. كما أن التداخل في نظام استقلاب الميلاتونين، سواء نتيجة التعرض المستمر للضوء الصناعي أو اضطرابات في النمط اليومي، يؤدي إلى تقويض دوره الحامل للإشارات الهرمونية والبيولوجية الهامة (Tamura, Nakamura, et al., 2008).

يوضح الشكل رقم (8) تمثيل تخطيطي لمسار التزامن المقترح ودور الميلاتونين في نظام الأم والمشيمة والجنين:



الشكل رقم (8): تمثيل تخطيطي لمسار التزامن المقترح ودور الميلاتونين في نظام الأم والمشيمة والجنين

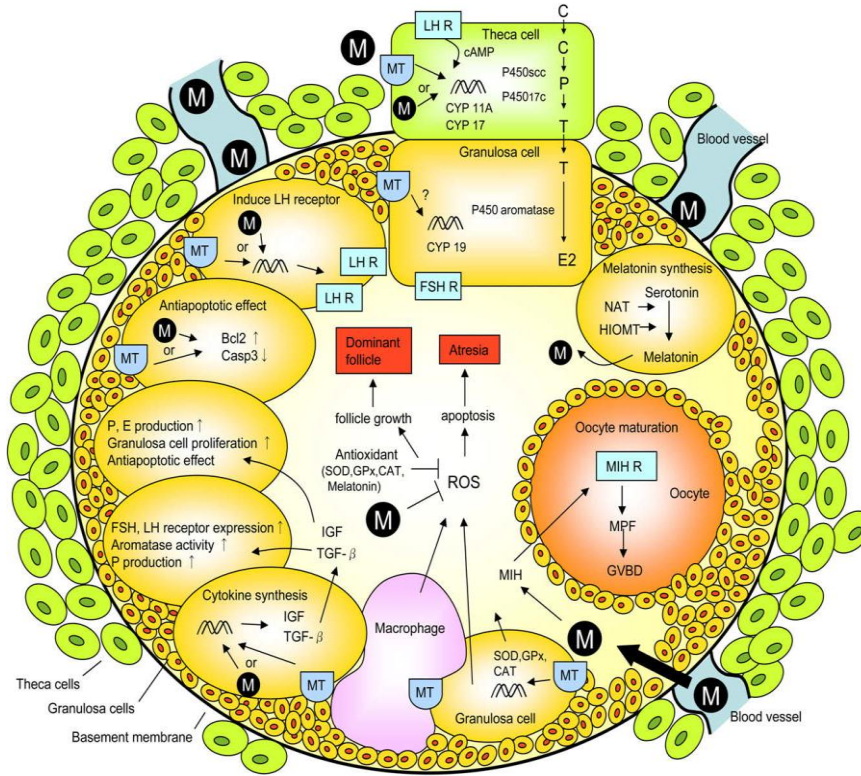
المصدر: (Tamura, Nakamura, et al., 2008)

تمثيل تخطيطي لمسار التزامن المقترح ودور الميلاتونين في نظام الأم والمشيمة والجنين. تُنقل معلومات الفترة الضوئية التي تلقتها عينا الأم إلى الساعة البيولوجية في النواة فوق التصالبية (scn). تُنقل الإشارة العصبية من النواة فوق التصالبية إلى الغدة الصنوبرية لتنظيم الإيقاع اليومي لإفراز الميلاتونين. في الخلية الصنوبرية، يتحول السيروتونين إلى ميلاتونين بواسطة إنزيمين، هما NAT و HIOMT. لدى النساء الحوامل، يبدو أن هرمون المشيمة يُنظم إنتاج الميلاتونين في الغدة الصنوبرية للأم. يُفرز الميلاتونين في الدورة الدموية للأم، ويصل إلى الأنسجة الطرفية والمشيمة. يعبر الميلاتونين المشيمة بسهولة دون أن يطرأ عليه أي تغيير، ويدخل الدورة الدموية للجنين. يعمل الميلاتونين بطرق متنوعة كمنظم للإيقاع اليومي، ومنظم للغدد الصماء، ومنظم للمناعة، ومضاد مباشر للـ ROS، وعامل مضاد للأكسدة غير مباشر وعامل حماية خلوية على جميع مستويات نظام الأم والمشيمة والجنين. النواة فوق التصالبية: SCN؛ N-أسيتيل ترأسفيراز: NAT؛ HIOMT: هيدروكسي إندول-O-ميثيل ترأسفيراز؛ P: بروجسترون؛ PG: بروتاجلاندين؛ PRL: برولاكتين؛ ROS: أنواع الأكسجين التفاعلية؛ NO: أكسيد النيتريك؛ MT: مستقبل الميلاتونين.

11-2- الأدوار المفترضة للميلاتونين في الجريب المبيضي:

يؤثر الميلاتونين في وظائف العديد من الخلايا وخاصة الخلايا الحبيبية وأيضاً البويضة Oocyte، ويتم التوسط في عمل الميلاتونين في هذه الخلايا عبر مستقبلات الغشاء MT1, MT2 وأيضاً عبر مواقع الربط في النواة وفي العصارة الخلوية (السيتوزول) (Reiter et al., 2013).

إضافة إلى وظيفة الميلاتونين عبر مستقبلاته فإن الميلاتونين يعمل أيضاً ككناس للـ ROS، ويقلل من الشدة التأكسدية على مستوى المبيض. هذا ويحفز الميلاتونين الأنزيمات التي تسقلب الـ ROS إلى منتجات أقل سمية وتشمل الأنزيمات المضادة للأكسدة (Reiter et al., 2013) SOD و GPX وكاتالاز Catalase في خلايا الغمد Theca Cells والخلايا الحبيبية وأيضاً في السائل الجريبي، ومن خلال هذه الاجراءات يقلل الميلاتونين من ضرر الـ ROS والذي سيكون سيئاً بشكل خاص بالنسبة للبويضة، وأيضاً يحافظ على هذه العناصر في حالة وظيفية مثلى (Reiter et al., 2013). الشكل رقم (9):



الشكل رقم (9): شكل تخطيطي يوضح الأدوار المفترضة للميلاتونين في الجريب المبيضي

المصدر: (Reiter et al., 2013) (Tamura et al., 2009)

تمثيل تخطيطي للأدوار المفترضة للميلاتونين في الجريب المبيضي. قد يُنتج الميلاتونين في السائل الجريبي FF بواسطة الخلايا الحبيبية، ولكنه يُمتص أيضاً من الدم عبر الغشاء القاعدي. يُنظم الميلاتونين إنتاج الستيرويدات الجنسية من خلال تنظيم أنشطة الإنزيمات المُولدة للستيرويدات أو التعبير الجيني لها في الخلايا القارية والخلايا الحبيبية.

ينظم الميلاتونين أيضاً تعبير mRNA لهرمون LH ، وإنتاج Bcl2 و Casp3، ونشاط IGF و TGF- β ، والتعبير الجيني ونشاط هرمون تحفيز النضج (MIH) maturation-inducing hormone

تنتج الخلايا البلعمية والخلايا الحبيبية ROS كما يعدل الميلاتونين التعبير الجيني لـ SOD و GPx و CAT في الخلايا الحبيبية.

يؤدي الإفراط في ROS إلى تحفيز موت الخلايا المبرمج ويؤدي إلى تضيق الجريبات؛ ومع ذلك، فإن زيادة مستويات الميلاتونين في السائل الجريبي تستنزف ROS من خلال تأثيراتها المضادة للأكسدة المباشرة وغير المباشرة وتمنع تضيق الجريبات. يمكن إنقاذ الجريب بواسطة الميلاتونين ويستمر في نموه ليصبح جريباً مهيمناً.

M = الميلاتونين؛ MT = مستقبلات الميلاتونين؛ LH R = مستقبل LH ؛ FSH R = مستقبل FSH ؛ C = الكوليسترول؛ N- NAT = أسيتيل ترانسفيراز؛ HIOMT = هيدروكسي إندول--O-ميثيل ترانسفيراز؛ MIH = هرمون محفز للنضج؛ MIF = عامل تعزيز النضج؛ GVBD = انهيار النواة البدينة الانثوية؛ ROS = أنواع الأكسجين التفاعلية؛ SOD = سوهر أكسيد ديسميوتاز؛ GPx = الجلوتاثيون بيروكسيداز؛ CAT = كاتالاز؛ IGF = عامل النمو الشبيه بالانسولين؛ TGF- β = عامل النمو المحول.

2-12- الميلاتونين والميتاكوندريا والتقدم بالعمر:

تشير الأدلة المتزايدة إلى أن النوم والاضطرابات المرتبطة به يمكن أن تؤثر بشكل كبير على صحة الإنسان، بما في ذلك الوظائف الإنجابية والشيخوخة. تُعد الميتوكوندريا جزءاً حيوياً من الخلايا، حيث تؤدي دوراً رئيسياً في إنتاج الطاقة والحفاظ على توازن الأكسدة (Song et al., 2016). مع التقدم في العمر، تتدهور وظيفة الميتاكوندريا، مما يساهم في تدهور الصحة والقدرة الإنجابية. تشير الأبحاث إلى أن مضادات الأكسدة، مثل الميلاتونين، تمتلك القدرة على حماية الميتوكوندريا وتقليل الضرر الناتج عن الأكسدة، وبالتالي قد تساهم في تأخير الشيخوخة وتحسين الوظيفة الإنجابية لدى الإناث (Song et al., 2016).

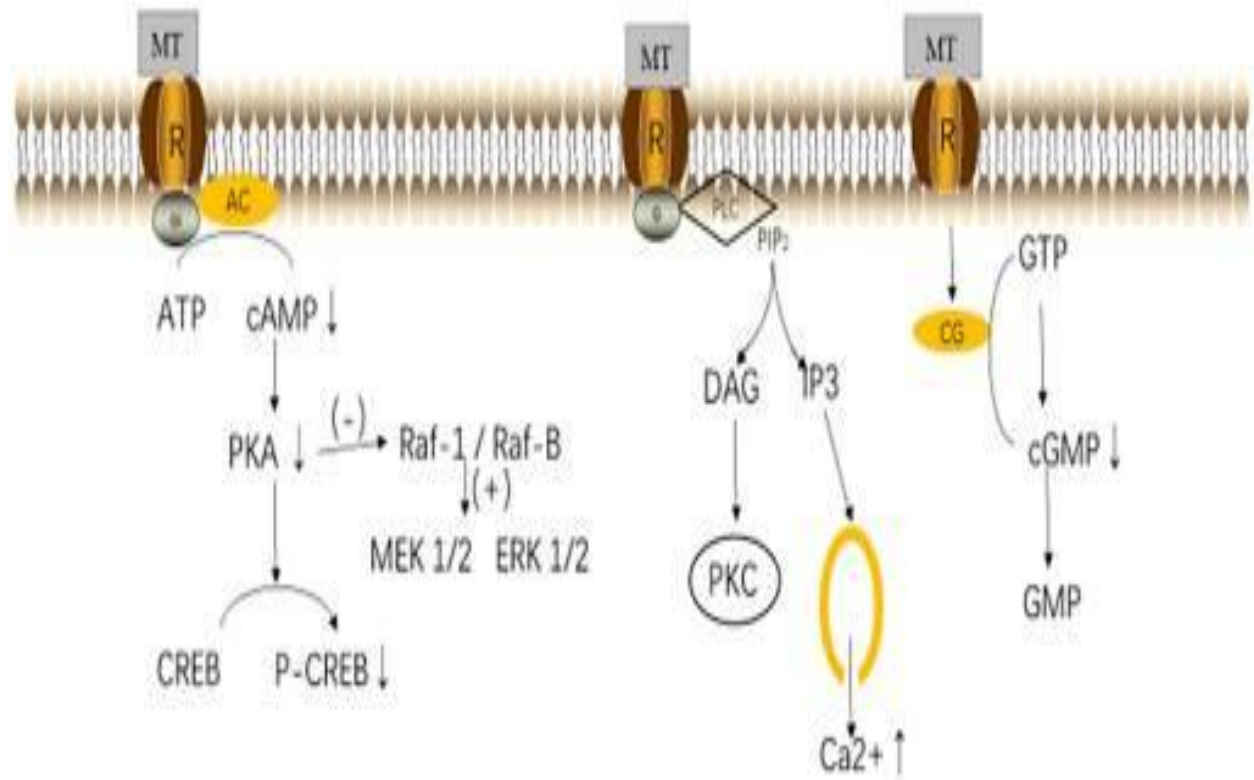
للتقدم بالعمر تأثير سلبي كبير على الوظيفة المثلى للمبيض، حيث تسبق التغيرات في هذا العضو التدهور المرتبط بالعمر في أنسجة أخرى، ويؤدي توقفه في منتصف العمر إلى العقم. ويؤدي انخفاض الخصوبة وما يترتب عليه من عدم القدرة على الحمل لدى النساء في مجتمعات اليوم اللاتي يخترن الإنجاب في سن متأخرة إلى زيادة الإحباط (Reiter et al., 2023).

من المعروف أن الميلاتونين يتميز بخصائص مضادة للشيخوخة، بفضل خصائصه المضادة للأكسدة والالتهابات. وتشير مستوياته العالية في السائل الجريبي مقارنةً بتركيزاته في الدم، واحتمالية تخليقها في الخلايا البويضية والحبيبية والأصفرية، إلى أنه في وضع مثالي للتدخل في تدهور المبيض المرتبط بالعمر. بالإضافة إلى ذلك، يتزامن نهاية فترة الإنجاب لدى الأنثى مع انخفاض كبير في مستويات الميلاتونين (Reiter et al., 2023).

قد يساعد استخدام مكملات الميلاتونين في الحفاظ على الخصوبة في مراحل لاحقة من الحياة، ويخفف من الإحباط لدى النساء اللواتي يؤخرن سن الإنجاب، ويقلل من ضرورة إجراء عمليات التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة (IVF-ET)، ويساعد في حل مشكلة العقم غير المرتبط بالشيخوخة المتزايدة لدى النساء طوال فترة حياتهن الإنجابية (Reiter et al., 2023).

13-2- مستقبلات الميلاتونين Melatonin receptors:

الميلاتونين جزيء ذو وظائف متعددة، بما في ذلك تأثيره على الجهاز التناسلي الأنثوي، من خلال التأثير على فيزيولوجيا المبيض من خلال مستقبلات الميلاتونين 1 (MT1) و/أو 2 (MT2). تتوزع هذه المستقبلات في خلايا مبيضية مختلفة، بما في ذلك الخلايا الجريبية، وخاصة الخلايا الحبيبية (GCs). بعض تأثيرات الميلاتونين على المبيض والرحم لا تتطلب مستقبلات، مثل نشاطه في إزالة الـ ROS. ومن المثير للاهتمام أن تركيز الميلاتونين في الجريب الناضج قبل الإباضة أعلى بعدة أضعاف من تركيزه في الدم، مما يشير إلى تركيبه الموضعي وأهميته في الإباضة. من المؤكد جداً أن إشارات MT1 و MT2 يتم توسطها بشكل رئيسي من خلال مسارات cAMP و PKA و PKC (Guo et al., 2021) الشكل رقم (10).



الشكل رقم (10): مسار الإشارات الخلوية المنشط بواسطة مستقبل الميلاتونين

المصدر: (Guo et al., 2021)

MT = الميلاتونين، R = مستقبل الميلاتونين، AC = أدنيل سيكلاز، ATP = أدينوزين ثلاثي الفوسفات، cAMP = أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي، PKA = بروتين كيناز A، CREB = بروتين رابط للعناصر، PLC = فوسفوليپاز C، PIP2 = فوسفاتيديل ادينوزيتول 5,4 ثنائي الفوسفات، DAG = ثنائي أسيل غليسيريدي، CG = غواندليل سيكلاز، GTP = غوانوزين ثلاثي الفوسفات، CMP = غوانوزين ثنائي الفوسفات

يمكن أن يؤثر الميلاتونين على التعبير الجيني من خلال MT1 و MT2، وكلاهما يتم التعبير عنه في الخلايا الجريبية والبويضات. لذلك، يُمكن للميلاتونين أن يُغيّر الوظائف الخلوية للخلايا الحبيبية عن طريق تنشيط مسار إشارات مستقبلات الميلاتونين (Maganhin et al., 2023). بالإضافة إلى أن الميلاتونين يحمي الخلايا الحبيبية ويُحسّن إضافة الميلاتونين إلى وسط النضج المختبري النضج السيتوبلازمي للبويضات البشرية غير الناضجة والنتائج السريرية اللاحقة لدى المرضى الذين يخضعون لـ IVF (Maganhin et al., 2023).

من المعروف أن الجريبات الناضجة مُحاطة بطبقة من الخلايا الحبيبية، بالإضافة إلى خلايا القشرة الداخلية، المسؤولة عن تكوين الستيروئيدات المبيضية، بما في ذلك إنتاج الإستروجين والأندروجين الأوعية الناضجة أو حديثة التكوين ضرورية لتغذية الجريبات ونموها، وجودة البويضات، والإباضة الكافية، ونقل الهرمونات التي تنتجها الخلايا الحبيبية. لذلك، فإن تكوين الأوعية الدموية أمر بالغ الأهمية لفيزيولوجيا الخلايا الحبيبية (Maganhin et al., 2023). وقد أفادت الدراسات السابقة أن الميلاتونين يمكن أن ينظم تكوين الأوعية الدموية في العديد من الأعضاء بما في ذلك الكلى والكبد والقلب (Maganhin et al., 2023).

تلعب الخلايا الحبيبية دوراً رئيسياً في الخصوبة العامة ونضج البويضات. ويرتبط خلل الخلايا الحبيبية بشكل مباشر أو غير مباشر بالعقم عند النساء. لذلك، من المهم تحديد التأثيرات المحتملة للميلاتونين على تكوين الأوعية الدموية في الخلايا الحبيبية حيث يوجد مستوى ميلاتونين أعلى بكثير في السائل الجريبي منه في المصل. ولهذا السبب من المهم دراسة تأثير الميلاتونين على التعبير عن الجينات المرتبطة بتكوين الأوعية الدموية في الخلايا الحبيبية الصفراء لدى النساء اللاتي يخضعن لـ IVF بسبب العقم الذكري (Maganhin et al., 2023).

توجد مستقبلات للميلاتونين في الجسم تحديداً في:

الدماغ Brine، شبكية العين Retine، جملة القلب والأوعية الدموية Cardiac Vascular System، جدار بطين القلب Cardiac Ventricular Wall، الشريان الأبهر Aorta، الشرايين التاجية والدماعية Coronary Cerebral Arteries and، الكبد Liver، المرارة Gallbladder، الخلايا المعوية الاثني عشرية Duodenal Intestinal Cells، الكولون Colon، والأعور والزائدة الدودية Cecum and Appendix، الجلد Skin، الغدة النكفية Parotid Gland، بنكرياس خارجي الإفراز Exocrine Pancreas، الكلى Kidneys، خلايا الجهاز المناعي Cells of Immune System، الصفائح الدموية Platelets، الخلايا الدهنية البنية والبيضاء Brown and White Adipocytes، الخلايا الظهارية للبروستات والثدي Epithelial Cells of Prostate and Breast، الخلايا الحبيبية / المبيض Ovary / Granulosa cells، عضلة الرحم

Myometrium، المشيمة Placenta، الكلى الجنينية Fetal kidneys. كما توجد مستقبلات الميلاتونين في مخاطية الصائم والقولون Jejunal and ucosa (Emet et al., 2016).

تنقسم مستقبلات الميلاتونين إلى مستقبلات غشائية ومستقبلات نووية، يرتبط المستقبل النووي بعائلة مستقبلات RZR/ ROR النووية. في عام 1999، تم تحديد التعبير عن مستقبلات الميلاتونين الغشائية MT1, MT2 في البويضات والخلايا الحبيبية حيث ينتشر مستقبل MT1 على نطاق واسع في المبايض وهو أساس للحماية التي يوفرها الميلاتونين ضد تلف المبايض الناتج عن العامل العلاجي الكيميائي (Polyakova et al., 2024).

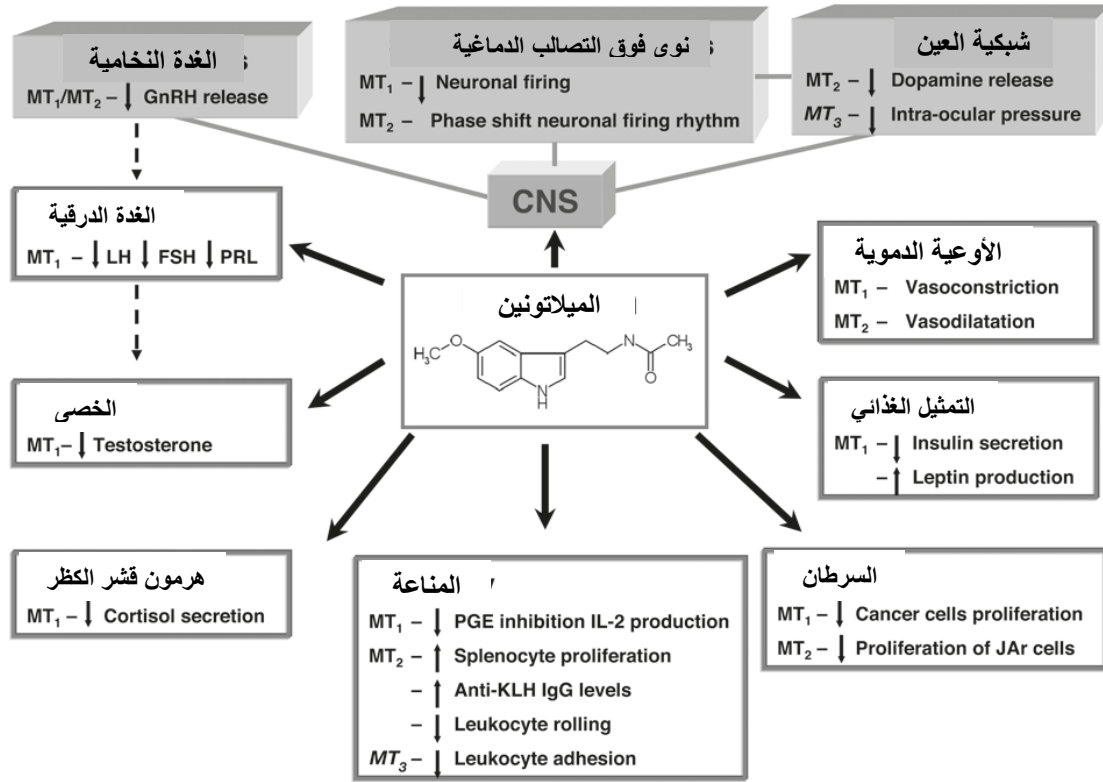
وتم اكتشاف مستقبلات غشائية للميلاتونين MT1, MT2 في الخلايا الحبيبية، وخلايا الركام البيضي والخلية البيضية (البويضة) عند البشر وعند الجرذ. وتشير الدراسات بأن الميلاتونين ينظم تنامي الجريب ونضج البويضة وعملية الإباضة وتشكل الجسم الأصفر من خلال مستقبله، وكانت تلك الدراسات على الإنسان والقوارض والجرذ (Xiao et al., 2019).

يوجد في البشر والثدييات الأخرى نوعين فرعيين لمستقبلات MT1، MT2 والذين يرمزان بواسطة جين MTNR1A من q35.1 و 4 وجين MTNR1B من q22 - q21 على التوالي (Guo et al., 2021).

بناءً على التركيب الجزيئي يتكون مستقبل MT1 من 350 حمضاً أمينياً، بينما يتكون مستقبل MT2 من 363 حمضاً أمينياً، يتشارك هذان المستقبلان في التسلسل بنسبة 60% وكلاهما ينتمي إلى عائلة مستقبلات بروتين G (Guo et al., 2021).

يؤدي ارتباط الميلاتونين بمستقبله MT1 المقترن مع البروتين G إلى تنشيط المستقبل وتفعيل البروتين G بسبب تنشيط الوحدة الفرعية، مما يؤدي إلى تثبيط أنزيم الأدينيلات سيكلاز، وبالتالي انخفاض في تركيز الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (CAMP)، وبالتالي تثبيط لأنزيم بروتين كيناز A (Protein Kinase A) ، مما يؤدي إلى تنشيط مسارات متسلسلة تؤدي في النهاية إلى فسفرة وتنشيط عامل الانتساخ (CREB)، وهو البروتين الرابط للعناصر المستجيبة والذي بدوره ينتقل إلى النواة لتعديل التعبير الجيني المتعلق بالتخليق الحيوي للستيروئيدات (البروجسترون والأستروجين). يشارك مستقبل MT1 في تنظيم الايقاعات البيولوجية (Guo et al., 2021).

في الثدييات هناك على الأقل اثنين من مستقبلات الميلاتونين MT1, MT2 يبلغ طول مستقبلات الميلاتونين 350 و 362 حمضاً أمينياً على التوالي مع أوزان جزيئية تتراوح بين 39 و 40 كيلو دالتون (Cecon et al., 2018) (Dubocovich & Markowska, 2005). الشكل رقم (11) أدناه:



الشكل رقم (11): وظائف مستقبلات الميلاتونين MT₁, MT₂, MT₃ في الجملة العصبية المركزية والنسج الأخرى

المصدر: (Margarita L. D. & Magdalena M., 2005)

يبين الشكل وظائف مستقبلات الميلاتونين MT₁, MT₂, MT₃ في الجملة العصبية المركزية والنسج الأخرى وتشير الأسهم المنقطة إلى التأثيرات غير المباشرة والأسهم الغامقة التأثيرات المباشرة للميلاتونين بشكل محدد والنسج داخل المربعات وفيها تشير الأسهم انخفاضاً أو زيادة لوظائف معينة.

الجدول التالي يبين توزيع مستقبلات الميلاتونين MT₁, MT₂ المعبر عنها في الأنسجة البشرية وكانت تعرف سابقاً اسم MT1a، MT1b على التوالي (Ekmekcioglu, 2006)، موثقة بأسماء الباحثين لذلك: (Cecon et al., 2018)

الجدول رقم (1): توزع مستقبلات الميلاتونين MT₁,MT₂ المعبر عنها في الأنسجة البشرية

المصدر: (Cecon et al., 2018)

Table 1

Distribution of MT₁ and MT₂ melatonin receptors expressed in human tissues

	Tissue	Technique	Reference
hMT ₁	Brain	Cerebellum	Mazzucchelli <i>et al.</i> (1996)
		<i>In situ</i> hybridization	Al-Ghoul <i>et al.</i> (1998)
		Occipital cortex	Mazzucchelli <i>et al.</i> , (1996)
		Parietal cortex	Mazzucchelli <i>et al.</i> (1996)
		Temporal cortex	Mazzucchelli <i>et al.</i> (1996)
		Thalamus	Mazzucchelli <i>et al.</i> (1996)
		Frontal cortex	Mazzucchelli <i>et al.</i> (1996)
		Hippocampus	Mazzucchelli <i>et al.</i> (1996)
		Immunohistochemistry	Savaskan <i>et al.</i> (2001)
		SCN	Weaver and Reppert (1996)
	Peripheral tissues	Retina	Savaskan <i>et al.</i> (2001)
			Savaskan <i>et al.</i> (2002)
			Scher <i>et al.</i> (2002)
			Scher <i>et al.</i> (2003)
		Brown and white adipose tissue	Brydon <i>et al.</i> (2001)
hMT ₂	Brain	Fetal kidney	Drew <i>et al.</i> (1998)
		Coronary artery	Ekmekcioglu <i>et al.</i> (2001a,b)
		Granulosa cells	Soares <i>et al.</i> (2003)
			Niles <i>et al.</i> (1999)
		Myometrium	Schlabritz-Loutsevitch <i>et al.</i> (2003)
		Pancreatic alpha and beta cells	Blodgett <i>et al.</i> (2015)
		Testis	Rossi <i>et al.</i> (2014)
		Cerebellum	Al-Ghoul <i>et al.</i> (1998)
		Hippocampus	Savaskan <i>et al.</i> (2005)

	SCN	Immunocytochemistry	Wu <i>et al.</i> (2013)
Peripheral tissues	Retina	RT-PCR	Reppert <i>et al.</i> (1995a)
		Immunohistochemistry	Savaskan <i>et al.</i> (2007)
	Brown and white adipose tissue	RT-PCR	Brydon <i>et al.</i> (2001)
	Fetal kidney	RT-PCR	Drew <i>et al.</i> (1998)
	Granulosa cells	RT-PCR	Soares <i>et al.</i> (2003)
			Niles <i>et al.</i> (1999)
	Placental tissues	RT-PCR and Western blot	Lanoix <i>et al.</i> (2006)
	Myometrium	<i>In-situ</i> hybridization	Schlabritz-Loutsevitch <i>et al.</i> (2003)
		RT-PCR	Sharkey <i>et al.</i> (2009)
	Pancreatic alpha and beta cells	RNA sequencing	Blodgett <i>et al.</i> (2015)
	Testis	RT-PCR	Rossi <i>et al.</i> (2014)

وأظهرت الدراسات أن مستقبلات الميلاتونين MT1, MT2 موجودة في الخلايا الحبيبية، وأن الميلاتونين يمكن أن ينظم مستقبل LH mRNA، ومن المعروف أن LH هو ضروري لبدء اللوتة إضافة إلى ذلك فإن العلاج بالميلاتونين يعزز إفراز هرمون موجهة الغدد التناسلية الكورونية البشرية Human Chorionic Gonadotropin HCG والحث على إفراز البروجسترون، مما يشير إلى أهمية الميلاتونين في الحفاظ على الجسم الأصفر خلال الحمل (Ekmekcioglu, 2006).

يؤثر الميلاتونين على الخلايا المستهدفة عبر مستقبلات مرتبطة بالبروتين G وتوجد ثلاثة أنواع من مستقبلات الميلاتونين هي MT1, MT2, MT3، حيث يوجد مستقبل MT1 في البشر و MT2 في الحيوانات و MT3 في البرمائيات والطيور (Talpur et al., 2018)، وتستخدم مستقبلات MT1 في التحكم بالإنباب (Talpur et al., 2018).

يتم التعبير عن الميلاتونين ومستقبلاته في الخلايا الحبيبية و يقوم الميلاتونين بتنظيم إنتاج الستيروئيدات وإنتاج البروجسترون كل ذلك عبر مستقبلاته MT1, MT2 (Dubocovich, 2005) وبعد الإباضة تتحول الخلايا الحبيبية إلى خلايا لوتينية.

يتحد الميلاتونين بمستقبلاته في غشاء الخلايا الحبيبية سواء في المبيض أو الجسم الأصفر، أي يتميز عمل الميلاتونين في المبيض بوجود مستقبلات له على غشاء الخلايا الحبيبية MT1,MT2 (Yasuhiko Nakamura, 2003) (Woo et al., 2001).

الفصل الثالث:
المواد والطرائق

Materials and Methods

1-3- عينة الدراسة:

تم أخذ الموافقة المستنيرة لجميع المريضات اللاتي بلغ عددهن (42) مريضة، وتمت الدراسة على عينات الدم والسائل الجريبي لديهن. المريضات الخاضعات لتقانة الاخصاب المساعد في مركز الاخصاب المساعد/ مشفى الشرق خلال عام 2023، وكانت جميع المريضات تحت عمر 38 عام -كما هو مبين في الملحق رقم (1)- بدون أمراض مرافقة قد تؤثر على التعشيش، والمشكلة الوحيدة هو وجود عقم ذكري مجهول السبب، أي تم استبعاد مريضات السكري ومتلازمة المبيض متعدد الكيسات ونقص مخزون المبيض وأي تشوهات، أو أورام مبيضية أو تشوهات رحمية أو أي أمراض مناعية أو تخثرية من الدراسة.

2-3- التحريض المبيضي:

عندما تتم عملية التحريض المبيضي المضبوط Controlled Ovarian Hyperstimulation يجب الانتباه في هذه المرحلة للتوقيت، لأنه يتم بزل البويضات بعد 36 ساعة من تفجير الإباضة، كما تعد المدة ما بين (34-38 ساعة) مقبولة أيضاً (Weiss et al., 2014) وتسمى عملية التحريض الطويل. والهدف من هذه المرحلة هو تسهيل تطور عدة جريبات مسيطرة، بما يضمن الحصول على عدد كاف من الخلايا البيضية الناضجة، ليتم عليها الاخصاب وذلك أن الحالة الطبيعية هي تطور جريب واحد مسيطر خلال الدورة الحوضية الواحدة.

➤ في دورات تحريض الإباضة التي يتم فيها تفجير الإباضة بناهضات الـ GnRH، يجب معايرة مستوى الـ LH في يوم تفجير الإباضة، في حال لم يتم إيجاد بويضات خلال البزل، يمكن إعادة معايرة الـ LH للتحقق والمقارنة مع المستويات القاعدية، فإذا كان مستوى الهرمون أقل من 0,5 mIU/ml عندها يجب أن تتم إعادة التفجير باستخدام Recombinant hCG بدلاً من ناهضات الـ GnRH (Meyer et al. 2015)

➤ يجب أن يُجرى الفحص بالأمواج فوق الصوتية عبر المهبل قبل البدء بعملية بزل البويضات، وذلك لدى المريضات اللواتي سيخضعن لبزل البويضات تحت التخدير العام، و/أو المريضات اللواتي سيتم بزل البويضات لهن بعد دورة طبيعية، حيث يكون عدد الجريبات المتطورة قليلاً، و/أو عند وجود شك بوجود إباضة مبكرة.

3-3- طريقة جمع العينات:

تم سحب 3 مل من الدم الوريدي لكل مريضة، وتثقيل الدم وسحب المصل على أنبوب جاف ريثما يتم تخدير عام للمريضة من قبل قسم التخدير في المشفى، لغرض تهيئتها لبزل السائل الجريبي.

وقبل البدء بمراحل العمل في بحثنا تم تسليط جانب من الضوء على طريقة بزل السائل الجريبي والبويضات منه، والتي تمت في المشفى من قبل الطبيب المختص بذلك، وقمنا بعدها بالحصول على السائل الجريبي.

إجراءات ما قبل البزل:

- تصوير الحوض بالأمواج فوق الصوتية.
- تحري الانتانات المهبليّة.
- التاريخ الطبي وتوفير المعلومات للمريضة.

وحصل بزل البويضات تحت التخدير العام عن طريق الإيكو باستعمال إبرة البزل، حيث أدخلها الطبيب عبر المهبل والمريضة بوضع التخدير والإبرة موصولة بأنبوب رفيع يبزل الجريبات الواضحة على شاشة الإيكو نهاية الأنبوب بالتبويب الذي أُفْرغ بالطبق الخاص، وتم الفحص تحت STERIOscope لمشاهدة الجريبات التي تكون عبارة عن خلية بيضية حولها خلايا الركام البيضي، وتم لقطها بـسيرنغ موصول بـ device معين، وتم غسلهم بوسط خاص لإبعاد الخلايا والدم كذا مرة حتى تبقى الجريبات وحدها، وتم الغسل مرة ثانية وتم وضعها في الحواضن. بعد فترة بسيطة تم إخراج البيوض ووُضِعَت في وسط هيالورونيداز مرة أو مرتين حتى تتحل الخلايا الجريبية حول البيضة ثم تم الغسل أكثر من مرة.

تم من خلال طبق ICSI (في الساعة 38 الى 40) انتقاء النطاف الجيدة بالمجهر المقلوب، وتم حقن كل نطفة ببيضة وتم نقلها إلى طبق خاص للزراعة.

في اليوم الثاني ظهرت على البيوض مظاهر الالتقاح وهي:

1- النواة البدئية الذكرية.

2- النواة البدئية الأنثوية.

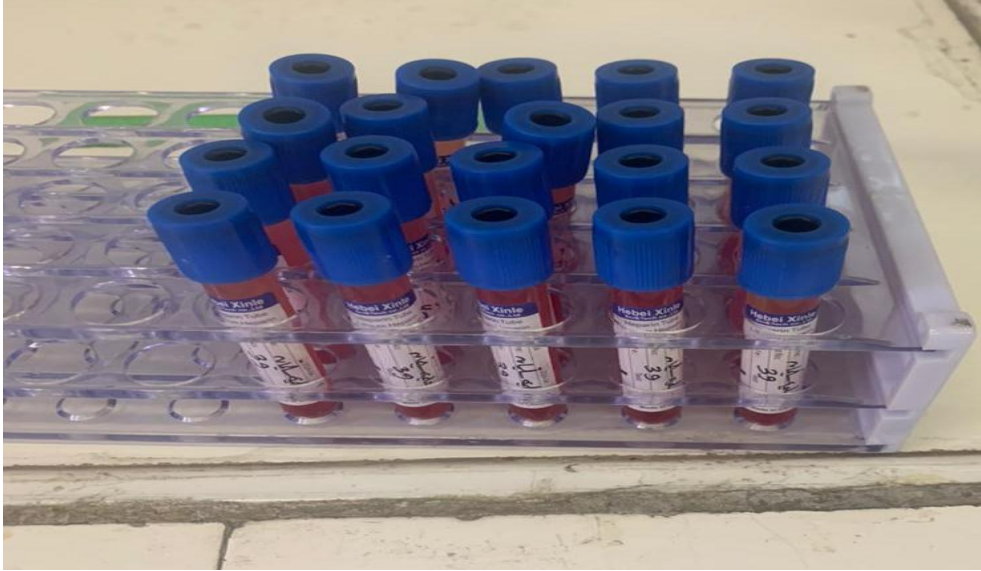
تم بواسطة STERIOscope الكشف عنها، وتم نقلها لأنابيب جديدة وتم إعادتها للحواضن، وتم تقييم جودتها من خلال نضجها النووي أي تشكل الجسم القطبي الأول ودخول الخلية البيضية طور Metaphase II، بينما تم الإبقاء على الخلايا البيضية متوسطة النضج التي لا تزال في طور Metaphase I لمدة إضافية في المستنبتات الخلوية وتم مراقبتها جيداً للتأكد من نضجها.

في اليوم الذي يليه انقسمت الخلية البيضية إلى أربع خلايا، وتم انتقاء الأجنة الأجود على حسب:

1- عدد الخلايا.

2- الانقسام.

ثم تم جمع عينات السائل الجريبي في عبوات بلاستيكية سعة 50 مل وكانت الكميات متفاوتة. تم أخذ 20 مل من السائل الجريبي في أنبوب بلاستيكي حاوي على هيبارين الصوديوم، لغرض عزل الخلايا الحبيبية خلال ساعة من الزمن. كما في الشكل رقم (12):



الشكل رقم (12) : أنابيب الهيبارين المستعملة وفيها عينات السائل الجريبي

وقمنا بتثقيف 1 مل أخرى لكل مريضة لمعايرة الميلاتونين في السائل الجريبي بطريقة الإليزا كما في الشكل رقم (13):



الشكل رقم (13) : أبندروفات لعينات السائل الجريبي بعد تثقيفها

3-4- مراحل العمل:

تم تقسيم العمل إلى خمس مراحل:

- المرحلة الأولى: عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي.
- المرحلة الثانية: عزل RNA الكلي من الخلايا الحبيبية المعزولة.
- المرحلة الثالثة: اصطناع c DNA من mRNA المعزول.
- المرحلة الرابعة: اجراء اختبار RT-qPCR لتحديد كمية مستقبل الميلاتونين في الخلايا الحبيبية بالارتفاع أو الانخفاض
- المرحلة الخامسة: معايرة الميلاتونين بالدم والسائل الجريبي بطريقة الإليزا.

3-4-1- المرحلة الأولى: عزل الخلايا الحبيبية بطريقة البيركول

المواد والأجهزة المستعملة:

- مجهر ضوئي Optika
- عدادة نيو باور NEUBAUER W.GERMANY BLAUBRAND
- مثقلة
- محم مائي Water Bath
- أنابيب بلاستيكية مخروطية
- محلول البيركول
- هيبارين الصوديوم
- وقاء ملحي فوسفاتي
- وسط زرع DMEM/F-12 شركة Euro Clone S.P.A
- بنسلين / سيتريتومايسين شركة Simply
- مصل بقرى FBS (Fetal bovine serum)
- محلول حل الكريات الحمر الحاوي على كلوريد الامونيوم
- ماصات عقيمة 10مل

طريقة العمل:

- تم مزج 4.5 مل من المحلول الملحي الفوسفاتي الدارئ (PBS) Phosphate-Buffered Saline مع 4.5 مل من محلول البيركول، في أنبوب بلاستيكي سعته 50 مل، بحيث أصبح الحجم 9 مل PBS مع محلول البيركول بنسبة حجم لحجم، مع المحافظة على استقرار البيركول في قعر الأنبوب.
- تمت إضافة 20 مل من السائل الجريبي إلى المزيج السابق.
- بحيث تم التعديل في تجربتنا عن التجارب العالمية السابقة بحجم البيركول المستخدم بعد عدة تجارب قمنا بها بأحجام مختلفة من البيركول، حتى توصلنا للقيمة المثلى التي تحقق الفصل بشكل واضح وكذلك بالزمن التي تبقى فيه العينة في درجة حرارة المخبر وسنأتي على ذكره.
- حيث تمت إضافة السائل الجريبي بحذر إلى مزيج البيركول بشكل تسيل على جدار الأنبوب، حتى وصل حجم الأنبوب إلى 29 مل.
- تم تثقيب الأنابيب على السرعة GX 850 مدة 10 دقائق، مع التبريد على الدرجة 4 مئوية.
- تم جمع الخلايا الحبيبية بواسطة ماصة عقيمة من السطح الفاصل بين السائل الجريبي ومحلول البيركول، وتكون الطبقة بيضاء اللون غالباً.
- تم إعادة تعليق الخلايا باستخدام وسط زرع مناسب Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM/F-12) المزود بصادين حيويين بنسولين / سترينومايسين ومصل بقري جنيني Fetal Bovine Serum (FBS) تركيزه 5%.
- تكرار التثقيب مرة ثانية.
- تم إضافة 1 مل من دائرة حل الكريات الحمر الحاوي على كلوريد الأمونيوم إلى رسابة الخلايا الحبيبية، والمزج لمدة دقيقة، ثم تم إضافة وسط DMEM للحفاظ على سلامة الخلايا الحبيبية، ثم تم وضعه في درجة حرارة المخبر لمدة تصل إلى 13 دقيقة بدلاً عن الأزمان التي ذكرت في المقالات الأخرى والتي لا تقل عن 15 دقيقة.
- تم إعادة التثقيب للتخلص من الطافي.
- تم إضافة وسط الزرع DMEM للحفاظ على الرسابة الخلوية.
- تم أخذ 20 ميكرون من الخلايا المعلقة بوسط الزرع، وتم وضعه على عداة نيوباور مغطاة بساترة.
- تم عد الخلايا تحت المجهر بتكبير 40 X في الساعات الأربع وتقسيم المجموع على 4 لمعرفة الوسطي ثم ضربنا الناتج ب 10 مرفوعة للقوة 4 لنحصل على عدد الخلايا بالمل.
- تم التخلص من الطافي بعد تثقيب سريع مدته 5 دقائق والاحتفاظ بالرسابة الخلوية على درجة حرارة 80- درجة لاستكمال اجراء الاختبارات الجزيئية والخلوية عليها.

2-4-3- المرحلة الثانية: عزل الرنا الكلي total RNA من الخلايا باستخدام كيت RNeasy plus Mini Kit (50)

المواد والطرائق:

- كيت لاستخلاص total RNA كما في الشكل رقم (14) أدناه:
- كيت لتحويل mRNA إلى cDNA
- برايمرات خاصة بالجين MT1
- SYBR Green
- جهاز تفاعل البوليميراز المتسلسل بالوقت الحقيقي (RT-PCR) Real-Time Polymerase Chain Reaction
- مثقلة
- محم



الشكل رقم (14): كيت استخلاص الـ total RNA

عينة الدراسة:

رسابة الخلايا الحبيبية المعزولة عن طريق مدروج البيركول والمحفوطة مجمدة -80^c وذلك من السائل الجريبي لنساء خاضعات لتقانة الـ IVF في المركز المذكور، وكانت خطوات العمل كالتالي:

1. تمت بدايةً إضافة حجم مناسب من محلول RLT (600 ميكروليتر من محلول RLT و 6 ميكروليتر من بيتا ميركابتو إيثانول) للخلايا (495 ميكروليتر RLT مع 6 ميكروليتر من بيتا ميركابتو إيثانول) لتعطيل أنزيمات RNase التي تخرّب RNA.
2. تمت مجانسة الخلايا مع المحلول بواسطة إبرة سيرنغ عقيمة 22 G حوالي 4-5 مرات للحصول على حلالة خلوية متجانسة.
3. تم تقيل العينة (الحلالة Lysate) على أعلى سرعة 14,500 دورة/دقيقة مدة 3 دقائق.
4. تم سحب الطافي باستعمال الماصة الميكروية ونقلناه إلى عمود إزالة الدنا الجينومي وثقلنا بسرعة 10,000 دورة/دقيقة مدة 30 ثانية.
5. تم استبعاد العمود الحاوي على الدنا الجينومي gDNA واحتفظنا بالراشح الحاوي على الرنا RNA. أضفنا حجم مناسب من الإيثانول 70% (600 ميكروليتر بحسب حجم RLT المضاف) ومزجنا جيداً باستعمال الماصة الميكروية.
6. تم نقل حوالي 600-700 ميكروليتر من العينة إلى عمود ربط الرنا المثبت على أنبوب التجميع سعة 2 مل وثقلنا بسرعة 10,000 دورة/دقيقة مدة 15 ثانية.
7. تم استبعاد الراشح وأضفنا 700 ميكروليتر من محلول RW1 إلى الرنا المثبت على العمود وثقلنا بسرعة 10,000 دورة/دقيقة مدة 15 ثانية واستبعدنا الراشح كالسابق.
8. تم استبعاد الراشح وأضفنا 500 ميكروليتر من محلول RPE إلى الرنا المثبت على العمود وثقلنا بسرعة 10,000 دورة/دقيقة مدة 15 ثانية واستبعدنا الراشح كالسابق.
9. تمت اضافة 500 ميكروليتر من محلول RPE إلى الرنا المثبت على العمود وثقلنا بسرعة 10,000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين واستبعدنا الراشح كالسابق.
10. تم نقل العمود الحاوي على الرنا إلى أنبوب تجميع نظيف سعة 1.5 مل، وأضفنا 30 ميكروليتر ماء نقي إلى غشاء العمود مباشرةً وثقلنا بسرعة 10,000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على RNA النقي.

3-4-3 المرحلة الثالثة: اصطناع cDNA حسب كيت Transcriptor High Fidelity cDNA – Synthesekit

(1) تم تحضير المزيج (1) المُبين في الجدول رقم (2):

الجدول رقم (2): مكونات المزيج (1) لاصطناع cDNA

المكونات	الكمية (ميكروليتر)
مزيج النكليوتيدات الحرة ثلاثية الفوسفات منقوصة الأكسجين 10 ميلي مولر	1 ميكروليتر
مرسلة Oligo (dt) primer	1 ميكروليتر
Total RNA	بحسب التركيز ما يعادل 8 ميكروليتر
الحجم الكلي	10 ميكروليتر

(2) تم حضن مدة 10 دقائق على الدرجة 70 مئوية.

(3) تم حضن المزيج (1) على الثلج، وإضافة المزيج (2) ليُصبح الحجم الكلي 20 ميكروليتر والمبين في الجدول رقم (3):

الجدول رقم (3): مكونات تحضير المزيج (2) وإضافته إلى المزيج (1)

المكونات	الكمية (ميكروليتر)
المزيج (1)	10 ميكروليتر
الوقاء 10x Buffer	2 ميكروليتر
إنزيم النسخ العكسي M-MLV	1 ميكروليتر
مثبط إنزيم RNase 40 وحدة/ميكروليتر	0.5 ميكروليتر
ماء مقطر معقم	6.5 ميكروليتر
الحجم الكلي	20 ميكروليتر

(4) تم حضن المزيج مدة 50 دقيقة على الدرجة 37 مئوية.

(5) تم إيقاف التفاعل بحضن المزيج مدة 10 دقائق على الدرجة 80-94 مئوية.

4-4-3- المرحلة الرابعة: اجراء RT-qPCR لتحديد مستوى التعبير عن مستقبل الميلاطونين MT1

تم إنجاز التفاعل على جهاز RT-PCR باستخدام SYBEER GREEN MASTER وإضافة البرايمرات الخاصة بمستقبل الميلاطونين MT1 كما في الشكل رقم (15).

حيث يحتوي الخليط على جميع الكواشف المطلوبة لـ qPCR باستثناء القالب والبادئات في محلول جاهز للاستخدام حيث يعتمد هذا الخليط على بوليمراز ساخن يتم حظر نشاطه بواسطة أجسام مضادة في درجة حرارة الغرفة ويتم تفعيله عند بدء التحلل الأولي.

تتداخل صبغة الحمض النووي الفلورية Sybeer Green مع منتج التضخيم أثناء عملية تفاعل البوليمراز المتسلسل وتسمح بالقياس الكمي المباشر للحمض النووي المستهدف دون الحاجة إلى تصنيع مسابر خاصة بالتسلسل. وكان التسلسل لبرايمرات بحثنا الخاصة بـ MT1 المصممة هي:

- F : 5-CTGGTCATCCTGTCTGGTGTATC-3

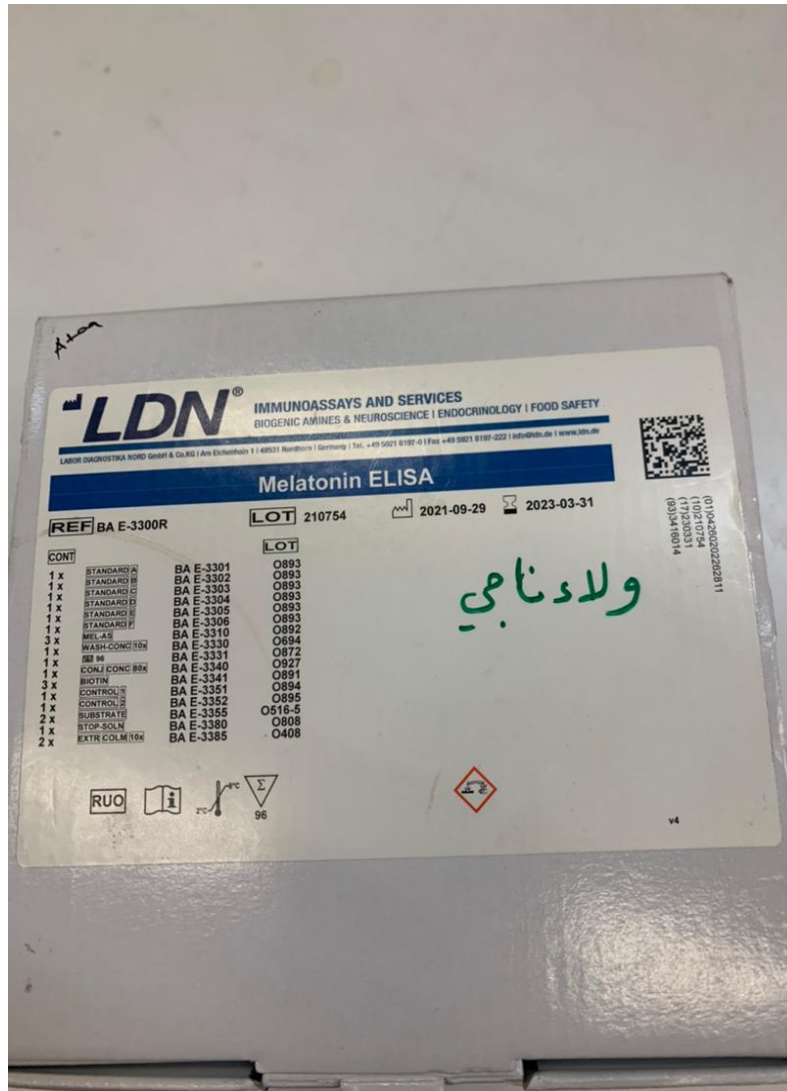
- R : 5-TCGACATCAGCACCAACGGGTA-3



الشكل رقم (15): جهاز RT-PCR

3-4-5- المرحلة الخامسة: معايرة الميلاتونين بالدم والسائل الجريبي بطريقة الاليزا المواد والأجهزة المستعملة:

- كيت الاليزا لمعايرة الميلاتونين (LDN) كما في الشكل رقم (16)
- مثقلة
- مجمدة
- ابندروفات
- أنابيب جافة
- جهاز معايرة الميلاتونين كما في الشكل رقم (17).



الشكل رقم (16): كيت الاليزا لمعايرة الميلاتونين (LDN)



الشكل رقم (17): جهاز معايرة الميلاتونين

طريقة العمل:

1- تهيئة العمود:

- تم وضع العمود في أنبوب بلاستيكي أبعاده (12×75) مم.
- إضافة 1مل ميتانول غير ممدد لكل عمود ونثقل دقيقة واحدة بسرعة 120g نهمل الرشاحة.
- إضافة 1مل ماء مقطر لكل عمود ويثقل لمدة دقيقة واحدة بسرعة 120g تهمل الرشاحة.
- تهيئة العينات بسرعة كي نتجنب جفاف العمود.

2- تطبيق العينات:

- كتابة الأسماء على الأنابيب (كونترول - مرضى)
- إضافة 0.5 مل من الكونترول والعينات لكل عمود
- إضافة 0.5 مل من الماء المقطر لكل عمود ثم نثقل 5 دقائق بسرعة 120 g نهمل الرشاحة الناتجة.

3- الغسيل:

- إضافة 1 مل ميتانول 10% (ميتانول ممدد 10% ، 10 مل ميتانول في 100 مل ماء مقطر).
- تثقيب 5 دقائق بسرعة 120 ونهمل الرشاحة نكرر العملية مرة ثانية بإضافة 1 مل ميتانول 10 % وتثقيب 5 دقائق ونهمل الرشاحة الناتجة.

4- تمديد الخلاصة:

- نقل أعمدة الاستخلاص إلى أنابيب جديدة معنونة بالأسماء.
- إضافة 1 مل ميتانول نثقل 5 دقائق 120 g.
- إزالة الأعمدة من الأنابيب مع الانتباه إلى جمع كل الكمية وتجنب بقاء بعض النقط على الأعمدة.

5- التبخر:

- تبخير الرشاحة الناتجة حتى تمام الجفاف.
- حل بإضافة 0.15 مل ماء مقطر.
- مزج على الرجاجة لمدة دقيقة ونعاير فوراً.

6- إجراءات الاختبار:

- وضع 50 ميكروليتر من كل رشاحة (عيارى - كونترول - عينات) في حجرة الصفيحة.
- إضافة 50 ميكروليتر ميلاتونين بيوتين لكل حجرة.
- إضافة 50 ميكروليتر ميلاتونين anti serum لكل حجرة.
- تغطية الصفيحة بورق لاصق نرجها بلطف ونحضنها بحرارة 8.2 c مدة 14-20 ساعة.
- إزالة الغطاء اللاصق ونرمي المحلول ونغسل كل حجرة 3 مرات ب 250 ميكروليتر بالوقاء الخاص بالغسيل.
- إضافة 50 ميكروليتر أنزيم المحضر حديثاً لكل حجرة.
- تغطية الصفيحة باللاصق ونحضنها 120 دقيقة بدرجة حرارة (18-25) على الهزازة بسرعة 500 .rpm

- إزالة الغطاء اللاصق ونغسل الصفيحة 3 مرات كل مرة ب 250 ميكروليتر وقاء خاص بالغسيل ونزيل الفائض بمنديل ورقي.
- من أجل إضافة substrate أو stop solution يفضل استخدام ميكروبيبيت ثماني الرؤوس إذا توافر كما يجب تجنب تشكل فقاعات أثناء العمل.
- إضافة 200 ميكروليتر من pnpp محلول لكل حجرة.
- حضن 40 دقيقة في حرارة 18-25 على هزازة 500 rpm.
- إيقاف التفاعل بإضافة 50 ميكروليتر (stop solution) لكل حجرة ونهز الصفيحة بلطف.
- قياس على الجهاز photometer على طول الموجة 405 nm خلال ساعة من إضافة stop solution.

الفصل الرابع: النتائج Results

1-4- نتائج المرحلة الأولى:

عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي باستخدام محلول البيركول:

تألفت عينة الدراسة من 42 مريضة، اختلفت نتيجة الحمل لديهن بين سلبية وإيجابية -كما هو مبين في الملحق رقم (2)-.

تحظى الخلايا الحبيبية باهتمام واسع من الباحثين، لما لها أهمية كبيرة في عمليات التكاثر والإنجاب، كما زادت اهتماماتهم بطريقة عزل تلك الخلايا، وبالتالي هدفت دراستنا إلى تطوير تقانة العزل، لجعلها أكثر بساطة وأكبر سرعة وأقل تكلفة، وبالتالي هذه الدراسة حققت النتيجة المرجوة من الحصول على كمية كبيرة من الخلايا الحبيبية.

تم عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي بعد استخدام مدروج كثافة البيركول، وكما ذكرنا من الأمور المهمة لإتمام البحث هو فصل الخلايا الحبيبية عن السائل الجريبي، بحيث تكون عالية الجودة وكافية العدد، وتُعد عملية تدرج الكثافة البيركول تقنية سريعة وبسيطة وغير مكلفة نسبياً.. وفعالية الطرد المركزي بمدروج البيركول بنسبة 50% لفصل الخلايا الحبيبية واستخراجها، وذلك لإزالة خلايا الدم الحمراء الملوثة، واختيار تجمعات الخلايا الحبيبية المناسبة. من أجل الحصول على الحمض النووي الريبي عالي الجودة لدراسات التعبير الجيني.

تتشكل ثلاث طبقات مميزة في الأنبوب كما هو موضح في الشكل رقم (18):

- **الطبقة العليا:** تحتوي على السائل الخفيف (البلازما والبروتينات).
 - **الطبقة الوسطى:** تحتوي على الخلايا الجريبية الحبيبية
 - **الطبقة السفلى:** تحتوي على الخلايا ذات الكثافة الأعلى، مثل الخلايا البيضاء غير الناضجة، وربما بعض الخلايا الجذعية.
- الطبقة العليا بلون أصفر والوسطى بلون أبيض حليبي والسفلى بلون أحمر، والمهم بالنسبة لنا فإن الطبقة البيضاء المتوسطة هي التي تحتوي على الخلايا الحبيبية، والتي يجب سحبها بحذر بواسطة ماصة عقيمة تمتد إلى الطبقة المتوسطة دون خلط الطبقات بثبات وهدوء تامين.
- تم سحب الطبقة المتوسطة ووضعها في ابندوف عقيم.



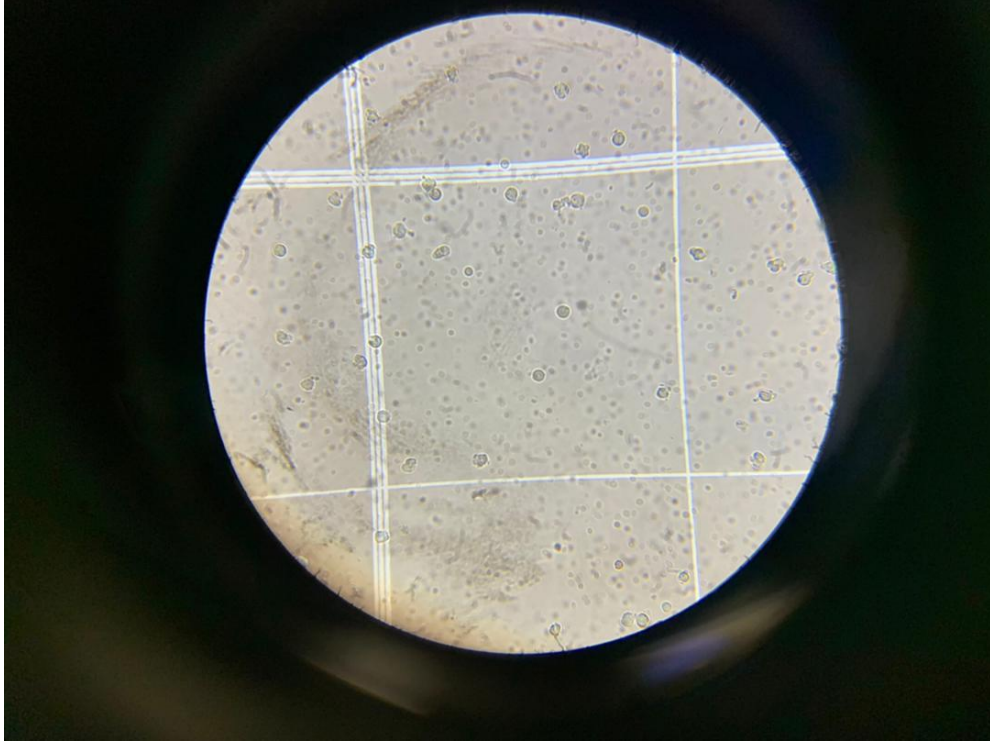
الشكل رقم (18): عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي باستخدام مدروج الكثافة البيركول

تظهر الطبقات الثلاثة في الشكل العليا بلون أصفر تمثل السائل الجريبي الذي يحتوي البروتينات والعديد من الجزيئات الأخرى والطبقة البيضاء الوسطى وهي الطبقة التي تهمننا في البحث لأنها تحتوي على الخلايا الحبيبية التي نقوم بعدها لاحقاً والطبقة السفلى الحمراء التي تحتوي على كريات الدم الحمراء المترسبة

تم سحب الطبقة الفاصلة بين السائل الجريبي والمصل ومعالجتها بكافة الطرق المذكورة كما سبق

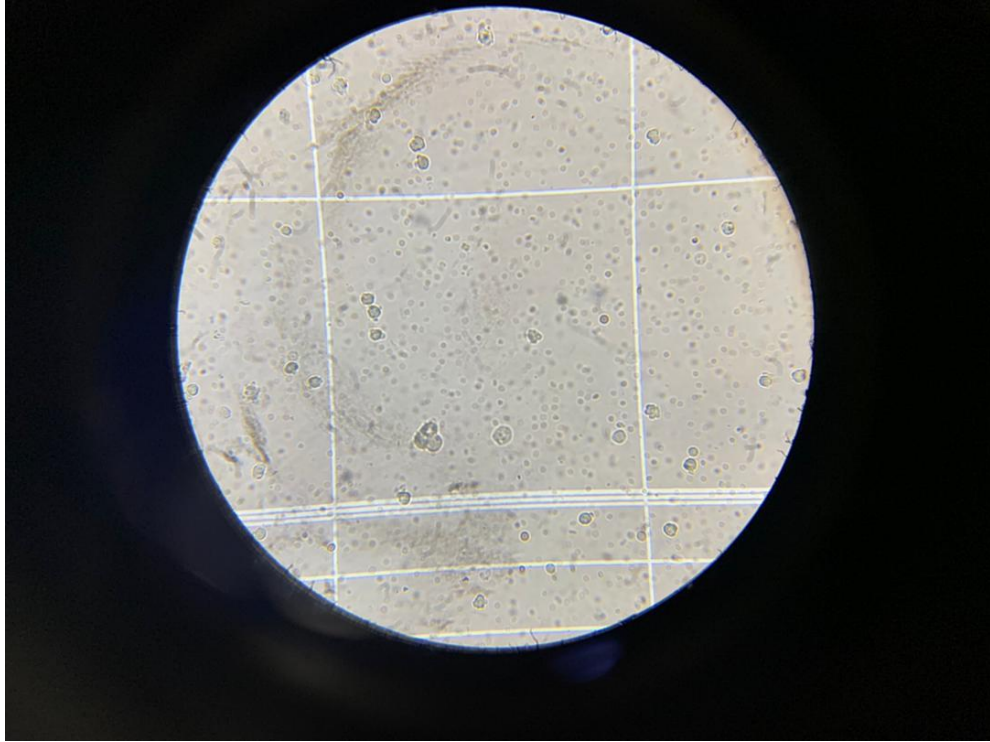
للوصول الى رؤية الخلايا الحبيبية تحت المجهر، كما هو موضح في الشكل رقم (19) والشكل رقم (20)

والشكل رقم (21) والشكل رقم (22)



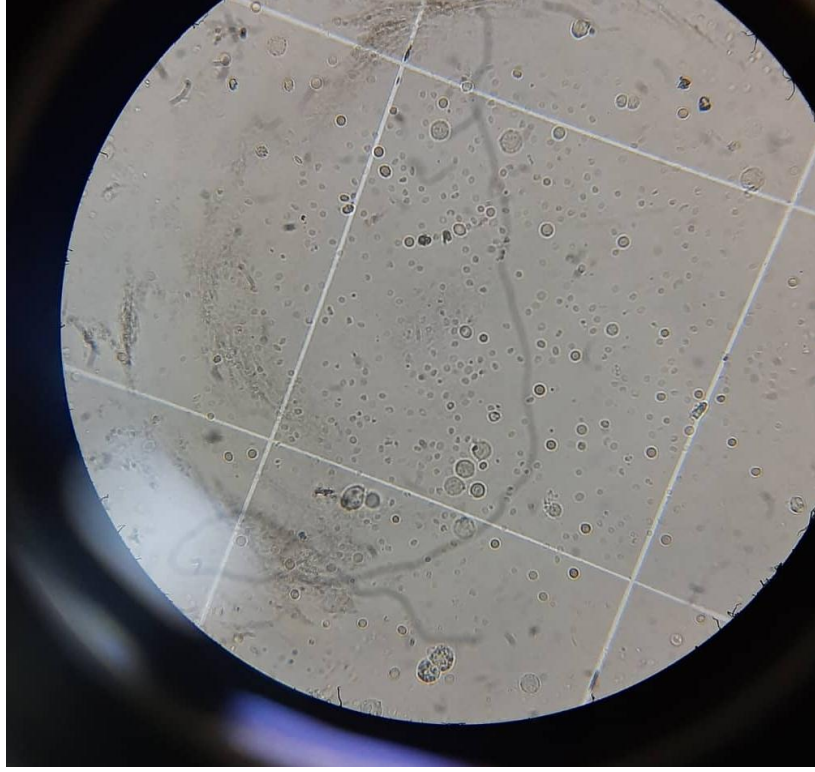
الشكل رقم (19) : الساحة المجهرية رقم (1)

يوضح الشكل الخلايا الحبيبية المعزولة بالمجهر متباين الأطوار X40 وذلك بعد أن تم عزلها مباشرة والتي توصلنا فيها إلى إمكانية عد الخلايا الحبيبية لـ 42 عينة في كل عينة نعد الساحات المجهرية الأربع على عذادة نيوباور.



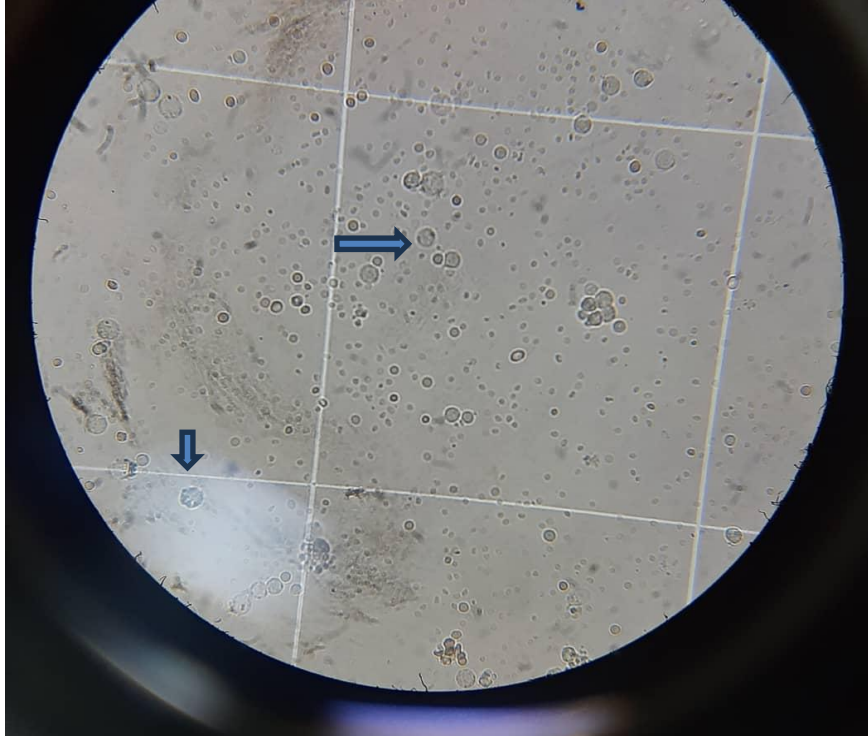
الشكل رقم (20) : الساحة المجهرية رقم (2)

يمثل الشكل أحد الساحات المجهرية التي تظهر الخلايا الحبيبية على التكبير X 40 بالابتعاد عن التجمعات نرى فيها عدد من الخلايا الحبيبية.



الشكل رقم (21): الساحة المجهرية رقم (3)

في الشكل يظهر لنا عدد كبير من الخلايا الحبيبية على التكبير 40X نستطيع تمييزها بوضوح عن الكريات البيضاء التي تبدو بحجم أصغر أمام تلك الخلايا والنواة منتظمة الشكل.



الشكل رقم (22): الساحة المجهرية رقم (4) بتكبير x40

في هذه المرحلة تم التركيز على التمييز بين الخلايا الحبيبية والكريات البيضاء لأنهما إلى حد كبير متشابهتان.

والفروق بين الخلايا الحبيبية والكريات البيضاء كالتالي:

- الخلايا الحبيبية في السائل الجريبي كبيرة مستديرة أكبر حجماً ذات أغشية مميزة فيها حبيبات داخلية مرئية تتركز في الغالب بالمركز وأجزاء وسطى وسفلية كما توجد أجسام دائرية صغيرة منتشرة ذات الانكسار العالي بجميع أنحاء الخلفية المرئية قد تكون قطع أثرية خلوية.

- الكريات البيضاء أصغر، مع نوى مميزة غالباً غير حبيبية.

هذه الفروقات تساعد في تمييز الخلايا تحت المجهر عند فحص العينات بشكل بصري. حيث أن للمفاويات تكون نواتها بشكل دائري مميز، أما الوحيدات من الكريات البيضاء نواتها تشبه الكلية.

كل هذه المواصفات الشكلية تم أخذها بعين الاعتبار لانتقاء أفضل الساحات المجهرية وعد الخلايا الحبيبية السليمة المنتظمة فيها.

2-4- نتائج المرحلتين الثانية والثالثة:

عزل Total RNA من الخلايا الحبيبية المستخلصة واصطناع cDNA:

كما هو موضح في الشكل رقم (23) أدناه:



الشكل رقم (23) : رحلان RNA على هلامية الآغاروز

كما هو واضح في نتيجة الرحلان الكهربائي لبعض عينات total RNA على هلامية الآغاروز 1% ظهور عصابات في كل بئر بوزن جزيئي منخفض تمثلان نوعي الرنا الريبوسومي rRNA وهما 28S و 18S وعدم ظهور عصابة في أعلى البئر بوزن جزيئي مرتفع تمثل الدنا الجينومي مما يؤكد نقاوة عينات RNA من الدنا الجينومي.

3-4- نتائج المرحلة الرابعة:

إجراء اختبار RT-qPCR:

بعد عزل RNA من الخلايا الحبيبية المعزولة من السائل الجريبي والتأكد من جودته واصطناع الـ cDNA تم إجراء اختبار كمي باستخدام التفاعل التسلسلي للبولىميراز في الزمن الحقيقي Real-Time-PCR Quantitative (RT-qPCR) للجين MT1 والجين المرجعي beta-Actin، ويوضح الشكل رقم (24) المخطط التمثيلي لبرنامج تفاعل RT-qPCR:



الشكل رقم (24) : مخطط تمثيلي لبرنامج تفاعل RT-qPCR

يبين الشكل أنه مقسم إلى ثلاث مراحل:

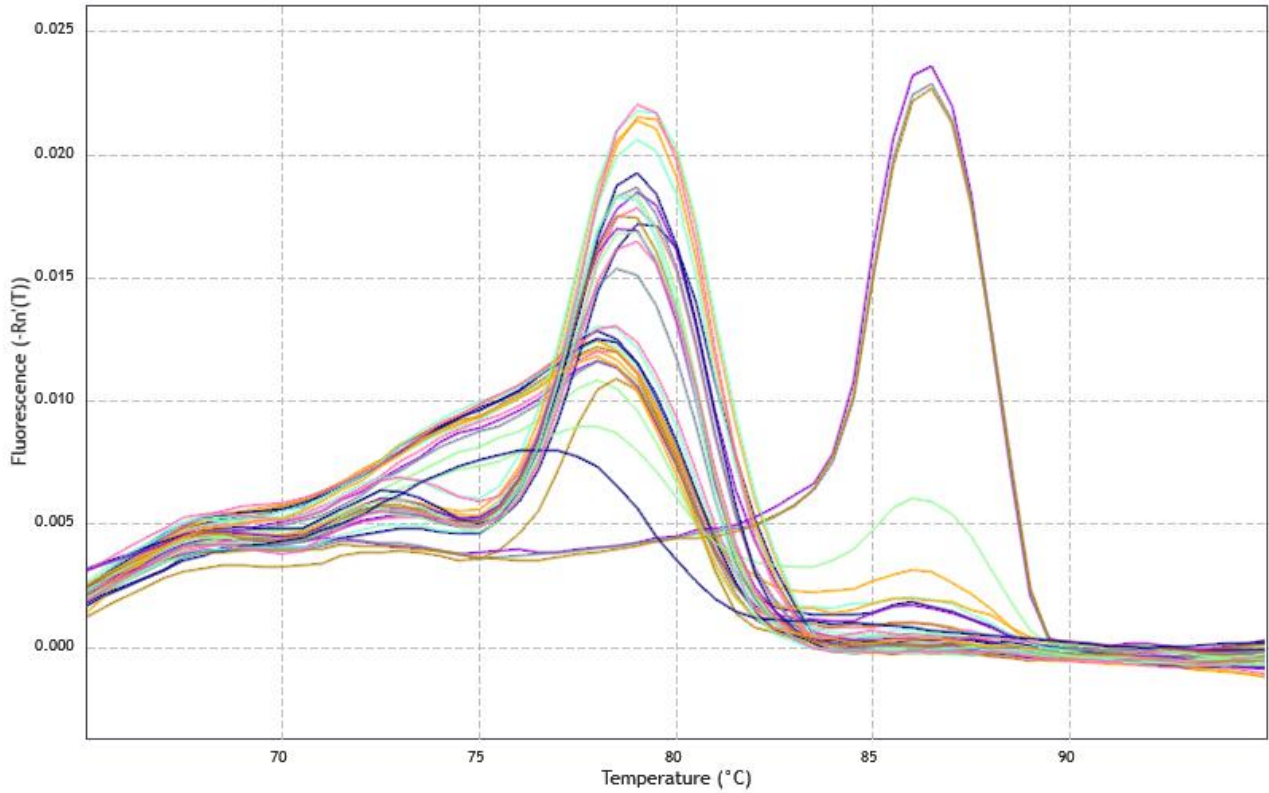
المرحلة الأولى الدنترة البدئية مدتها 3 دقائق بدرجة حرارة 95° درجة الهدف منها:

- تنشيط أنزيم البولىميراز مما يسمح له البدء بالتضخم عند وصوله إلى درجة الحرارة المناسبة
- تفكيك خيوط cDNA المزدوجة إلى مفردة

المرحلة الثانية التضخيم الأسى وتكرر 40 دورة وتتضمن كل دورة خطوتين وهما الدنترة Denaturation والتناسخ Annealing

المرحلة الثالثة قراءة الفلورة في نهاية كل دورة يقوم الجهاز بقياس شدة الفلورة المنبعثة من صبغة Syber green التي ترتبط بـ DNA مزدوج السلسلة وتتناسب شدة الإشارة الفلورية طردياً مع كمية المنتج المتضخم ويتم استخدامها لبناء منحنى التضخيم

Melt Raw Derivative Curve



الشكل رقم (26): مخطط الانصهار

يدل هذا المخطط على الارتباط النوعي للبراميرات أو البادئات على المواقع الهدفية للجين المدروس وهو مستقبل الميلاتونين حيث يحدث بارتباطهما تضخيم نوعي وحيد للجين المطلوب.

كل المنحنيات تتقاطع بإسقاطها على محور السينات عند درجة حرارة 78 درجة مئوية وهي درجة الحرارة التي فك فيها تشافع نصف الـ cDNA وقراءهم الجهاز كفلورة وتعد درجة الحرارة هذه هي درجة الانصهار t_m .

ثم تم اختبار المرئسات وأمثلة شروط التفاعل على عينات cDNA المصطنعة بواسطة RT-qPCR باستعمال (Quanti Tech SYBR Green PCR Kit, QIAGEN, Germany) حيث تم إعداد التفاعل بحجم نهائي للمزيج قدره 20 ميكروليتر وبكمية من عينة cDNA قدرها 50 نانو غرام.

وكانت مكونات التفاعل التسلسلي للبولىميراز الكمي RT-qPCR كالتالي:

- مزيج التفاعل مع صبغة Sybr Green 2x : 10 ميكروليتر
- DNA المتمم 50 نانو غرام /ميكروليتر : 1 ميكروليتر
- المرئسة المباشرة: 1ميكروليتر
- المرئسة العكسية: 1 ميكروليتر
- ماء مقطر معقم: 7 ميكروليتر

- الحجم الكلي 20 ميكروليتر

أما بالنسبة للمرئسات الهدفية والعكسية كانت كما في الشكل رقم (27) أدناه:

mouayad meriee					HO00219769	
Damascuse university-college of scince					Order Date :2023-03-14	
97009					Packing date :	
					Page :11/14	
Oligo	MTNR1A-F					
SEQ	5'-CTGGTCATCCTGTCGGGTATC-3' (22mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
55	6708.4	6716.7	6.6	30	0.05	62.6
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification		
300		MOPC				
				LOT No.		230314-0

Oligo	MTNR1A-R					
SEQ	5'-TCGACATCAGCACCAACGGGTA-3' (22mer)					
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm(c)
	calculated	measured	OD	nmol		
55	6713.4	6714	7.4	30	0.05	65.5
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification		
300		MOPC				
				LOT No.		230314

الشكل رقم (27) : المرئسات النوعية للجين الهدف

حصلنا فيها على النتائج الموضحة في الجدول رقم (4):

حيث ارتفعت فيها كمية التعبير النسبي (RQ) Relative Quantification في 15 عينة عن الواحد وهذا الارتفاع في بعض الحالات يثبت قابلية قياس MT1 جزئياً، لكنه لم يتحول إلى مؤشر مستقل لنتيجة الحمل. حيث تم حساب RQ بالمعادلة التالية:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{Reference gene}})_{\text{treated}} - (Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{Reference gene}})_{\text{control}}$$

الجدول رقم (4) : نتائج تحليل الـ RT-qPCR لعينات الـ cDNA (1-42)

RT-qPCR-Analysis of cDNA Samples (1-42)
Gene: MR (Melatonin Receptor)

Patient	sample (cDNA)		control (cDNA Human)		ΔCt sample	ΔCt control	$\Delta\Delta Ct$	RQ
	Ct mean MR	Ct Actine (reference gene)	Ct MR control	Ct Actine control				
1	20.36	18.71	23.36	20.15	1.65	3.21	-1.56	2.95
2	20.72	19.28	23.36	20.15	1.44	3.21	-1.77	3.41
3	25.14	21.07	23.36	20.15	4.07	3.21	0.86	0.55
4	25.49	21.07	23.36	20.15	4.42	3.21	1.21	0.43
5	25.27	19.6	23.36	20.15	5.67	3.21	2.46	0.18
6	25.38	11.13	23.36	20.15	14.25	3.21	11.04	0.00
7	25.08	12.87	23.36	20.15	12.21	3.21	9	0.00
8	25.46	18.53	23.36	20.15	6.93	3.21	3.72	0.08
9	24.78	11.02	23.36	20.15	13.76	3.21	10.55	0.00
10	25.63	12.35	23.36	20.15	13.28	3.21	10.07	0.00
11	25.1	19.34	23.36	20.15	5.76	3.21	2.55	0.17
12	25.55	20.94	23.36	20.15	4.61	3.21	1.4	0.38
13	25.37	21.06	23.36	20.15	4.31	3.21	1.1	0.47
14	25.29	21.25	23.36	20.15	4.04	3.21	0.83	0.56
15	25.07	21.39	23.36	20.15	3.68	3.21	0.47	0.72
16	26.2	19.69	23.36	20.15	6.51	3.21	3.3	0.10
17	25.34	12.19	23.36	20.15	13.15	3.21	9.94	0.00
18	24.91	21.68	23.36	20.15	3.23	3.21	0.02	0.99
19	25.78	21.13	23.36	20.15	4.65	3.21	1.44	0.37
20	22.86	20.16	23.36	20.15	2.7	3.21	-0.51	1.42
21	26.48	21.76	23.36	20.15	4.72	3.21	1.51	0.35
22	22.46	19.5	23.36	20.15	2.96	3.21	-0.25	1.19
23	23.29	19.93	23.36	20.15	3.36	3.21	0.15	0.90
24	22.62	19.93	23.36	20.15	2.69	3.21	-0.52	1.43
25	21.47	19.49	23.36	20.15	1.98	3.21	-1.23	2.35
26	21.99	20.2	23.36	20.15	1.79	3.21	-1.42	2.68
27	22.73	19.85	23.36	20.15	2.88	3.21	-0.33	1.26
28	23.28	20.34	23.36	20.15	2.94	3.21	-0.27	1.21
29	22.66	20.15	23.36	20.15	2.51	3.21	-0.7	1.62
30	23.21	20.77	23.36	20.15	2.44	3.21	-0.77	1.71
31	22.77	20.09	23.36	20.15	2.68	3.21	-0.53	1.44
32	22.92	20.62	23.36	20.15	2.3	3.21	-0.91	1.88
33	21.12	19.77	23.36	20.15	1.35	3.21	-1.86	3.63
34	25.05	21.28	23.36	20.15	3.77	3.21	0.56	0.68
35	24.77	20.8	23.36	20.15	3.97	3.21	0.76	0.59
36	25.03	21.11	23.36	20.15	3.92	3.21	0.71	0.61
37	25.1	11.63	23.36	20.15	13.47	3.21	10.26	0.00
38	24.96	12.35	23.36	20.15	12.61	3.21	9.4	0.00
39	24.75	10.59	23.36	20.15	14.16	3.21	10.95	0.00
40	24.97	18.64	23.36	20.15	6.33	3.21	3.12	0.12
41	23.98	20.05	23.36	20.15	3.93	3.21	0.72	0.61
42	25.15	22.8	23.36	20.15	2.35	3.21	-0.86	1.82

4-4- المعالجة الإحصائية المستخدمة:

تم استخدام الأساليب الإحصائية التالية، بالاعتماد على الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS) Package for the Social Sciences Statistical النسخة 25 لتحليل البيانات:

- الإحصاءات الوصفية: لمعرفة المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للمتغيرات الداخلة في الاختبارات بالإضافة للنسب المئوية والتكرارات للمتغيرات النوعية.
- اختبار التوزيع الطبيعي: عن طريق اختبار Shapiro-Wilk عندما يكون حجم العينات أصغر من 50، وذلك لمعرفة الاختبارات الأنسب للدراسة.
- اختبار الفرق: عن طريق اختبار Mann Whitney البديل اللاوسيطي لاختبار Independent T-Test، ويستخدم لدراسة الفرق من مجموعتين في متغيرات الدراسة.
- اختبار الارتباط: عن طريق اختبار Spearman البديل اللاوسيطي لاختبار Person، لدراسة الارتباط بين متغيرين كميين.
- الحساسية والنوعية: عن طريق منحنى ROC Curve.

4-5- الإحصاءات الوصفية:

في هذا القسم سيتم وصف عبارات الدراسة من خلال عرض النسب المئوية والتكرارات والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري.

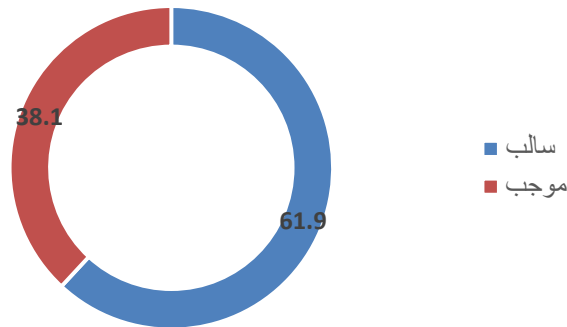
يبين الجدول التالي توزيع العينة تبعاً لنتيجة الحمل:

الجدول رقم (5): وصف عينة الدراسة حسب نتيجة الحمل

النسبة %	العدد	البيان	
61.9	26	سلبي	نتيجة الحمل
38.1	16	ايجابي	
100	42	المجموع الكلي	

يتبين مما سبق أن 61.9% من المريضات نتيجة حملهن سلبية، ويقابلها 38.1% نتيجة حملهن ايجابية.

يبين الرسم البياني التالي -الشكل رقم (28)- النسب المئوية لتوزع العينة تبعاً لنتيجة الحمل:



الشكل رقم (28): النسب المئوية لتوزع عينة الدراسة حسب نتيجة الحمل

يبين الجدول التالي الإحصاءات الوصفية للمتغيرات الكمية:

الجدول رقم (6): الإحصاء الوصفي للمتغيرات الكمية*

البيانات	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
العمر	18	38	28.95	5.712
عدد الخلايا بالمل	182500	2337500	975357.14	548847.343
كمية الميلاتونين بالدم	0	340	45.93	57.548
كمية الميلاتونين بالسائل الجريبي	10	184	65.79	42.415
RQ (كمية المستقبل mt1)	0.00	3.63	0.9250	0.97025
جودة البويضات حسب العدد M1+M2	0	42	12.74	9.490
M1 (الانقسام الميوزي الأول)	0	15	3.45	2.940
M2 (الانقسام الميوزي الثاني)	0	32	9.29	7.124
بيوض غير ناضجة GV	0	11	2.67	2.675
بيوض تالفة ATRETIC	0	16	0.81	2.587
عدد الأجنة	0	7	3.69	1.994

***ملاحظة:** يمكن الاطلاع على تفاصيل البيانات الكمية من مراجعة جدول الإحصاء الكمي في الملحق رقم (3)

تظهر نتائج الجدول السابق أن أعمار أفراد العينة تراوحت بين 18 و 38 عاماً، بمتوسط قدره 28 عاماً، كما أن الحد الأدنى لعدد الخلايا 182500 خلية بالمل، و 2337500 خلية بالمل كحد أعلى، بمتوسط مقداره 975357.14، وتراوحت نسبة الميلاتونين بالدم بين 0 و 340، بمتوسط حسابي قيمته 45.93، أما نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي تراوحت بين 10 و 184، بمتوسط قيمته 65.79، و تراوحت قيم RQ بين 0.00 و 3.63، بمعدل 0.9250، أما جودة البويضات حسب العدد (M1+M2) تراوحت بين 0 و 42 بمعدل قدره 12 بويضة، أما جودة البويضات حسب العدد (M1) تراوحت بين 0 و 15 بمعدل 3 بويضات، وكذلك جودة البويضات حسب العدد (M2) تراوحت بين 0 و 32 بمعدل 9 بويضات، أما بالنسبة لأعداد البيوض الغير ناضجة فقد تراوح عددها بين 0 و 11 بمتوسط قدره 2، وأعداد البيوض التالفة تراوح بين 0 و 16 بمتوسط حسابي قيمته 0.81، أما عدد الأجنة فقد تراوح بين 0 و 7 بمتوسط 3 أجنة.

4-6- دراسة خضوع متغيرات الدراسة الكمية للتوزيع الطبيعي:

في هذا القسم سيتم دراسة طبيعية المتغيرات الكمية وذلك وفق اختبار Shapiro-wilk (حجم عينة الدراسة أصغر من 50) وذلك لمعرفة الاختبارات الأنسب للدراسة، وتبين النتائج المدرجة في الجدول رقم (7) أدناه، أنه ليس جميع المتغيرات الكمية تتبع التوزيع الطبيعي، فإن أكثر قيم p-value أصغر من قيمة مستوى الدلالة 0.05، وعليه فإنه لا يمكن استعمال الاختبارات الوسيطية وسيتم الاستعاضة عنها ببديلاتها الاوسيطية.

الجدول رقم (7): دراسة طبيعية متغيرات الدراسة الكمية

البيان	الإحصائية	درجة الحرية	P-value
العمر	0.963	42	0.189
عدد الخلايا بالمل	0.955	42	0.097
نسبة الميلاتونين بالدم	0.617	42	0.000
نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي	0.857	42	0.000
RQ	0.853	42	0.000
جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)	0.911	42	0.003
M1	0.849	42	0.000

M2	0.921	42	0.007
----	-------	----	-------

تتمة الجدول رقم (8) : دراسة طبيعية متغيرات الدراسة الكمية

البيان	الإحصائية	درجة الحرية	P-value
بيوض غير ناضجة GV	0.873	42	0.000
بيوض تالفة ATRETIC	0.342	42	0.000
عدد الأجنة	0.918	42	0.005

4-7- دراسة ارتباط متغيرات الدراسة مع نتيجة الحمل (سليبي، ايجابي):

في هذا القسم سيتم دراسة الفروق بين متغيرات الدراسة الكمية وذلك في نتيجة الحمل (سليبي، ايجابي) ، وبناءً على ما يظهر من نتائج سيتم تقييم وجود علاقة بين هذه المتغيرات ونتيجة الحمل، ولإتمام ذلك استخدم الباحث اختبار Mann whitney البديل اللاتوسيطي لاختبار Independent T-test، والجدول رقم (9) التالي يظهر نتائج الاختبار.

الجدول رقم (9) : نتائج اختبار الفرق بين المتغيرات الكمية وفقاً لمتغير نتيجة الحمل

البيان	N	المتوسط	متوسط الرتب	احصائية الاختبار	P-value
العمر	سليبي	26	28.54	20.69	0.586
	ايجابي	16	29.62	22.81	
عدد الخلايا بالمل	سليبي	26	955000	20.81	0.641
	ايجابي	16	1008437.50	22.63	
نسبة الميلاتونين بالدم	سليبي	26	35.77	19.60	0.199
	ايجابي	16	62.44	24.59	
نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي	سليبي	26	60.04	21.17	0.826
	ايجابي	16	75.12	22.03	
RQ	سليبي	26	0.9162	22.46	0.517
	ايجابي	16	0.9393	19.94	
جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)	سليبي	26	12.04	20.50	0.500
	ايجابي	16	13.88	23.13	
M1	سليبي	26	3.42	21.04	0.754
	ايجابي	16	3.50	22.25	
M2	سليبي	26	8.62	20.60	0.542

		22.97	10.38	16	ايجابي	
--	--	-------	-------	----	--------	--

تتمة الجدول رقم (10): نتائج اختبار الفرق بين المتغيرات الكمية وفقاً لمتغير نتيجة الحمل

P-value	احصائية الاختبار	متوسط الرتب	المتوسط	N	البيان	
0.437	178.500	20.37	2.27	26	سلبي	بيوض غير ناضجة GV
		23.34	3.31	16	ايجابي	
0.080	157.500	19.56	0.73	26	سلبي	بيوض تالفة ATRETIC
		24.66	0.94	16	ايجابي	
0.391	175.500	20.25	3.50	26	سلبي	عدد الأجنة
		23.53	4.00	16	ايجابي	

تشير نتائج الجدول رقم (9) السابق إلى عدم وجود فروق معنوية في متغيرات الدراسة الكمية (العمر، عدد الخلايا بالمل، نسبة الميلاتونين بالدم، نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي، RQ، جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، بيوض غير ناضجة GV، بيوض تالفة ATRETIC، عدد الأجنة) وفقاً لنتيجة الحمل، حيث قيمة p-value أكبر من قيمة مستوى الدلالة 0.05 لجميع المتغيرات، وعليه فإنه لا يوجد علاقة بين المتغيرات الكمية (العمر، عدد الخلايا بالمل، نسبة الميلاتونين بالدم، نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي، RQ، جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، بيوض غير ناضجة GV، بيوض تالفة ATRETIC، عدد الأجنة) ونتيجة الحمل.

8-4- دراسة الارتباط بين متغيرات الدراسة الكمية:

في هذا القسم تمت دراسة ارتباط متغيرات الدراسة الكمية بعضها ببعض، ومن أجل ذلك تم استخدام اختبار Spearman البديل اللاتوسيطي لاختبار person، الجدول رقم (11) في الصفحة التالية يبين نتائج الارتباط:

الجدول رقم (11): دراسة العلاقة بين المتغيرات الكمية

البيان	العمر	عدد الخلايا بالمل	نسبة الميلاتونين بالدم	نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي	RQ	جودة البويضات حسب العدد M1+M2	M1	2M	بيوض غير ناضجة GV	بيوض تالفة ATRETIC	عدد الأجنة
العمر	قيمة معامل الارتباط	1.000	-0.182	-0.269	-0.207	-0.044	-0.132	-0.325*	-0.072	-0.013	-0.268
	P-value	.	0.250	0.085	0.783	0.057	.4040	0.036	0.649	0.934	0.086
عدد الخلايا بالمل	قيمة معامل الارتباط	1.000	0.026	0.264	0.369*	0.036	0.083	0.013	0.002	-0.024	-0.152
	P-value	.		0.868	0.091	0.822	0.602	0.937	0.989	0.878	0.337
نسبة الميلاتونين بالدم	قيمة معامل الارتباط		1.000	0.259	-0.155	0.201	0.031	0.214	-0.067	0.163	0.196
	P-value		.		0.098	0.201	0.846	0.173	0.673	0.304	0.214
نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي	قيمة معامل الارتباط			1.000	-0.156	0.216	0.227	0.193	0.216	0.015	0.345*
	P-value			.	0.323	0.169	0.149	0.220	0.170	0.926	0.025
RQ	قيمة معامل الارتباط				1.000	-0.135	-0.137	-0.104	-0.229	-0.138	-0.178
	P-value				.	0.395	0.386	0.510	0.144	0.384	0.259
جودة البويضات حسب العدد M1+M2	قيمة معامل الارتباط					1.000	0.802**	0.970**	0.616**	0.125	0.593**
	P-value					.	0.000	0.000	0.000	0.430	0.000

تتمة الجدول رقم (12): دراسة العلاقة بين المتغيرات الكمية

البيان	العمر	عدد الخلايا بالمل	نسبة الميلاتونين بالدم	نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي	RQ	جودة البويضات حسب العدد M1+M2	M1	2M	بيوض غير ناضجة GV	بيوض تالفة ATRETIC	عدد الأجنة
M1	قيمة معامل الارتباط						1.000	0.656**	0.5568**	0.008	0.309*
	P-value						.	0.000	0.000	0.960	0.046
2M	قيمة معامل الارتباط							1.000	0.588**	0.186	0.620**
	P-value							.	0.000	0.239	0.000
بيوض غير ناضجة GV	قيمة معامل الارتباط								1.000	0.133	0.446**
	P-value								.	0.403	0.003
بيوض تالفة ATRETIC	قيمة معامل الارتباط									1.000	-0.014
	P-value									.	0.932
عدد الأجنة	قيمة معامل الارتباط										1.000
	P-value						.				
*. دال عند 0.05 **. دال عند 0.01											

تشير نتائج الجدول السابق إلى:

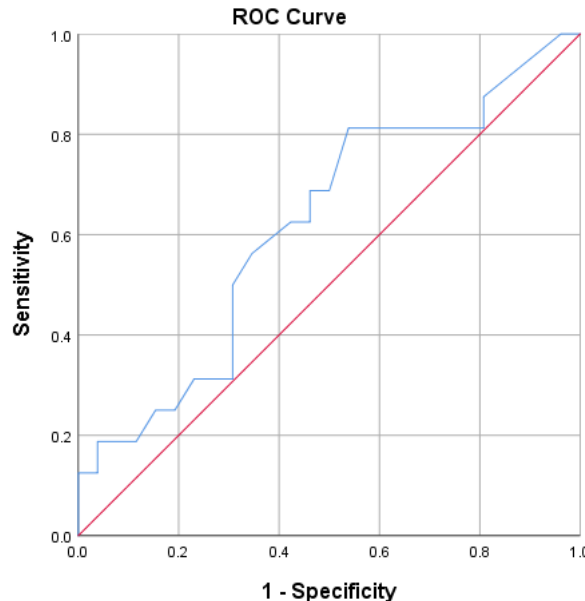
- لا توجد علاقة بين العمر والمتغيرات (عدد الخلايا بالمل، نسبة الميلاتونين بالدم، نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي، RQ، جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، عدد البيوض غير الناضجة GV، عدد البيوض التالفة ATRETIC، عدد الأجنة)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة عكسية حقيقية ضعيفة بين عمر المريضة وجودة البويضات حسب العدد M2، وقيمة معامل هذا الارتباط -0.325، وكانت قيمة p-value أقل من مستوى الدلالة 0.05.
- لا توجد علاقة بين عدد الخلايا والمتغيرات (نسبة الميلاتونين بالدم، نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي، جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، عدد البيوض غير الناضجة GV، عدد البيوض التالفة ATRETIC، عدد الأجنة)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية ضعيفة بين عدد الخلايا و RQ، وقيمة معامل هذا الارتباط 0.369، وكانت قيمة p-value المقابلة أصغر من مستوى الدلالة 0.05.
- لا توجد علاقة بين نسبة الميلاتونين بالدم والمتغيرات (نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي، RQ، جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، عدد البيوض غير الناضجة GV، عدد البيوض التالفة ATRETIC، عدد الأجنة)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.
- لا توجد علاقة بين نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي والمتغيرات (RQ، جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، عدد البيوض غير الناضجة GV، عدد البيوض التالفة ATRETIC)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية ضعيفة بين نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي وعدد الأجنة، وقيمة معامل هذا الارتباط 0.345، وكانت قيمة p-value المقابلة أصغر من مستوى الدلالة 0.05.
- لا توجد علاقة بين RQ والمتغيرات (جودة البويضات حسب العدد (M1+M2)، M1، M2، عدد البيوض غير الناضجة GV، عدد البيوض التالفة ATRETIC)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.
- لا توجد علاقة بين جودة البويضات حسب العدد (M1+M2) وعدد البيوض التالفة ATRETIC، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية قوية بين جودة البويضات حسب العدد (M1+M2) و M1 و M2، معاملات الارتباط 0.802 و 0.970 على الترتيب، وقيمة p-value المقابلة أصغر من مستوى الدلالة 0.05.

- توجد علاقة طردية حقيقية متوسطة بين جودة البويضات حسب العدد (M1+M2) وعدد البويض غير الناضجة و عدد الأجنة، معاملات الارتباط 0.616 و 0.593 على الترتيب، وقيمة p-value المقابلة أصغر من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية متوسطة بين M1 و M2 وعدد البويض غير الناضجة، معاملات الارتباط 0.656 و 0.5568 على الترتيب، وقيمة p-value المقابلة أصغر من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية ضعيفة بين M1 وعدد الأجنة، قيمة معامل الارتباط 0.309 ، وقيمة p-value المقابلة أقل من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية متوسطة بين M2 وعدد البويض غير الناضجة وعدد الأجنة، قيمة معاملات الارتباط 0.588 و 0.620 على الترتيب، وقيمة p-value المقابلة أقل من مستوى الدلالة 0.05.
- توجد علاقة طردية حقيقية ضعيفة بين عدد البويض غير الناضجة وعدد الأجنة، قيمة معامل الارتباط 0.446، وقيمة p-value المقابلة أقل من مستوى الدلالة 0.05.
- لا توجد علاقة حقيقية بين عدد البويض التالفة وعدد الأجنة، حيث قيمة p-value أكبر من 0.05 قيمة مستوى الدلالة.

9-4- تحليل الحساسية والنوعية باستخدام منحنى ROC Curve:

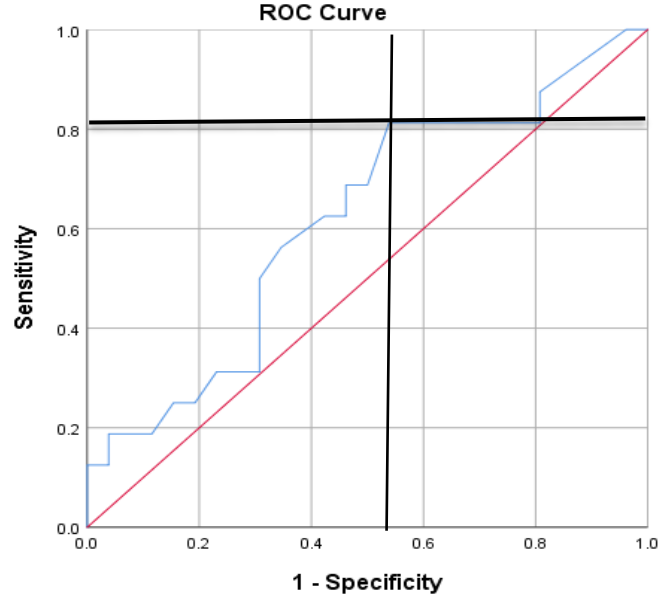
1-9-4. تحليل حساسية ونوعية نسبة الميلاتونين بالدم ونتيجة الحمل:

في هذا القسم تم تحليل حساسية (نتيجة الحمل ايجابية) والنوعية (نتيجة الحمل سلبية) باستخدام منحنى ROC Curve، فمنحنى ROC يأخذ الحساسية على المحور y ويأخذ 1-النوعية على المحور x.



الشكل رقم (29): منحنى ROC لقيم كمية الميلاتونين في الدم والذي يمثل الحساسية على المحور العمودي و تتم النوعية على المحور الأفقي حسب متغير نتيجة الحمل

نقوم بتحديد النقطة الأقرب من الزاوية اليسارية العلوية لتكون نقطة القطع Cut-Off والتي تمثل القيمة الأكثر احتمالية التي تفصل بين نتيجتي الحمل الايجابية والسلبية ويمكن تحديدها على المخطط والتي تحمل الأبعاد على مقياس الحساسية 0.813 وعلى مقياس متمم النوعية 0.538 وتحدد كما في الشكل رقم (30):



الشكل رقم (30): منحنى ROC لقيم كمية الميلاتونين في الدم حسب متغير نتيجة الحمل مع تحديد النقطة أفضل نقطة قطع

يبين الجدول رقم (13) التالي المساحة تحت المنحنى:

الجدول رقم (13): المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المعنوية حسب متغير نتيجة الحمل وفق نسبة الميلاتونين بالدم

Area Under the Curve				
Test Result Variable(s): نسبة الميلاتونين بالدم				
Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0.619	0.090	0.200	0.442	0.796
Under the nonparametric assumption				
Null hypothesis: true area = 0.5				

يبين الجدول رقم (13) السابق أن منحنى ROC ليس ذو دلالة معنوية لأن قيمة معنوية الاختبار أكبر من مستوى الدلالة 0.05، ويتبين أن منحنى ROC سيء الأهمية لأن قيمة المساحة تحت المنحنى 61.9% ولهذا لا يمكن الأخذ بنتائجه.

الجدول رقم (14): قيم الحساسية ومتمم النوعية لنسبة الميلاتونين في الدم وفق نتيجة الحمل (سلبى، ايجابى)

Coordinates of the Curve		
Test Result Variable(s): نسبة الميلاتونين بالدم		
Positive if Greater Than or Equal To a	Sensitivity	1 – Specificity
-1.00	1.000	1.000
4.00	1.000	0.962
9.00	0.938	0.885
11.00	0.875	0.808
13.00	0.813	0.808
16.00	0.813	0.692
19.00	0.813	0.577
21.00	0.813	0.538
23.00	0.688	0.500
25.50	0.688	0.462
27.50	0.625	0.462
29.00	0.625	0.423
31.00	0.563	0.346
34.00	0.500	0.308
37.00	0.438	0.308
43.00	0.313	0.308
50.00	0.313	0.269
55.00	0.313	0.231
61.00	0.250	0.192
73.00	0.250	0.154
84.00	0.188	0.115
87.00	0.188	0.077
91.00	0.188	0.038
114.00	0.125	0.038
142.00	0.125	0.000
245.00	0.063	0.000
341.00	0.000	0.000
The test result variable(s): نسبة الميلاتونين بالدم has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.		
a. The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.		

من الجدول رقم (14) أعلاه نختار قيمة نسبة الميلاتونين بالدم 21.00 لأنها تحقق الحساسية والنوعية الأفضل حسب القيم المبينة بالرسم.

وعليه فإننا نستطيع القول بأن المريضات ممن تزيد لديهن نسبة الميلاتونين في الدم عن 21.00 لديهن احتمالية أكبر بأن تكون نتيجة حملهن ايجابية، وفي حال كانت نسبة الميلاتونين بالدم لديهن تقل عن 21.00 فالاحتمال الأكبر أن تكون نتيجة حملهن سلبية.

يبين الجدول رقم (15) التقاطع التالي:

الجدول رقم (15) : توزع نتيجة الحمل وفق أفضل نقطة قطع لنسبة الميلاتونين بالدم

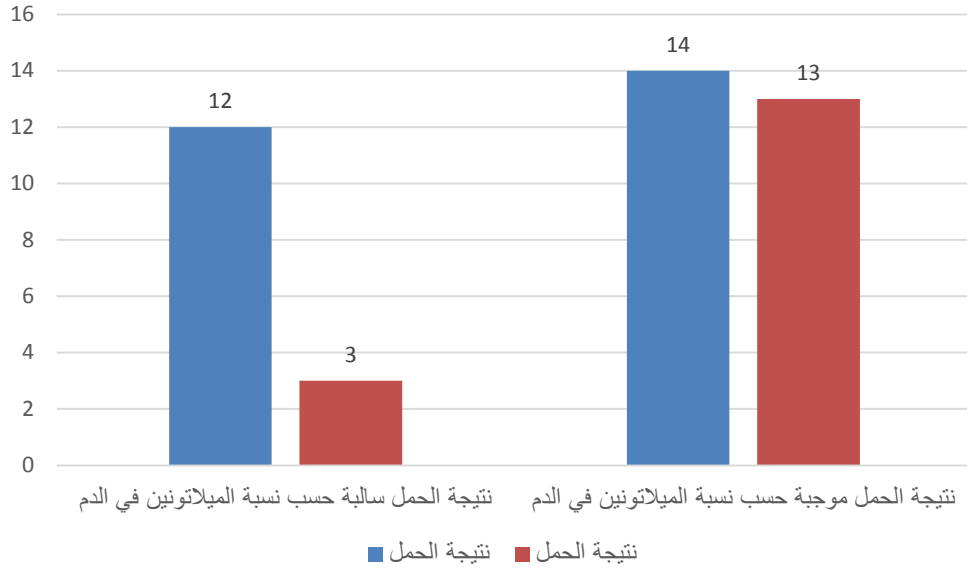
نتيجة الحمل وفق أفضل نقطة قطع لمتغير نسبة الميلاتونين في الدم	نتيجة الحمل		المجموع
	سلبية	ايجابي	
نتيجة الحمل سلبية	12	3	15
نتيجة الحمل ايجابي	14	13	27
المجموع	26	16	42
Cut-Off :نقطة القطع 21.00			
Chi Square P-value :قيمة مربع الاحتمالية > 0.05			
Odd Ratio (OR) Value :نسبة الارجحية 3.714 , (0.815 to 16.207) 95 %			
Relative Risk (RR) Value :نسبة الثقة 1.543, (0.991 to 2.403) 95 %			

تبين نتائج الجدول رقم (15) أعلاه أن 15 مريضة تم تشخيص نتيجة حملهن بأنها سلبية وفق نقطة القطع 21.00 لقيم نسبة الميلاتونين بالدم، منها 12 حالة سلبية حقيقية و 3 حالات سلبية كاذبة، و 27 حالة شخصت فيها نتيجة الحمل بأنها ايجابية، منها 13 حالة ايجابية حقيقية و 14 حالة ايجابية كاذبة.

وبتبين أنه لا يوجد علاقة بين نسبة الميلاتونين في الدم ونتيجة الحمل (ايجابي، سلبية)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.

وتبين أن نسبة الأرجحية بلغت 3.714 مما يعني أنه بزيادة نسبة الميلاتونين بالدم عن نقطة القطع 21.00 تزيد احتمالية أن تكون نتيجة الحمل ايجابية، كما بلغت قيمة نسبة معامل الخطر النسبي 1.543 أي أنه بزيادة نسبة الميلاتونين في دم المريضة عن 21.00 فإنها تصبح أكثر عرضة لأن تكون نتيجة حملها ايجابية بنسبة 1.543 زيادة عن كون نسبة الميلاتونين أقل من 21.00.

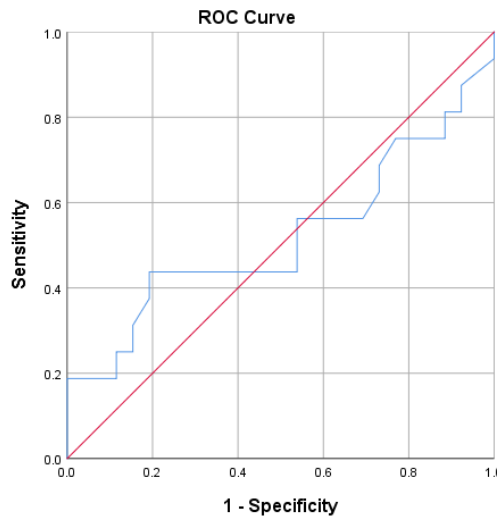
يبين الشكل رقم (31) التالي توزيع نتيجة الحمل حسب نسبة الميلاتونين في الدم وفق أفضل نقطة قطع:



الشكل رقم (31): توزيع نتيجة الحمل حسب نسبة الميلاتونين في الدم

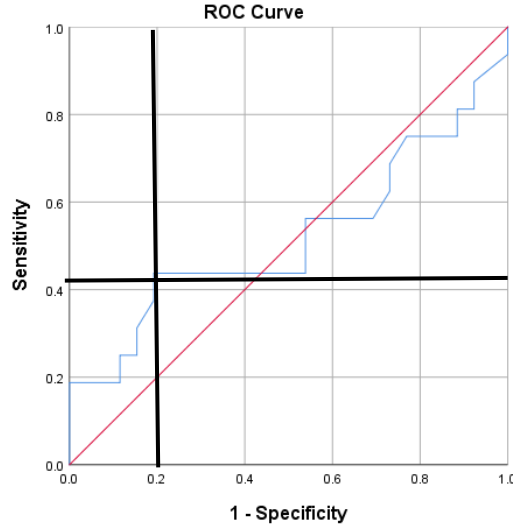
2-9-4. تحليل حساسية ونوعية كمية الميلاتونين بالسائل الجريبي ونتيجة الحمل:

في هذا القسم سيتم تحليل حساسية (نتيجة الحمل ايجابية) والنوعية (نتيجة الحمل سلبية) باستخدام منحنى ROC Curve، فمنحنى ROC يأخذ الحساسية على المحور العمودي ويأخذ 1-النوعية على المحور الأفقي



الشكل رقم (32): منحنى ROC لقيم نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي والذي يمثل الحساسية على المحور العمودي ومتمم النوعية على المحور الأفقي حسب متغير نتيجة الحمل

نقوم بتحديد النقطة الأقرب من الزاوية اليسارية العلوية لتكون نقطة القطع Cut-Off والتي تمثل القيمة الأكثر احتمالية التي تفصل بين نتيجتي الحمل الايجابية والسلبية ويمكن تحديدها على المخطط والتي تحمل الأبعاد على مقياس الحساسية 0.438 وعلى مقياس متمم النوعية 0.192 وتكون وفق الشكل رقم (33) التالي:



الشكل رقم (33) : منحنى ROC لقيم نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي حسب متغير نتيجة الحمل مع تحديد النقطة أفضل نقطة قطع

يبين الجدول رقم (16) التالي المساحة تحت المنحنى:

الجدول رقم (16) : المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المعنوية حسب نتيجة الحمل وفق نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي

Area Under the Curve				
Test Result Variable(s): نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي				
Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0.520	0.101	0.826	0.322	0.719
Under the nonparametric assumption				
Null hypothesis: true area = 0.5				

يبين الجدول السابق أن منحنى ROC ليس ذو دلالة معنوية لأن قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05، ويتبين أن منحنى ROC سيء الأهمية لأن قيمة المساحة تحت المنحنى 52.2%.

الجدول رقم (17): قيم الحساسية ومتم النوعية لنسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي وفق نتيجة الحمل (سلبي، ايجابي)

Coordinates of the Curve		
Test Result Variable(s): نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي		
Positive if Greater Than or Equal To a	Sensitivity	1 – Specificity
9.00	1.000	1.000
14.00	0.938	1.000
20.50	0.875	0.923
23.50	0.813	0.923
24.50	0.813	0.885
26.50	0.750	0.885
29.00	0.750	0.808
32.00	0.750	0.769
40.00	0.688	0.731
48.00	0.625	0.731
51.00	0.563	0.692
52.50	0.563	0.615
53.50	0.563	0.577
56.00	0.563	0.538
59.00	0.500	0.538
61.00	0.438	0.538
63.00	0.438	0.500
65.00	0.438	0.423
68.00	0.438	0.346
71.00	0.438	0.308
73.00	0.438	0.231
75.00	0.438	0.192
78.00	0.375	0.192
82.00	0.313	0.154
85.00	0.250	0.154
88.00	0.250	0.115
97.00	0.188	0.115
105.00	0.188	0.077
120.00	0.188	0.038
158.00	0.188	0.000
183.00	0.063	0.000
185.00	0.000	0.000
The test result variable(s): نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group.		
The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.		

من الجدول رقم (15) السابق نختار قيمة نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي 75.00 لأنها تحقق الحساسية والنوعية الأفضل حسب القيم المبينة بالرسم.

وعليه فإننا نستطيع القول بأن المريضات ممن تزيد لديهن نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي عن 75.00 لديهن احتمالية أكبر بأن تكون نتيجة حملهن ايجابية، وفي حال كانت نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي لديهن تقل عن 75.00 فلاحتمال الأكبر أن تكون نتيجة حملهن سلبية.

يبين الجدول رقم (18) التقاطع التالي:

الجدول رقم (18) : توزع نتيجة الحمل بين المشاهد والمتوقع وفق أفضل نقطة قطع لنسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي

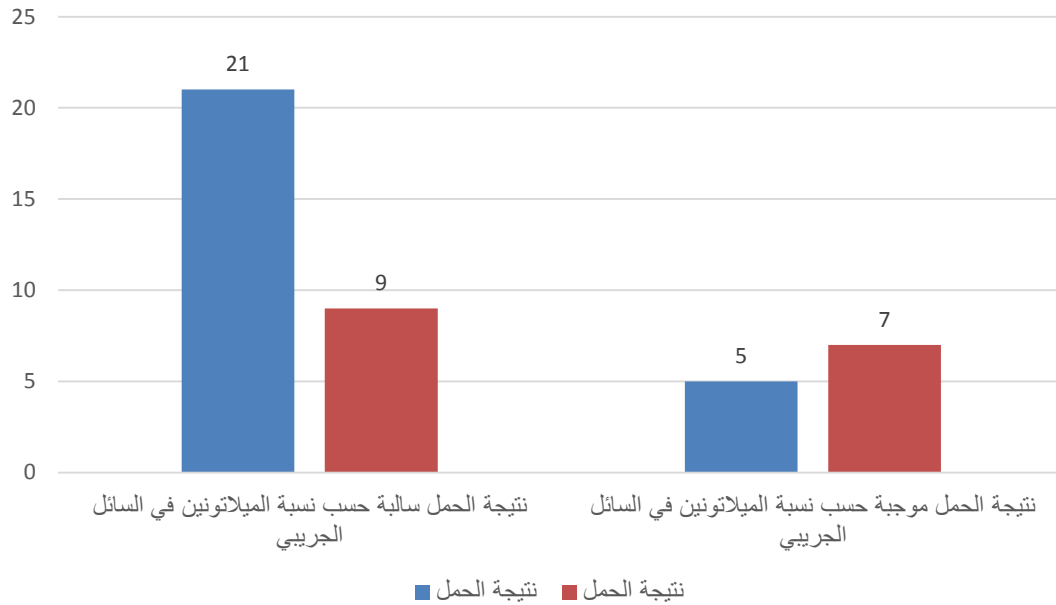
نتيجة الحمل وفق أفضل نقطة قطع لمتغير نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي	نتيجة الحمل		المجموع
	سلبية	ايجابي	
نتيجة الحمل سلبية	21	9	30
نتيجة الحمل ايجابي	5	7	12
المجموع	26	16	42
Cut-Off: 75.00			
Chi Square P-value: > 0.05			
Odd Ratio (OR) Value & 95% 3.267 , (0.815 to 13.090)			
Relative Risk (RR) Value & 95% 1.680, (0.827 to 3.415)			

تبين نتائج الجدول رقم (18) السابق أن 30 مريضة تم تشخيص نتيجة حملهن بأنها سلبية وفق نقطة القطع 75.00 لقيم نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي، منها 21 حالة سلبية صحيحة و 9 حالات سلبية كاذبة، و 12 حالة شخّصت فيها نتيجة الحمل بأنها ايجابية، منها 7 حالات ايجابية صحيحة و 5 حالات ايجابية كاذبة.

وبتبيين أنه لا يوجد علاقة بين نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي ونتيجة الحمل (ايجابي، سلبية)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.

وتبين أن نسبة الأرجحية بلغت 3.267، مما يعني أنه بزيادة نسبة الميلاتونين بالسائل الجريبي عن نقطة القطع 75.00 تزيد احتمالية أن تكون نتيجة الحمل ايجابية، كما بلغت قيمة نسبة معامل الخطر النسبي 1.680 أي أنه بزيادة نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي لدى المريضة عن 75.00 فإنها تصبح أكثر عرضة لأن تكون نتيجة حملها ايجابية بنسبة 1.680 زيادة عن كون نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي أقل من 75.00.

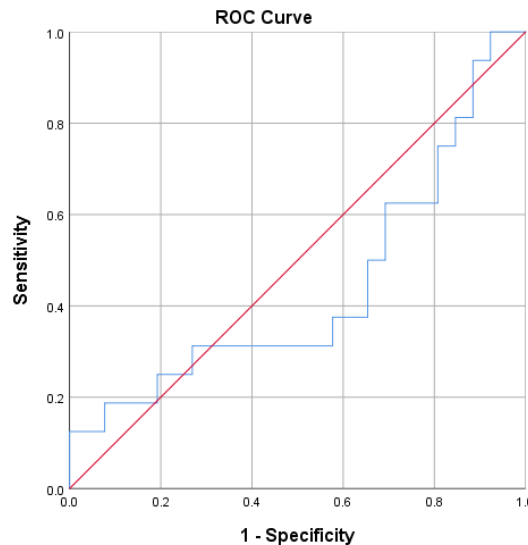
يبين الشكل رقم (34) التالي توزيع نتيجة الحمل حسب نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي وفق أفضل نقطة قطع:



الشكل رقم (34): توزيع نتيجة الحمل حسب نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي

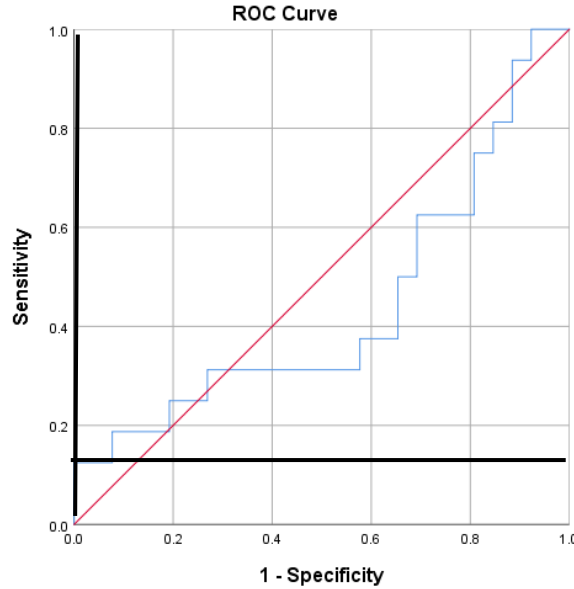
3-9-4. تحليل حساسية ونوعية RQ ونتيجة الحمل:

في هذا القسم سيتم تحليل حساسية (نتيجة الحمل ايجابية) والنوعية (نتيجة الحمل سلبية) باستخدام منحنى ROC Curve، فمنحنى ROC يأخذ الحساسية على المحور العمودي ويأخذ 1-النوعية على المحور



الشكل رقم (35): منحنى ROC لقيم RQ والذي يمثل الحساسية على المحور العمودي وتمتم النوعية على المحور الأفقي حسب متغير نتيجة الحمل

نقوم بتحديد النقطة الأقرب من الزاوية اليسارية العلوية لتكون نقطة القطع Cut-Off والتي تمثل القيمة الأكثر احتمالية التي تفصل بين نتيجتي الحمل الايجابية والسلبية ويمكن تحديدها على المخطط والتي تحمل الأبعاد على مقياس الحساسية 0.125 وعلى مقياس متمم النوعية 0.000 وتكون وفق الشكل رقم (36) التالي:



الشكل رقم (36) : منحنى ROC لقيم RQ حسب متغير نتيجة الحمل مع تحديد النقطة أفضل نقطة قطع

يبين الجدول رقم (19) التالي المساحة تحت المنحنى:

الجدول رقم (19) : المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المعنوية حسب متغير نتيجة الحمل وفق RQ

Area Under the Curve				
Test Result Variable(s): RQ				
Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0.440	0.097	0.517	0.250	0.630
Under the nonparametric assumption				
Null hypothesis: true area = 0.5				

يبين الجدول رقم (19) أعلاه أن منحنى ROC ليس ذو دلالة معنوية لأن قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05، ويتبين أن منحنى ROC سيء الأهمية لأن قيمة المساحة تحت المنحنى 10.7% ولهذا لا يمكن الأخذ بنتائجه.

الجدول رقم (20) : قيم الحساسية ومتمم النوعية لـ RQ وفق نتيجة الحمل (سلبى، ايجابى)

Coordinates of the Curve		
Test Result Variable(s): RQ		
Positive if Greater Than or Equal To a	Sensitivity	1 – Specificity
-0.9995	1.000	1.000
0.0005	1.000	0.962
0.0006	1.000	0.923
0.0007	0.938	0.923
0.0009	0.938	0.885
0.0010	0.875	0.885
0.0012	0.813	0.885
0.0017	0.813	0.846
0.0389	0.750	0.846
0.0887	0.750	0.808
0.1083	0.688	0.808
0.1429	0.625	0.808
0.1763	0.625	0.769
0.2664	0.625	0.731
0.3598	0.625	0.692
0.3737	0.563	0.692
0.4056	0.500	0.692
0.4494	0.500	0.654
0.5087	0.438	0.654
0.5567	0.375	0.654
0.5765	0.375	0.615
0.5988	0.375	0.577
0.6092	0.313	0.577
0.6448	0.313	0.538
0.7001	0.313	0.500
0.8116	0.313	0.462
0.9437	0.313	0.423
1.0877	0.313	0.385
1.1975	0.313	0.346
1.2314	0.313	0.308
1.3405	0.313	0.269
1.4290	0.250	0.269
1.4389	0.250	0.231
1.5342	0.250	0.192
1.6649	0.188	0.192
1.7602	0.188	0.154
1.8470	0.188	0.115
Positive if Greater Than	Sensitivity	1 – Specificity

or Equal To a		
2.1124	0.188	0.077
2.5108	0.125	0.077
2.8122	0.125	0.038
3.1795	0.125	0.000
3.5203	0.063	0.000
4.6301	0.000	0.000
The smallest cutoff value is the minimum observed test value minus 1, and the largest cutoff value is the maximum observed test value plus 1. All the other cutoff values are the averages of two consecutive ordered observed test values.		

من الجدول رقم (20) أعلاه نختار قيمة RQ 3.1795 لأنها تحقق الحساسية والنوعية الأفضل حسب القيم المبينة بالرسم، وعليه فإننا نستطيع القول بأن المريضات ممن تزيد لديهن RQ عن 3.1795 لديهن احتمالية أكبر بأن تكون نتيجة حملهن ايجابية، وفي حال كانت RQ لديهن تقل عن 3.1795 فالاحتمال الأكبر أن تكون نتيجة حملهن سلبية.

يبين الجدول رقم (21) التقاطع التالي:

الجدول رقم (21): توزيع نتيجة الحمل بين المشاهد والمتوقع وفق أفضل نقطة قطع لـ RQ

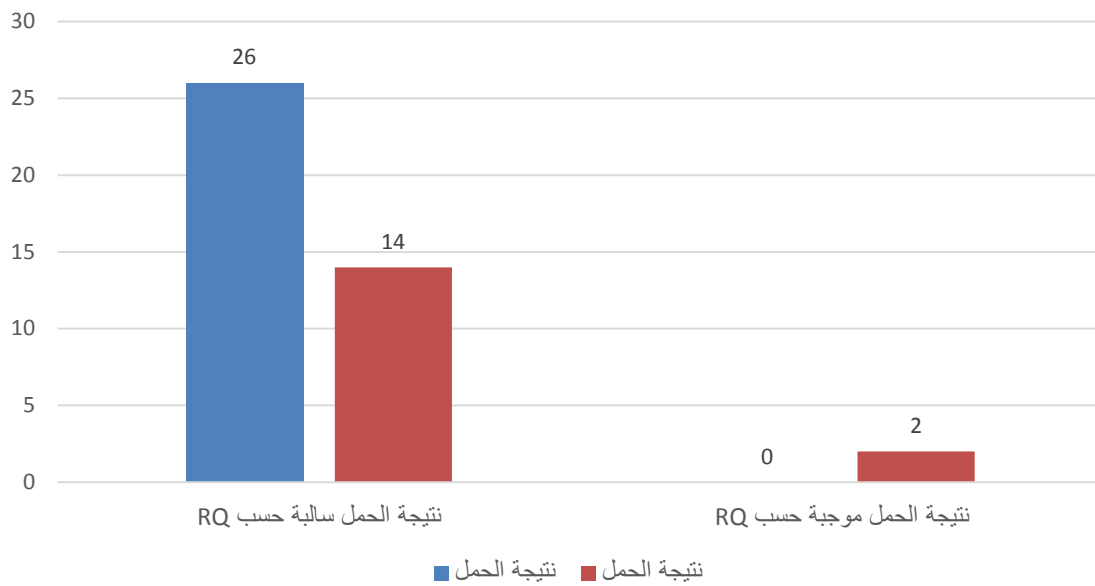
نتيجة الحمل وفق أفضل نقطة قطع لمتغير RQ	نتيجة الحمل		المجموع
	سلبي	ايجابي	
نتيجة الحمل سلبي	26	14	40
نتيجة الحمل ايجابي	0	2	2
المجموع	26	16	42
Cut-Off: 3.1795			
Chi Square P-value: > 0.05			
Odd Ratio (OR) Value & 95% . , (. to .)			
Relative Risk (RR) Value & 95% 0.350, (0.229 to 0.534)			

تبين نتائج الجدول السابق أن 40 مريضة تم تشخيص نتيجة حملهن بأنها سلبية وفق نقطة القطع 3.1795 لقيم RQ، منها 26 حالة سلبية صحيحة و 14 حالات سلبية كاذبة، وحالتين شخصت فيها نتيجة الحمل بأنها ايجابية، منها حالتين ايجابية صحيحة و 0 حالة ايجابية كاذبة.

ويتبين أنه لا يوجد علاقة بين RQ ونتيجة الحمل (إيجابي، سلبي)، حيث قيمة p-value أكبر من مستوى الدلالة 0.05.

ويتبين أن قيمة نسبة معامل الخطر النسبي 0.350 أي أنه بزيادة RQ لدى المريضة عن 3.1795 فإنها تصبح أكثر عرضة لأن تكون نتيجة حملها ايجابية بنسبة 0.350 زيادةً عن كون RQ أقل من 3.1795 .

يبين الشكل رقم (37) التالي توزيع نتيجة الحمل حسب RQ وفق أفضل نقطة قطع:



الشكل رقم (37) : توزيع نتيجة الحمل حسب RQ

الفصل الخامس:
المناقشة

Discussion

المناقشة:

تؤدي الخلايا الحبيبية دوراً مهماً في نمو البويضة والجريب، وتوفر البيئة المناسبة لانقسام البويضة ونضجها (Komatsu & Masubuchi, 2018)

وتزداد الاختلالات الصبغية الكروموسومية مع تقدم العمر (Hassold et al., 1993)، وتحدث الآثار الضارة نتيجة عدم التوازن بين إنتاج الـ ROS -RNS وإمكانية إزالة الزائد منها (Tatone et al., 2008)، وعدم التوازن هذا أطلق عليه مفهوم الاجهاد التأكسدي، والذي أثبت أنه يزداد مع التقدم بالعمر (Sohal, 2002)، ونظراً لأن مضادات الأكسدة مطلوبة لتقدم الانقسام الاختزالي الثاني، فإن ذلك يشير إلى وجود تفاعل متبادل بين المؤكسدات ومضادات الأكسدة في المبيض (Agarwal et al., 2012). كما وكان الاعتقاد أن الإجهاد التأكسدي هو سبب موت الخلايا الحبيبية مع التقدم بالعمر (Broekmans et al., 2007) (Tatone et al., 2008)، حيث ترتفع معدلات الخصوبة لدى الإناث بعد البلوغ، وتبلغ ذروتها في أوائل العشرينات، ويتبع ذلك انخفاض للخصوبة بعد سن 35 عام (Kasapoglu & Seli, 2020).

تترافق شيخوخة المبيض مع تدهور كمي ونوعي في احتياطي المبيض من الخلايا الببيضية، ومع زيادة اختلال الصيغة الصبغية للبويضات وانخفاض جودة الجنين وزيادة معدلات الإجهاض (Esencan et al., 2014; Qiao et al., 2021)، ولهذه الأسباب التي ارتبطت مع تقدم العمر، اعتمدنا منذ بداية بحثنا على أن يكون عمر المريضات الخاضعات لتقانة الإخصاب المساعد أقل من 38 عام، وذلك للابتعاد عن كل ماسبق دراسته وذكره.

وللميلاتونين نوعين نوعين من المستقبلات على أغشية الخلايا الحبيبية (Niles et al., 1999)، حيث يعمل الميلاتونين من خلال مستقبلاته على أغشية الخلايا لدى مريضات IVF من خلال تأثيره على الجين المسؤولة عن زيادة إفراز البروجسترون الهام في المراحل المبكرة للحمل (Fang et al., 2019)، ولا يعمل الميلاتونين كمضاد أكسدة وحسب، وإنما له دور كبير بتغيير التعبير الجيني في الخلايا الحبيبية وما يرتبط بتحسين الإخصاب (Tamura et al., 2022)، وهو أقرب ما يمكن للأفكار التي بحثنا بها ودارت حوله أهداف البحث، وهذا ما أوسع الأفق لدينا لقياس التعبير الجيني وليس الاكتفاء بقياس الميلاتونين فحسب .

و أثبتت العديد من الأبحاث الدور الرئيسي للميلاتونين في تحسين بيئة الجريب وعدد البويضات وجودة الأجنة ورفع مؤشرات مضادات الأكسدة في السائل الجريبي (Sadeghpour et al., 2025)، بالرغم من أنها تعد تجربة عشوائية وحديثة لكنها قاربت أفكار بحثنا والعموم من الأبحاث التي تسارعت لتؤكد أهمية الميلاتونين وفائدته في الإخصاب المساعد والجنة الجيدة (Wu et al., 2025).

كما وجدت العديد من الدراسات أن الميلاتونين بالرغم من أنه يحسن الاخصاب، لكن ليس له علاقة بحصول الحمل أو زيادة معدلات الحمل (Veiga et al., 2024).

كما لم تجد العديد من الدراسات فرق واضح في الحمل أو البويضات رغم ارتفاع الميلاتونين بالسائل الجريبي، وأثبتت أن ارتفاع الميلاتونين بالسائل الجريبي لـ 9 مرات النسبة التي يوجد عليها، لم يظهر فرق معنوي في عدد ونوعية البويضات والأجنة، وهذا يبرر أن العلاقة لا تعتمد على التركيز وحده (Fernando et al., 2018).

يحتوي السائل الجريبي، الذي يتم الحصول عليه أثناء البزل، على مجموعة غير متجانسة من أنواع الخلايا، منها كريات الدم الحمراء والبيضاء إضافة للخلايا الحبيبية (Attaran et al., 1998) (Quinn et al., 2006)، وتعددت الطرق المتبعة لعزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي (Grondahl et al., 2009) (Asem et al., 2000)، وعزل هذه الخلايا أمر غاية الأهمية لمزيد من الدراسات الجزيئية، ولذلك حرصت غالبية الطرق على العزل بجودة عالية وعدد كاف، ويشكل هذان الأمران معاً الحاجز الضروري لاختيار الطريقة التي تحقق كلا الأمرين بالدقة الممكنة، وذلك لأن حيوية الخلايا وقابليتها للحياة يتغير، مما قد يؤثر على كمية وسلامة ونقاء الحمض النووي الريبي المستخرج (Chacon-Cortes et al., 2012) (de la Cruz-Ramos et al., 2019) (Das et al., 2008) (Tan & Yiap, 2009).

يمكن أن تتأثر جودة وكمية الخلايا الحبيبية بجودة البويضة (Levay et al., 1997)، وبذلك، مع هذا التزامن بنضج البويضة وجودتها، قد تختلف مستويات التعبير عنها في مختلف الظروف الفيزيولوجية، وبالتالي تعتمد جودة الجنين على النضج النهائي للجريب (Sifer et al., 2003).

تفرز الخلايا الحبيبية مجموعة متنوعة من الهرمونات وعوامل النمو، التي قد تؤثر على نضج البويضة، وبالتالي فإن تقييم التعبير عن هذه العوامل أو الجينات في الخلايا الحبيبية يمكن أن يكون عامل من عوامل التنبؤ بصحة الجريب. وعلاوة على ذلك فإن التقييم الكيميائي الحيوي والجزيئي للخلايا الحبيبية قد يولد معلومات ضرورية لفهم الاخصاب الناجح للبويضة (McKenzie et al., 2004).

في الدراسات المخبرية، عادة يأخذون الخلايا الحبيبية من المرضى الذين يخضعون للتخصيب بطريقة IVF؛ هذه الخلايا محدودة في العدد ونصف العمر، لأنها تحت التحفيز بجرعات فوق فيزيولوجية من هرمون تحفيز الجريبات وموجهة الغدد التناسلية البشرية المشيمية أثناء تقنية الاخصاب المساعد (Canipari, 2000)، فقد لاحظنا في إحدى الدراسات أنهم استخدموا ثلاث طرق لعزل الخلايا الحبيبية بطريقة البيركول وفيكول وrlp، لتمييز دقة الطرق الثلاث، فيما توصلت أحد الدراسات أن العزل بتقنية ficoll قد تشكل بلورات السكروز التي تسبب تلف للخلايا الحبيبية، ومن ناحية ثانية وأهم أنها طريقة عامة لعزل الخلايا للمفاوية والحبيبية في السائل الجريبي، وهذا يتوافق مع قياس التدفق الخلوي، ولا يمكن لهذه الطريقة فصل الخلايا

الحبيبية الضخمة سليمة كما أن عدد الخلايا المشوهة والممزقة أعلى من الطرق الأخرى (Aghadavod et al., 2015).

أما طريقة percoll فإنها تفصل الخلايا الحبيبية المفردة والحزمية (Motta et al., 2003)، وأنها لا تسبب تلف خلوي، وهي أكثر ملائمة لاستخراج الخلايا ومع ذلك تبين أن ميزتها السلبية أن يكون وقت الاستخراج فيها طويل أكثر من الطرق الأخرى (Aghadavod et al., 2015).

وأشارت أحد الدراسات إلى أن طريقة العزل باستخدام الفلورسنت FACS هي تقنية معيارية ذهبية لعزل مجموعات الخلايا، ومع ذلك قد يؤدي إلى تقليل معدل القدرة على البقاء (Ferrero et al., 2012). وأن طريقة RLP من الطرق السريعة والتي أثبتت كفاءتها في العزل كطريقة بيركول، وتتميز بالسرعة والفاعلية (Aghadavod et al., 2015). وبما أن نقاء الخلايا المستخرجة يؤثر على نقاء وجودة الحمض النووي الريبي المستخرج (Chacon-Cortes et al., 2012)، فإن الطريقة المتبعة للعزل من أهم الأمور لاستكمال الخطوات الدراسية الجزيئية بعد العزل.

ومع تجربتنا للعزل بطريقة بيركول في البحث، كانت الطريقة الأنسب لأننا تمكنا من عزل الخلايا الحبيبية بجودة عالية وفصل واضح وتكلفة معقولة نسبة لتكاليف الطرق الأخرى. وتوصلنا بالدراسة الجزيئية للحصول على RNA سليم، وهذا كان جل الاهتمام والغاية لإمكانية تحويله إلى متمم DNA وإجراء اختبار RT-qPCR وطريقة العزل، مع أنها كانت تستغرق ساعة وأقل من الساعة لكن الإمكانيات المادية المتاحة لم تمكننا من استخدام باقي الطرق لمعرفة مزاياها أو قصر الوقت فيها، لكن الجودة في هذه الطريقة تم التأكيد عليها في بحثنا، حيث يعد السائل الجريبي مصدراً للخلايا الحبيبية البشرية بالإضافة إلى وجود كريات الدم البيضاء والحمراء التي تختلط مع الخلايا الحبيبية في السائل الجريبي، هذا ما أوصلنا إلى استخدام تقنية بسيطة بكل المقاييس لعزل هذه الخلايا الحبيبية عن باقي الخلايا لاستخدامها في دراسات جزيئية عديدة.

اتفقت دراستنا مع دراسة Quinn و McGregor (Quinn et al., 2006) التي اعتمدت عزل الخلايا الحبيبية بمدروج البيركول، وتوافقت مع دراستنا لكون الخل هو العقم الذكري مجهول السبب؛ ومن الفروقات أننا اعتمدنا الأعمار حتى 38 سنة، بينما توقفت دراستهم عند عمر 35.5 للنساء المعزول من السائل الجريبي لديهن الخلايا الحبيبية.

كان المطلوب في دراستنا الحصول على الخلايا الحبيبية سليمة للحفاظ على سلامة الحمض النووي الريبي؛ هذه الأهداف تم تحقيقها بنجاح باستخدام مدروج البيركول.

وتوافقت دراستنا مع (Han et al., 2021) في عزل الخلايا الحبيبية، وكان الفارق انتقائهم عينات النساء اللواتي لديهن مبيض متعدد الكيسات، بينما ابتعدت دراستنا عن المبيض متعدد الكيسات.

اتفقت دراستنا مع (Ai et al., 2019) في طريقة عزل الخلايا الحبيبية باستخدام مدرج البيركول، وتقدمت الدراسة المذكورة عن دراستنا باتمام زراعة الخلايا الحبيبية على أوساط زرع خاصة لامكانية الاستفادة منها فيما بعد، بتحسين التطبيقات السريرية للأدوية المعطاة في تحفيز الهرمون المنبه للجريب.

بينما استخدم (Raad et al., 2020) تقنيات AGG/DG لعزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي، ولكن تتوقف أهمية هذه التقنية عند العزل لأنها لا تفيد في الدراسات الجزيئية وتفاعلات البلمرة، وذلك أنها تحتفظ أيضاً بأنواع أخرى من الخلايا والتي تعد ملوثة للخلايا الحبيبية.

وعلى الرغم من أن مدرج البيركول مستخدم من زمن بعيد (Lederer et al., 1995)، حيث تم فيها فصل الخلايا الحبيبية الكبيرة عن الصغيرة وزراعة الخلايا لدراسة القدرة التكاثرية، لكنها كانت مطبقة على الجرذان وقتها، ولم تعتمد المحافظة على الخلايا الحبيبية للدراسات الجزيئية.

طابقت طريقتنا العملية الطريقة التي اتبعها (Chilvers et al., 2012)، ولكن قمنا بتحديث نقاط عدلت منهجية العزل، وهما حجم البيركول المستخدم حتى توصلنا للقيمة المثلى التي تحقق الفصل الواضح جداً للطبقات، وكذلك بعد إضافة دائرة حل الكريات الحمر ووسط الزرع تركنا العينة في درجة حرارة المخبر لمدة 13 دقيقة بدلاً عن 15 دقيقة المتبعة في باقي التجارب، لأن العديد من الخلايا كانت تتخرب في العينة بعد 15 دقيقة وتفق حوافها، أما بزم 13 حافظت الخلايا على شكل واضح جداً، علاوة على التأكيد بسحب عينات السائل الجريبي على أنابيب الهيارين، لمنع تخثر العينة حتى للعمل بها مباشرة، كل ذلك توصلنا له بعد إجراء العديد من التجارب للوصول إلى أمثلة الشروط التي طبقناها على كافة العينات.

وبناءً على النتائج التي توصلنا لها نرى أن استخدام البيركول هام لعزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي، وهو طريقة فعالة لاستخدام الحمض النووي DNA المستخلص من الخلايا في التقنيات الجزيئية المتعددة مثل عملية RT-PCR فيما بعد استخلاص RNA من الخلايا الحبيبية وتحويلها إلى cDNA، وهي طريقة فعالة وسريعة وتكلفتها متناسبة مع جودة استخراج الخلايا سليمة منها.

كل عمليات التلقيح الاصطناعي تسبقها إجراء معايرة لـ AMH لمعرفة مخزون المبيض، إلا أن قيمته التنبؤية محدودة للغاية، ولا يمكننا من تقييم جودة البويضة (Smeenk et al., 2007)، كما أن FSH قيمته ترتبط عكساً مع كمية مخزون المبيض وليس طرداً (Abdalla & Thum, 2004).

عدد من الدراسات وجد ارتباط بين الميلاتونين وAMH من حيث أن الخلايا الحبيبية هي من تنتجها في المبيض (Weenen et al., 2004)؛ وتقل كمية الميلاتونين مع التقدم بالعمر، وهذا ما تم التأكيد عليه في معظم الدراسات السابقة، علماً أن التفسير في هذا الموضوع تعددت توقعاته، فقد يرتبط بانخفاض مستقبلات بيتا الأدرينالية في غشاء الغدة الصنوبرية، أو قد تكون نتيجة الاستجابة المنخفضة للنورابينفرين، أو انخفاض

أنزيم ترانسفيراز، وما إلى ذلك من الأسباب التي تربط بين انخفاضه مع التقدم بالعمر (Tan et al., 2007) (Touitou, 2001). والعديد من الدراسات كانت تربط بين انخفاض مستويات AMH و FSH مع مستويات الميلاتونين في السائل الجريبي (Walecka-Kapica et al., 2015) (Tong et al., 2017)، وهذا ما تخالفت به دراستنا حيث أننا بدأنا الدراسة واعتماد العينات التي يكون فيها كلتا النسبتين طبيعيتين.

وتمكنت دراسات من التوصل إلى أن إعطاء الميلاتونين يرتبط مع تحسين احتياطي مخزون المبيض بالارتباط مع التقدم بالعمر (Tamura, Takasaki, et al., 2008)، وكانت هذه الدراسة مطبقة على الجرذ.

إن التكاثر البشري يشكل موضوعاً صعباً للدراسة لأسباب عديدة، منها التباين السكاني، والحدود الأخلاقية عند إجراء التجارب على البشر، وتكاليف البحث المرتفعة والتكنولوجيات المناسبة، وما إلى ذلك. ولكن جودة البيانات السريرية - قوتها الإحصائية، وقابليتها للتكرار، وملاءمة الضوابط، واختلافات العلاج، وما إلى ذلك - تجعل التوصل إلى استنتاجات قاطعة حتى الآن حول الدور الفيزيولوجي الطبيعي للميلاتونين في التكاثر البشري أمراً صعباً؛ وعلى نحو مماثل، لم يتم التحقق من صحة الاستخدامات الدوائية المقترحة للميلاتونين أو نظائره في علاج البلوغ والعقم وانقطاع الطمث وما إلى ذلك، بسبب الأدبيات العلمية المنشورة المحدودة (Olcese, 2020)، ولهذا السبب أكثر الدراسات التي توصلنا لها كانت مطبقة على الجرذ، مع أنه يقارب الخصائص عند البشر لكننا لا نتمكن من التطابق الكامل بالتطبيقات المجرة عليه وتمثلها مع البشر، وتبقى كل الافتراضات توقعات ريثما يتم التطبيق فيها على البشر، ولكننا نحاول في بحثنا هذا التوصل لأكبر قدر من المعلومات التي قد تفيد الدراسات اللاحقة بأن تكون مفتاح الانطلاق بها.

وكذلك قامت دراسات بربط مستوى الميلاتونين بالهرمونات التناسلية، لامكانية تصحيح العديد من المضاعفات التي تحدث أثناء الحمل كالتسمم الحملي (Cipolla-Neto et al., 2022)، ولكن كان هدفنا في هذا البحث ربط مستوى الميلاتونين، سواءً بالسائل الجريبي أو الدم، مع جودة البويضة لحصول الحمل الناجح، ولم نتطرق لموضوع التسمم الحملي وآثاره وعلاقته مع الميلاتونين.

معظم الدراسات أكدت أن نسبة الميلاتونين تنخفض مع التقدم بالعمر (Zhang et al., 2020)، ولكنها كانت مطبقة على الفئران البالغة؛ ونرى في هذا الجانب، بالرغم من الدقة الممكنة للأبحاث السابقة، إلا أن إمكانية متابعة العمر مع الفئران ممكن، أما البحث على البشر فيما يتعلق بالتقدم العمري لكل مريضة يحتاج الوقت الكبير، لأن كل مريضة تختلف كلياً بالظروف البيئية المحيطة، والعديد من العوامل لامكانية تحديد تأثير الميلاتونين وعلاقته مع التقدم بالعمر.

تؤكد الدراسات السابقة أن ارتفاع ROS في السائل الجريبي مرتبطة مع التقدم بالعمر تؤدي إلى تلف جودة البويضة (Goud et al., 2008)، وهنا تأتي أهمية الميلاتونين في قبط الجذور التأكسدية الحرة ROS وإزالتها (Tan et al., 2007)، وكذلك تعديل أنزيمات الجينات المضادة للأكسدة (Tomas-Zapico &)

(Coto-Montes, 2005)، ولذلك تم تأكيد أن الميلاتونين يحمي السائل الجريبي من مضادات الأكسدة الزائدة، وبالتالي له الدور الأبرز في حماية جودة البويضة (Wang et al., 2013).

توافقت دراستنا مع (Zhang et al., 2020) في أن الدراسة قامت على معايرة الميلاتونين بالدم والسائل الجريبي للتحقق مما تشكله نسبة الميلاتونين بالدم إلى نسبتها في السائل الجريبي لكل مريضة، ولكننا اختلفنا في أن النسبة لديهم أظهرت الضعف فقط بينما في بحثنا تباينت النسب بين ارتفاع وانخفاض ولم نتوصل إلى هذه الحقيقة.

كذلك لم يتبين لدينا وجود علاقة الارتباط هذه بين الدم والسائل الجريبي، ولذلك لم نتمكن أن نعزو الموضوع إلا إلى اختلاف المجتمع المدروس؛ وبما أننا أول دراسة تقوم بهذا العمل في المجتمع السوري، لذلك لم نتمكن من المقارنة مع دراسات موجودة ضمن هذه الشروط في هذا المجتمع وتلك العينات.

مع ازدياد الاهتمام البحثي بالأدوار الكبيرة للميلاتونين في السنوات الأخيرة في كافة خلايا الجسم، وخاصة مع تأكيد الأبحاث السابقة ارتفاع نسبة الميلاتونين في السائل الجريبي، الأمر الذي لم يتم فيه التوصل بعد للأهمية التي تترتب عليها هذه الزيادة في هذا السائل؛ هذا ما استدعى الأبحاث المتعلقة بالتلقيح الاصطناعي خاصة التركيز على أهمية الميلاتونين ودراسته في تأثيره على الإنجاب، خصوصاً حيث يعزى ارتفاع الميلاتونين في السائل الجريبي بهذا الشكل نتيجة تصنيعه في المبيض بسبب وجود المستقبلات الخاصة به (MT1, MT2)، حيث توجهت الدراسة (Zheng et al., 2018) إلى تقييم التأثير للميلاتونين على التعبير عن الجينات المرتبطة بتكوين الأوعية الدموية في الخلايا الحبيبية للنساء الخاضعات لتقانة IVF بسبب العقم الذكري مجهول السبب.

وتميزت الدراسة (Tamura et al., 2022) بإثبات أن العلاج بالميلاتونين يغير النسخ الجيني في الخلايا الحبيبية، مما قد يساهم في تحسين نتائج التلقيح الاصطناعي. أحد أهم العوامل التي تحدد جودة البويضة هو الإجهاد التأكسدي الناجم عن ROS في الجريب، لأن الزيادة المفرطة تؤدي إلى تلف وتسمم البويضة والخلايا الحبيبية؛ وأثبتت ذلك عدد من الدراسات التي أظهرت أن البويضات المسترجعة من الجريبات تحت إجهاد تأكسدي مرتفع ذات جودة رديئة وقدرة ضعيفة على الإخصاب والاستمرار بالحمل (Seino et al., 2002) (Tamura, Takasaki, et al., 2008)؛ وهذا ما اتفقت معه دراستنا، وأن إعطاء الميلاتونين فعال في تقليل الإجهاد التأكسدي وتحسين جودة البويضة (Tamura, Takasaki, et al., 2008). كما أكدت دراسات سابقة تأثير الميلاتونين على تكوين الكيسة الأريمية، التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالقدرة التي تمتلكها الأجنة على النمو أكثر من ارتباطها بجودة الأجنة (Jahromi et al., 2017)، وهذا ما تباعد عن دراستنا لأن التركيز على جودة الخلية الببيضية بالنسبة لبحثنا يشكل العامل الأبرز، كما تشير الدراسات إلى أن إنتاج البروجيسترون من الخلايا الحبيبية مهم لنضج البويضة أثناء الإباضة (Salehnia & Zavareh, 2013)،

لذلك فإن العلاج بالميلاتونين يؤدي إلى تحسين إنتاج البروجسترون في الخلايا الحبيبية أثناء الإباضة، مما قد يحسن جودة البويضة (Tamura et al., 2022)، وهذا ما تخالفت معه دراستنا التي انتقت عينات لنساء تكون لديهن نسبة البروجسترون طبيعية.

وأثبتت أبحاث أن العلاج بالميلاتونين أدى إلى زيادة عدد البويضات الناضجة، وخفض أعداد البويضات غير الناضجة (Pilehvari et al., 2023)، وهذا ما توافق مع دراستنا التي أكدت ارتباط جودة البويضة مع ارتفاع مستوى التعبير عن المستقبل MT1.

كما أكدت أحد الدراسات على أن الميلاتونين يحسن معدلات الحمل السريري الناجح، ويقلل حالات الإجهاض، حيث يحسن نضج البويضات من خلال تقليل مستوى CAMP، والمساعدة في تقليل صلابة الغشاء البلازمي (Li, Liu, et al., 2019). وأثبتت دراسات أخرى مخبرياً أن الميلاتونين يقلل الإجهاد التأكسدي، ومستويات موت الخلايا المبكر، ويؤدي إلى تجميع خيوط المغزل، ويعمل على توازن الكروموسومات في البويضات، ويزيد من نمو الجنين في ظروف المخبر (Hu et al., 2020) (An et al., 2019) (Jahromi et al., 2017). أما في متلازمة تكيس المبيض تؤدي الزيادة في GnRH إلى زيادة في LH، وتغير نسبة LH/FSH، وبالتالي يزداد إنتاج الاندروجين في المبايض بينما ينخفض FSH، ويضعف نضج الجريبات بشكل كبير، ولكن ينظم الميلاتونين GNRH من خلال مستقبلاته MT1, MT2، مما يؤدي إلى تثبيط تعبير مستقبل GnRH وزيادة FSH، مما يؤدي إلى نضج الجريبات والوصول للإباضة (Xie et al., 2021)؛ ولكن دراستنا لم تتخذ هذا الجانب لأن نسبة LH/FSH كانت طبيعية في شروط بحثنا.

وتوصلت دراسة قام بها فيرناندو على مريضات التلقيح الاصطناعي في استراليا بإعطاء جرعات متزايدة من الميلاتونين، لملاحظة تأثيره على نتائج الحمل وجودة البويضة، ولكنه لم يلاحظ فرق في كل من معدل الحمل السريري ومعدل المواليد الأحياء live birth rate (LBR) بين أيٍّ من المجموعات الأربع التي قسمها في بداية بحثه، ولم يلاحظ أي فرق في إجمالي عدد البويضات، أو عدد بويضات MII، أو عدد البويضات المخصبة، أو عدد أو جودة الأجنة. هذا على الرغم من أن متوسط تركيز الميلاتونين FF في المجموعة التي تلقت أعلى جرعة (8 ملغ يومياً) كان أعلى بتسعة أضعاف مقارنةً بالدواء الوهمي، وكل ذلك كان لاستكشاف ما إذا كان الميلاتونين الفموي، المُعطى أثناء تحفيز المبيض، يزيد من معدل الحمل السريري Clinical pregnancy rate (CPR) بعد التلقيح الاصطناعي، وما هي الجرعة الأكثر فعالية. ولكنه عزى الموضوع إلى أنها تجربة سريرية عشوائية مزدوجة التعمية، مُحكمة بدواء وهمي. لتحديد الجرعة، في عيادات التلقيح الاصطناعي الخاصة في أستراليا، تم فيها اختيار 160 امرأة خضعن لدورتين الأولى من التلقيح الاصطناعي أو الحقن المجهرية عشوائياً، لتلقي دواء وهمي (عدد 40)، والمجموعة الثانية ميلاتونين 2 ملغ (عدد 41)، والمجموعة الثالثة ميلاتونين 4 ملغ (عدد 39)، والمجموعة الرابعة ميلاتونين 8 ملغ (عدد 40).

مرتين يومياً أثناء تحفيز المبيض. أي أنه برر عدم تأثير الميلاتونين لكونها دراسة صغيرة (Fernando et al., 2018).

وكانت تلك من أهم الاختلافات بين دراستنا ودراسة فيرناندو، وبالرغم من قلة العينات التي قمنا باختبارها، لكن الدراسة كانت مضبوطة ومنتقاة بشروط تستهدف حالات معينة استبعدنا فيها العديد من الشروط غير المناسبة للبحث، بالإضافة إلى أن دراستنا تمت على مجتمع مختلف، أي أن المجتمع المدروس قد يكون سبب للاختلاف وتلك النقطتين شكّلتا اختلافاً واضحاً بين الدراستين.

تتفق نتائج دراستنا مع الدراسات التي تؤكد وجود مستقبلات الميلاتونين في الخلايا الحبيبية البشرية، ولا سيما MT1 و MT2، وأن هذه الخلايا تمثل هدفاً مباشراً لتأثير الميلاتونين داخل الجريب. فقد أظهرت دراسات على الخلايا الحبيبية مأخوذة من مريضات خاضعات للـ IVF أن الميلاتونين يستطيع تعديل التعبير الجيني لمسارات مرتبطة بالجينات المحفزة لتوليد السيترونيديات، وله دور كبير في السيطرة على الإجهاد التأكسدي، ويلعب دور مهم في وظيفة الميتوكوندريا، وأن هذه التأثيرات قد تتم عبر مستقبلات الميلاتونين. لذلك فإن كشف تعبير MT1 في دراستنا، ووجود حالات ذات RQ أعلى من 1، يدعم الفرضية القائلة أن الخلايا الحبيبية في السائل الجريبي تمتلك قابلية استجابة موضعية للميلاتونين.

ومع ذلك، فإن عدم وجود ارتباط حاسم بين RQ ونتيجة الحمل لا يتعارض مع الدراسات الحديثة؛ إذ تشير بعض التجارب السريرية إلى أن الميلاتونين قد يحسن مؤشرات وسيطة، مثل نضج البويضات، معدل الإخصاب، أو جودة الأجنة، دون أن ينعكس دائماً بشكل معنوي على معدل الحمل السريري أو الولادة الحية. وهذا ينسجم مع طبيعة الحمل كنتيجة نهائية متعددة العوامل، تتأثر بجودة الجنين، بطانة الرحم، عمر المريضة، البروتوكول التحريضي، الحالة الهرمونية، وعدد الأجنة المنقولة، وليس بتعبير مستقبل واحد فقط.

كما أن اختلاف نتائج دراستنا عن بعض الدراسات، قد يُفسّر باختلاف المستقبل المدروس، إذ ركزت بعض الأبحاث على MT2 أو على مسارات أخرى مثل aromatase و VEGF، إضافة إلى اختلاف طبيعة العينات السريرية، مثل مريضات OHSS أو DOR أو النساء بعمر متقدم. لذلك يمكن اعتبار دراستنا إضافة محلية مهمة، لأنها درست MT1 في الخلايا الحبيبية لدى مريضات خاضعات للـ IVF ضمن مجتمع مختلف، مع محاولة ربط التعبير الجيني بالميلاتونين الموضعي ونتائج الحمل.

وننتجنا لا نقول أن MT1 وحده يتنبأ بالحمل، بل نقول إن الخلايا الحبيبية لدى عدد من المريضات تُظهر تعبيراً قابلاً للقياس لمستقبل الميلاتونين، وهذا يتفق مع الدراسات الجزيئية. أما اختلاف الارتباط مع الحمل فيُفسّر بأن الحمل نتيجة نهائية متعددة العوامل، بينما يعكس RQ التعبير عن المستقبل، وهي استجابة جزيئية موضعية داخل الجريب.

والعديد من الدراسات بحثت في قدرة الميلاتونين وربط مستوياته في السائل الجريبي بكمية وجودة البويضات ونتائج IVF (Tong et al., 2017).

وعلى الرغم من أننا كنا نأمل في بداية البحث إلى التأكيد على جانب أهمية الميلاتونين في تحسين جودة البويضة ومدى ارتباطه الوثيق بذلك، إلا أن التباين في النتائج أوصلتنا إلى حقائق أخرى ومجالات أوسع في الانتباه إلى المجتمعات التي تؤخذ منها العينات، وإلى الظروف المحيطة لكل مريضة، علاوة على موضوع المتابعة العمرية لنفس المريضة، مع زيادة الميلاتونين أو تراجعها والأسباب المؤدية لذلك.

الاستنتاجات والتوصيات
Conclusions &
Recommendations

1-6- النتائج:

بناءً على ما تم استعراضه في هذا البحث بفصوله النظرية والعملية، فقد توصل البحث إلى النتائج الآتية:

1. أهمية انتقاء الطريقة لعزل الخلايا الحبيبية كونها الأساس للدراسات الجزيئية اللاحقة، وفي دراستنا تم التأكيد على أن العزل بتقنية بيركول هي الطريقة الأفضل والأنسب والأجود.
2. لا علاقة للعمر وعدد الخلايا الحبيبية بجودة البويضات.
3. لا يوجد علاقة بين نسبة الميلاتونين في الدم أو السائل الجريبي بجودة البويضات ولكننا نعزو هذا الموضوع إلى اختلاف المجتمع المدروس أو قلة عدد العينات حسب الإمكانيات المتاحة.
4. لا يوجد علاقة بين زيادة كمية الميلاتونين وحصول الحمل الناجح في المجتمع المدروس في البحث

2-6- التوصيات:

بناءً على كل ما سبق ذكره وما توصل إليه البحث من استنتاجات، يوصي البحث بما يلي:

1. زراعة الخلايا الحبيبية على أوساط زرع خاصة لإمكانية الاستفادة منها فيما بعد بتحسين التطبيقات السريرية للأدوية المعطاة في تحفيز الهرمون المنبه للجريب.
2. إمكانية وجود دراسات تتابع تطور العلاقة بين نسبة الميلاتونين سواء في الدم أو السائل الجريبي مع التقدم بالعمر لنفس المريضة الخاضعة لتقانة الاخصاب المساعد.
3. دراسة التعبير الجيني عن مستقبل MT2

المراجع

References

English Sources:

- Abdalla, H., & Thum, M. Y. (2004). An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*, 19(4), 893-898. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh141>
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., & Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
- Aghadavod, E., Zarghami, N., Farzadi, L., Zare, M., Barzegari, A., Movassaghpour, A. A., & Nouri, M. (2015). Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. *Adv Biomed Res*, 4, 250. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.170675>
- Ai, A., Tang, Z., Liu, Y., Yu, S., Li, B., Huang, H., Wang, X., Cao, Y., & Zhang, W. (2019). Characterization and identification of human immortalized granulosa cells derived from ovarian follicular fluid. *Exp Ther Med*, 18(3), 2167-2177. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7802>
- An, Q., Peng, W., Cheng, Y., Lu, Z., Zhou, C., Zhang, Y., & Su, J. (2019). Melatonin supplementation during in vitro maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *J Cell Physiol*, 234(10), 17370-17381. <https://doi.org/10.1002/jcp.28357>
- Andersen, L. P., Gogenur, I., Rosenberg, J., & Reiter, R. J. (2016). The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig*, 36(3), 169-175. <https://doi.org/10.1007/s40261-015-0368-5>
- Asem, E. K., Feng, S., Stingley-Salazar, S. R., Turek, J. J., Peter, A. T., & Robinson, J. P. (2000). Basal lamina of avian ovarian follicle: influence on morphology of granulosa cells in-vitro. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 125(2), 189-201. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(99\)00100-0](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(99)00100-0)
- Attaran, M., Frasor, J., Mascha, E., Radwanska, E., & Rawlins, R. G. (1998). The relationship of human granulosa-lutein cell proliferative index to follicular diameter and serum estradiol. *Obstet Gynecol*, 91(3), 449-453. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(97\)00707-2](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(97)00707-2)
- Broekmans, F. J., Knauff, E. A., te Velde, E. R., Macklon, N. S., & Fauser, B. C. (2007). Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab*, 18(2), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.01.004>
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., & Wurtman, R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, 64(4), 865-867. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-4-865>
- Bubenik, G. A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*, 47(10), 2336-2348. <https://doi.org/10.1023/a:1020107915919>
- Calvo, J. R., Gonzalez-Yanes, C., & Maldonado, M. D. (2013). The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *J Pineal Res*, 55(2), 103-120. <https://doi.org/10.1111/jpi.12075>
- Canipari, R. (2000). Oocyte--granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update*, 6(3), 279-289. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.279>
- Cecon, E., Oishi, A., & Jockers, R. (2018). Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. *Br J Pharmacol*, 175(16), 3263-3280. <https://doi.org/10.1111/bph.13950>
- Chacon-Cortes, D., Haupt, L. M., Lea, R. A., & Griffiths, L. R. (2012). Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. *Mol Biol Rep*, 39(5), 5961-5966. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1408-8>
- Chao, H. T., Lee, S. Y., Lee, H. M., Liao, T. L., Wei, Y. H., & Kao, S. H. (2005). Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries. *Ann N Y Acad Sci*, 1042, 148-156. <https://doi.org/10.1196/annals.1338.016>
- Chen, Y., Yang, J., & Zhang, L. (2023). The Impact of Follicular Fluid Oxidative Stress Levels on the Outcomes of Assisted Reproductive Therapy. *Antioxidants (Basel)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/antiox1212117>
- Chilvers, R. A., Bodenbun, Y. H., Denner, L. A., & Urban, R. J. (2012). Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet*, 29(6), 547-556. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9739-5>

- Cipolla-Neto, J., Amaral, F. G., Soares, J. M., Jr., Gallo, C. C., Furtado, A., Cavaco, J. E., Goncalves, I., Santos, C. R. A., & Quintela, T. (2022). The Crosstalk between Melatonin and Sex Steroid Hormones. *Neuroendocrinology*, 112(2), 115-129. <https://doi.org/10.1159/000516148>
- Das, M., Djahanbakhch, O., Hacıhanefioglu, B., Saridogan, E., Ikram, M., Ghali, L., Raveendran, M., & Storey, A. (2008). Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(3), 881-887. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1650>
- de la Cruz-Ramos, J. M., Hernandez-Triana, L. M., Garcia-De la Pena, C., Gonzalez-Alvarez, V. H., Weger-Lucarelli, J., Siller-Rodriguez, Q. K., Sanchez Ramos, F. J., Rodriguez, A. D., & Ortega-Morales, A. I. (2019). Comparison of two DNA extraction methods from larvae, pupae, and adults of *Aedes aegypti*. *Heliyon*, 5(10), e02660. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02660>
- Diniz, M. S., Magalhaes, C. C., Tocantins, C., Grilo, L. F., Teixeira, J., & Pereira, S. P. (2023). Nurturing through Nutrition: Exploring the Role of Antioxidants in Maternal Diet during Pregnancy to Mitigate Developmental Programming of Chronic Diseases. *Nutrients*, 15(21). <https://doi.org/10.3390/nu15214623>
- Drummond, A. E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-16>
- Dubocovich, M. L. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *SpringerLink*(july) .
- Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), 101-110. <https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:101>
- Ekmekcioglu, C. (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance [Review]. *Biomed Pharmacother*, 60(3), 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.002>
- El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A. E., Sosa, G. A., El-Roos, M. E., & Nagai, T. (2011). Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Mol Reprod Dev*, 78(4), 250-262. <https://doi.org/10.1002/mrd.21295>
- Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z & .Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs [Review]. *Eurasian J Med*, 48(2), 135-141. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0267>
- Esencan, E., Simsek, B., & Seli, E. (2021). Analysis of female demographics in the United States: life expectancy, education, employment, family building decisions, and fertility service utilization. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 33(3), 170-177. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000704>
- Espino, J., Macedo, M., Lozano, G., Ortiz, A., Rodriguez, C., Rodriguez, A. B., & Bejarano, I. (2019). Impact of Melatonin Supplementation in Women with Unexplained Infertility Undergoing Fertility Treatment. *Antioxidants (Basel)*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090338>
- Fang, L., Li, Y., Wang, S., Yu, Y., Li, Y., Guo, Y., Yan, Y., & Sun, Y. P. (2019). Melatonin induces progesterone production in human granulosa-lutein cells through upregulation of StAR expression. *Aging (Albany NY)*, 11(20), 9013-9024. <https://doi.org/10.18632/aging.102367>
- Fernando, S., Wallace, E. M., Vollenhoven, B., Lolatgis, N., Hope, N., Wong, M., Lawrence, M., Lawrence, A., Russell, C., Leong, K., Thomas, P., & Rombauts, L. (2018). Melatonin in Assisted Reproductive Technology: A Pilot Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 545. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00545>
- Ferrero, H., Delgado-Rosas, F., Garcia-Pascual, C. M., Monterde, M., Zimmermann, R. C., Simon, C., Pellicer, A., & Gomez, R. (2012). Efficiency and purity provided by the existing methods for the isolation of luteinized granulosa cells: a comparative study. *Hum Reprod*, 27(6), 1781-1789. <https://doi.org/10.1093/humrep/des096>
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*, 51(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x>
- Galano, A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res*, 54(3), 245-257. <https://doi.org/10.1111/jpi.12010>
- Ganguly, S., Coon, S. L., & Klein, D. C. (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res*, 309(1), 127-137. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0579-y>

- Ghorbaninejad, P., Sheikhsossein, F., Djafari, F., Tijani, A. J., Mohammadpour, S., & Shab-Bidar, S. (2020). Effects of melatonin supplementation on oxidative stress: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 41(4). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2020-0030>
- Goud, A. P., Goud, P. T., Diamond, M. P., Gonik, B., & Abu-Soud, H. M. (2008). Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 44(7), 1295-1304. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.014>
- Grondahl, M. L., Borup, R., Lee, Y. B., Myrholm, V., Meinertz, H., & Sorensen, S. (2009). Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril*, 91(5), 1820-1830. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.137>
- Guerin, P., El Mouatassim, S., & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7(2), 175-189. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
- Guo, Y. M., Sun, T. C., Wang, H. P., & Chen, X. (2021). Research progress of melatonin (MT) in improving ovarian function: a review of the current status. *Aging (Albany NY)*, 13(13), 17930-17947. <https://doi.org/10.18632/aging.203231>
- Han, Y., Gao, G., Li, S., Xiao, N., Zhang, Y., & Luo, H. (2021). Development of an optimal protocol for isolation and purification of human granulosa cells in patients with different ovarian reserves. *Exp Ther Med*, 22(3), 938. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10370>
- Hassold, T., Hunt, P. A., & Sherman, S. (1993). Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Curr Opin Genet Dev*, 3(3), 398-403. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(93\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0959-437x(93)90111-2)
- Hirshfield, A. N. (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. *Environ Mol Mutagen*, 29(1), 10-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020302>
- Hu, K. L., Ye, X., Wang, S., & Zhang, D. (2020). Melatonin Application in Assisted Reproductive Technology: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 160. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00160>
- Jahromi, B. N., Sadeghi, S., Alipour, S., Parsanezhad, M. E., & Alamdarloo, S. M. (2017). Effect of Melatonin on the Outcome of Assisted Reproductive Technique Cycles in Women with Diminished Ovarian Reserve: A Double-Blinded Randomized Clinical Trial. *Iran J Med Sci*, 42(1), 73-78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28293053>
- Joseph, T. T., Schuch, V., Hossack, D. J., Chakraborty, R., & Johnson, E. L. (2024). Melatonin: the placental antioxidant and anti-inflammatory. *Front Immunol*, 15, 1339304. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1339304>
- Kasapoglu, I., & Seli, E. (2020). Mitochondrial Dysfunction and Ovarian Aging. *Endocrinology*, 161(2). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa001>
- Komatsu, K., & Masubuchi, S. (2018). Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development. *Biol Reprod*, 99(3), 527-535. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y072>
- Konturek, S. J., Konturek, P. C., & Brzozowski, T. (2006). Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5, 51-66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17233075>
- Kvetnoy, I., Ivanov, D., Mironova, E., Evsyukova, I., Nasyrov, R., Kvetnaia, T., & Polyakova, V. (2022). Melatonin as the Cornerstone of Neuroimmunoendocrinology. *Int J Mol Sci*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031835>
- Lampiao, F. (2013). New developments of the effect of melatonin on reproduction. *Baishideng*.
- Lederer, K. J., Luciano, A. M., Pappalardo, A., & Peluso, J. J. (1995). Proliferative and steroidogenic capabilities of rat granulosa cells of different sizes. *J Reprod Fertil*, 103(1), 47-54. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1030047>
- Levy, P. F., Huyser, C., Fourie, F. L., & Rossouw, D. J. (1997). The detection of blood contamination in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet*, 14(4), 212-217. <https://doi.org/10.1007/BF02766112>
- Li, Y., Fang, L., Yu, Y., Shi, H., Wang, S., Guo, Y., & Sun, Y. (2019). Higher melatonin in the follicle fluid and MT2 expression in the granulosa cells contribute to the OHSS occurrence. *Reprod Biol Endocrinol*, 17(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0479-6>

- Li, Y., Liu, H., Wu, K., Liu, H., Huang, T., Chen, Z. J., Zhao, S., Ma, J., & Zhao, H. (2019). Melatonin promotes human oocyte maturation and early embryo development by enhancing clathrin-mediated endocytosis. *J Pineal Res*, 67(3), e12601. <https://doi.org/10.1111/jpi.12601>
- Macklon, N. S., & Fauser, B. C. (1998). Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas*, 30(2), 181-188. [https://doi.org/10.1016/s0378-5122\(98\)00072-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5122(98)00072-3)
- Macklon, N. S., & Fauser, B. C. (2001). Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. *Arch Med Res*, 32(6), 595-600. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00327-7](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00327-7)
- Magalhaes, R. S., & Atala, A. (2019). Regenerative medicine for the female reproductive system. In *Principles of Regenerative Medicine* (pp. 1237-1250). Elsevier.
- Maganhin, C. C., Baracat, M. C. P., Luquetti, C. M., Buonfiglio, D., Girão, M. J., Cipolla-Neto, J., Simoes, M. J., Simoes, R. S., Turco, E. L., & Montelione, P. (2023). Melatonin modulates the in vitro angiogenesis of granulosa cells collected from women with marital infertility for IVF. *Melatonin Research*, 6(3), 296-312.
- Malpoux, B., Migaud, M., Tricoire, H., & Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms*, 16(4), 336-347. <https://doi.org/10.1177/074873001129002051>
- Manchester, L. C., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Andersen, L. P., Zhou, Z., Galano, A., Vriend, J., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res*, 59(4), 403-419. <https://doi.org/10.1111/jpi.12267>
- McKenzie, L. J., Pangas, S. A., Carson, S. A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J. E., Amato, P., & Matzuk, M. M. (2004). Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 19(12), 2869-2874. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh535>
- Mennenga, K., Ueck, M., & Reiter, R. J. (1991). Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J Pineal Res*, 10(3), 159-164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1991.tb00834.x>
- MianqunZhang. (January 2020). Insufficiency of melatonin in follicular fluid is a reversible cause for advanced maternal age-related aneuploidy in oocytes. *Redox Biology*, 28.
- Mojaverrostami, S., Asghari, N., Khamisabadi, M., & Heidari Khoei, H. (2019). The role of melatonin in polycystic ovary syndrome: A review. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, 17(12), 865-882. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i12.5789>
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Familiari, G., Makabe, S., Stallone, T., & Macchiarelli, G. (2003). Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *Int Rev Cytol*, 223, 177-288. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(05\)23004-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(05)23004-8)
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med*, 43(4), 477-503. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034>
- Myatt, L. (2010). Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, 31 Suppl(Suppl), S66-69. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.021>
- Najafi, M., Hooshangi Shayesteh, M. R., Mortezaee, K., Farhood, B., & Haghi-Aminjan, H. (2020). The role of melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review. *Life Sci*, 241, 117173. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117173>
- Niles, L. P., Wang, J., Shen, L., Lobb, D. K., & Younglai, E. V. (1999). Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 156(1-2), 107-110. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00135-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00135-5)
- Olcese, J. M. (2020). Melatonin and Female Reproduction: An Expanding Universe. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 85. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00085>
- Pilehvari, S., Yavangui, M., Paknahad, E., Cheraghi, Z., & Ghorbani, M. (2023). The Boosting Effects of Melatonin on the In Vitro Fertilization (IVF) of Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Chonnam Med J*, 59(3), 188-193. <https://doi.org/10.4068/cmj.2023.59.3.188>
- Polyakova, V., Medvedev, D., Linkova, N., Mushkin, M., Muraviev, A., Krasichkov, A., Dyatlova, A., Ivanova, Y., Gullo, G., & Gorelova, A. A. (2024). Melatonin Receptors and Serotonin: Age-Related Changes in the Ovaries. *J Pers Med*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/jpm14091009>

- Qiao, J., Wang, Z. B., Feng, H. L., Miao, Y. L., Wang, Q., Yu, Y., Wei, Y. C., Yan, J., Wang, W. H., Shen, W., Sun, S. C., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2014). The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: current status and future prospects. *Mol Aspects Med*, 38, 54-85. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.06.001>
- Quinn, M. C., McGregor, S. B., Stanton, J. L., Hessian, P. A., Gillett, W. R., & Green, D. P. (2006). Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. *Reprod Fertil Dev*, 18(5), 501-508. <https://doi.org/10.1071/rd05051>
- Raad, G., Bazzi, M., Tanios, J., Mourad, Y., Azouri, J., Azouri, J., & Fakih, C. (2020). Optimization of The Cell Aggregates Method for Isolation and Purification of Human Granulosa Cells from Follicular Fluid. *Int J Fertil Steril*, 13(4), 339-345. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.5790>
- Rai, S., & Ghosh, H. (2021). Modulation of human ovarian function by melatonin. *Front Biosci (Elite Ed)*, 13(1), 140-157. <https://doi.org/10.2741/875>
- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Manchester, L. C., & Tan, D. X. (2013). Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci*, 14(4), 7231-7272. <https://doi.org/10.3390/ijms14047231>
- Reiter, R. J., Sharma, R., Romero, A., Manucha, W., Tan, D. X., Zuccari, D., & Chuffa, L. G. A. (2023). Aging-Related Ovarian Failure and Infertility: Melatonin to the Rescue. *Antioxidants (Basel)*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antiox12030695>
- Reiter, R. J., Tamura, H., Tan, D. X., & Xu, X. Y. (2014). Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril*, 102(2), 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.014>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*, 81(3), 445-456. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075655>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Tamura, H., Cruz, M. H., & Fuentes-Broto, L. (2014). Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. *Gynecol Endocrinol*, 30(2), 83-89. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.849238>
- Ronnberg, L., Kauppila, A., Leppaluoto, J., Martikainen, H., & Vakkuri, O. (1990). Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 71(2), 492-496. <https://doi.org/10.1210/jcem-71-2-493>
- Sadeghpour, S., Ghasemnejad-Berenji, M., Maleki, F., Behrooz-Lak, T., Bahadori, R., & Ghasemnejad-Berenji, H. (2025). The effects of melatonin on follicular oxidative stress and art outcomes in women with diminished ovarian reserve: a randomized controlled trial. *J Ovarian Res*, 18.5, (1) <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01584-0>
- Salehnia, M., & Zavareh, S. (2013). The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *Int J Fertil Steril*, 7(2), 74-81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520467>
- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C. A., Carrascosa-Salmoral, M. P., Naranjo, M. C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., & Guerrero, J. M. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*, 44(5), 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.002>
- Seino, T., Saito, H., Kaneko, T., Takahashi, T., Kawachiya, S., & Kurachi, H. (2002). Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 77(6), 1184-1190. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03103-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03103-5)
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4), 1467-1462. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108>
- Sifer, C., Blanc-Layrac, G., Bringuier, A. F., Porcher, R., Madelenat, P., Feldmann, G., & Benifla, J. L. (2003). Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone agonist and Follicle Stimulating Hormone on the incidence of apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110(1), 43-48. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(03\)00092-7](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00092-7)
- Smeenk, J. M., Sweep, F. C., Zielhuis, G. A., Kremer, J. A., Thomas, C. M., & Braat, D. D. (2007). Antimüllerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 87(1), 223-226. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.019>

- Sohal ,R. S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med*, 33(1), 37-44. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00856-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00856-0)
- Song, C., Peng, W., Yin, S., Zhao, J., Fu, B., Zhang, J., Mao, T., Wu, H., & Zhang, Y. (2016). Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Sci Rep*, 6, 35165. <https://doi.org/10.1038/srep35165>
- Sun, F. Y., Lin, X., Mao, L. Z., Ge, W. H., Zhang, L. M., Huang, Y. L., & Gu, J. (2010). Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia. *J Pineal Res*, 33(1), 48-56. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2002.01891.x>
- Sun, Y. C., Sun, X. F., Dyce, P. W., Shen, W., & Chen, H. (2017). The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int J Biol Sci*, 13(4), 449-457. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18836>
- Tain, Y. L., & Hsu, C. N. (2024). Melatonin Use during Pregnancy and Lactation Complicated by Oxidative Stress: Focus on Offspring's Cardiovascular-Kidney-Metabolic Health in Animal Models. *Antioxidants (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/antiox13020226>
- Taketani, T., Tamura, H., Takasaki, A., Lee, L., Kizuka, F., Tamura, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Shimamura, K., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2011). Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *J Pineal Res*, 51(2), 207-213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00878.x>
- Talpur, H. S., Chandio, I. B., Brohi, R. D., Worku, T., Rehman, Z., Bhattarai, D., Ullah, F., JiaJia, L., & Yang, L. (2018). Research progress on the role of melatonin and its receptors in animal reproduction: A comprehensive review [Review]. *Reprod Domest Anim*, 53(4), 831-849. <https://doi.org/10.1111/rda.13188>
- Tamura, H., Jozaki, M., Tanabe, M., Shirafuta, Y., Mihara, Y., Shinagawa, M., Tamura, I., Maekawa, R., Sato, S., Taketani, T., Takasaki, A., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2020). Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. *Int J Mol Sci*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031135>
- Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L. C., Tan, D. X., Sugino, N., & Reiter, R. J. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril*, 92(1), 328-343. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.016>
- Tamura, H., Nakamura, Y., Terron, M. P., Flores, L. J., Manchester, L. C., Tan, D. X., Sugino, N., & Reiter, R. J. (2008). Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol*, 25(3), 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.03.005>
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, 44(3), 280-287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x>
- Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y., & Sugino, N. (2012). The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-5>
- Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y., & Sugino, N. (2013). Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J*, 60(1), 1-13. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej12-0263>
- Tamura, I., Tamura, H., Kawamoto-Jozaki, M., Shirafuta, Y., Fujimura, T., Doi-Tanaka, Y., Mihara, Y., Taketani, T., & Sugino, N. (2022). Effects of Melatonin on the Transcriptome of Human Granulosa Cells, Fertilization and Blastocyst Formation. *Int J Mol Sci*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126731>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, 42(1), 28-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>
- Tan, S. C., & Yip, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>

- Tarocco, A., Caroccia, N., Morciano, G., Wieckowski, M. R., Ancora, G., Garani, G., & Pinton, P. (2019). Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death Dis*, 10(4), 317. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>
- Tatone, C., Amicarelli, F., Carbone, M. C., Monteleone, P., Caserta, D., Marci, R., Artini, P. G., Piomboni, P., & Focarelli, R. (2008). Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update*, 14(2), 131-142. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm048>
- Thompson, L. P., & Al-Hasan, Y. (2012). Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy*, 2012, 582748. <https://doi.org/10.582748/2012/1155>.
- Tijmes, M., Pedraza, R., & Valladares, L. (1996). Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*, 61(2), 65-68. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(95\)00197-x](https://doi.org/10.1016/0039-128x(95)00197-x)
- Tomas-Zapico, C., & Coto-Montes, A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*, 39(2), 99-104. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x>
- Tong, J., Sheng, S., Sun, Y., Li, H., Li, W. P., Zhang, C., & Chen, Z. J. (2017). Melatonin levels in follicular fluid as markers for IVF outcomes and predicting ovarian reserve [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Reproduction*, 153(4), 443-451. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0641>
- Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol*, 36(7), 1083-1100. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(01\)00120-6](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00120-6)
- Veiga, E. C. A., Samama, M., Ikeda, F., Cavalcanti, G. S., Sartor, A., Parames, S. F., Baracat, E. C., Ueno, J., & Junior, J. M. S. (2024). Melatonin improves fertilization rate in assisted reproduction: Systematic review and meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)*, 79, 100397. <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2024.100397>
- Verteramo, R., Pierdomenico, M., Greco, P., & Milano, C. (2022). The Role of Melatonin in Pregnancy and the Health Benefits for the Newborn. *Biomedicines*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123252>
- Walecka-Kapica, E., Chojnacki, J., Stepień, A., Wachowska-Kelly, P., Klupinska, G., & Chojnacki, C. (2015). Melatonin and female hormone secretion in postmenopausal overweight women. *Int J Mol Sci*, 16(1), 1030-1042. <https://doi.org/10.3390/ijms16011030>
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., Tan, D., Reiter, R. J., & Liu, G. (2013). Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *J Pineal Res*, 55(3), 267-274. <https://doi.org/10.1111/jpi.12069>
- Wang, G. F., Dong, Q., Bai, Y., Yuan, J., Xu, Q., Cao, C., & Liu, X. (2017). Oxidative stress induces mitotic arrest by inhibiting Aurora A-involved mitotic spindle formation. *Free Radic Biol Med*, 103, 177-187. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.031>
- Weenen, C., Laven, J. S., Von Bergh, A. R., Cranfield, M., Groome, N. P., Visser, J. A., Kramer, P., Fauser, B. C., & Themmen, A. P. (2004). Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 10(2), 77-83. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah015>
- Weiss, A., Neril, R., Geslevich, J., Lavee, M., Beck-Fruchter, R., Golan, J., & Shalev, E. (2014). Lag time from ovulation trigger to oocyte aspiration and oocyte maturity in assisted reproductive technology cycles: a retrospective study. *Fertil Steril*, 102(2), 419-423. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.041>
- Woo, M. M., Tai, C. J., Kang, S. K., Nathwani, P. S., Pang, S. F., & Leung, P. C. (2001). Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(10), 4789-4797. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7912>
- Wu, Y., Huang, W., Tang, L., Feng, Y., Chen, H., Pan, M., Peng, J., Li, C., & Wang, H. (2025). Melatonin improved the outcomes of women with ART: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Front Reprod Health*, 7, 1680984. <https://doi.org/10.3389/frph.2025.1680984>
- Wurtman, R. J., Axelrod, J., & Potter, L. T. (1964). The Uptake of H³-Melatonin in Endocrine and Nervous Tissues and the Effects of Constant Light Exposure. *J Pharmacol Exp Ther*, 143, 314-318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14161142>
- Xiao, L., Hu, J., Song, L., Zhang, Y., Dong, W., Jiang, Y., Zhang, Q., Yuan, L., & Zhao, X. (2019). Profile of melatonin and its receptors and synthesizing enzymes in cumulus-oocyte complexes of the

- developing sheep antral follicle-a potential estradiol-mediated mechanism. *Reprod Biol Endocrinol*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0446-7>
- Xie, F., Zhang, J., Zhai, M., Liu, Y., Hu, H., Yu, Z., Zhang, J., Lin, S., Liang, D., & Cao, Y. (2021). Melatonin ameliorates ovarian dysfunction by regulating autophagy in PCOS via the PI3K-Akt pathway. *Reproduction*, 162(1), 73-82. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0643>
- Yasuhiko Nakamura, H. T., Hisako Takayama, Hiroshi Kato. (2003). Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and Sterility*®, 80(4), 1012-1016. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)01008-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)01008-2)
- Zhang, M., Lu, Y., Chen, Y., Zhang, Y., & Xiong, B. (2020). Insufficiency of melatonin in follicular fluid is a reversible cause for advanced maternal age-related aneuploidy in oocytes. *Redox Biol*, 28, 101327. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101327>
- Zhang, Y.-T., Bloom, M. S., Zhou, Y., Rehman, S. U., Chu, C., Zhao, K., Yin, B., Lin, Z., Fan, Y.-Y., & Lin, L.-Z. (2025). Transfer patterns of human blood to follicular fluid of per-and polyfluoroalkyl substances with distinct molecular structures and physico-chemical properties. *Journal of Hazardous Materials*, 491, 137933 .
- Zheng, M., Tong, J., Li, W. P., Chen ,Z. J., & Zhang, C. (2018). Melatonin concentration in follicular fluid is correlated with antral follicle count (AFC) and in vitro fertilization (IVF) outcomes in women undergoing assisted reproductive technology (ART) procedures. *Gynecol Endocrinol*, 34-446 ,(5) .450<https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1409713>

الملاحق

Appendices

الملحق رقم (1) : البيانات الأولية لمريضات العينة الإحصائية (الرقم-العمر) كما هي في العام 2023

رقم المريضة	عام الميلاد	العمر
1	1999	24
2	1991	32
3	2000	23
4	1985	38
5	1993	30
6	1996	27
7	1992	31
8	1989	34
9	1990	33
10	1998	25
11	1992	31
12	1992	31
13	1985	38
14	1996	27
15	1987	36
16	1991	32
17	1995	28
18	1996	27
19	1998	25
20	1987	36
21	2004	19
22	1988	35
23	1985	38
24	1997	26
25	1994	29
26	1985	38
27	1996	27
28	2000	23
29	1987	36
30	1997	26
31	2000	23
32	2002	21
33	2004	19
34	1994	29
35	1991	32
36	2004	19
37	1989	34
38	2005	18
39	1996	27
40	1992	31
41	1998	25
42	1990	33

الملحق رقم (2) : البيانات الأولية لمريضات العينة الإحصائية (الرقم-العمر-نتيجة الحمل) في العام 2023

نتيجة الحمل	العمر	رقم المريضة
سلبية	24	1
ايجابي	32	2
ايجابي	23	3
سلبية	38	4
سلبية	30	5
سلبية	27	6
ايجابي	31	7
سلبية	34	8
ايجابي	33	9
ايجابي	25	10
سلبية	31	11
ايجابي	31	12
ايجابي	38	13
سلبية	27	14
سلبية	36	15
ايجابي	32	16
ايجابي	28	17
سلبية	27	18
ايجابي	25	19
ايجابي	36	20
سلبية	19	21
سلبية	35	22
سلبية	38	23
سلبية	26	24
ايجابي	29	25
سلبية	38	26
سلبية	27	27
سلبية	23	28
ايجابي	36	29
سلبية	26	30
سلبية	23	31
سلبية	21	32
ايجابي	19	33
سلبية	29	34
سلبية	32	35
سلبية	19	36
سلبية	34	37
سلبية	18	38
سلبية	27	39
ايجابي	31	40
ايجابي	25	41
سلبية	33	42

الملحق رقم (3) : البيانات الإحصائية الكمية لمريضات العينة الإحصائية كما هي في العام 2023

عدد الأجنة	بيوض تالفة ATRETIC	بيوض غير ناضجة GV	M2	M1	جودة البويضات حسب العدد M1+M2	RQ	نسبة الميلاتونين بالمائل الجريبي	نسبة الميلاتونين بالدم	عدد الخلايا بالمائل	العمر	رقم المريضة
4	0	2	10	3	13	2.94854	70	10	1950000	24	1
2	0	0	3	3	6	3.41054	18	12	1600000	32	2
4	0	0	5	1	6	0.55095	25	38	625000	23	3
3	0	3	7	3	10	0.43227	24	14	1037500	38	4
3	0	2	2	3	5	0.18175	64	8	2337500	30	5
3	0	2	2	2	4	0.00047	52	18	262500	27	6
3	0	0	2	4	6	0.00195	184	150	2175000	31	7
2	0	0	3	2	5	0.07589	18	58	375000	34	8
6	2	5	8	2	10	0.00067	80	36	565000	33	9
3	3	6	15	4	19	0.00093	23	27	657500	25	10
5	0	5	14	6	20	0.17076	34	14	295000	31	11
6	0	3	9	3	12	0.37893	34	10	185000	31	12
6	0	2	9	2	11	0.46652	58	8	430000	38	13
7	0	8	14	5	19	0.56253	106	86	477500	27	14
1	0	0	2	0	2	0.72196	28	10	182500	36	15
6	3	5	32	10	42	0.10153	182	22	600000	32	16
2	0	5	16	6	22	0.00102	90	82	1365000	28	17
0	16	3	22	15	37	0.98623	18	22	685000	27	18
4	1	1	3	2	5	0.36857	46	22	947500	25	19
3	0	0	14	5	19	1.42405	50	32	1112500	36	20
6	0	4	15	2	17	0.35111	66	28	872500	19	21
2	0	2	3	1	4	1.18921	80	0	1245000	35	22
0	1	0	0	0	0	0.90125	28	82	562500	38	23
2	0	0	2	1	3	1.43396	66	18	1345000	26	24
6	0	9	13	4	17	2.34567	10	94	797500	29	25
5	0	4	11	4	15	2.67586	30	14	1425000	38	26
3	0	6	4	6	10	1.25701	134	8	1025000	27	27
6	0	1	21	9	30	1.20581	104	64	877500	23	28
3	0	4	8	1	9	1.6245	76	38	1765000	36	29
2	0	4	7	5	12	1.70527	54	18	1727500	26	30
6	0	0	13	4	17	1.44393	72	32	912500	23	31
4	1	0	10	0	10	1.87905	64	48	1240000	21	32
0	0	0	0	0	0	3.63008	60	58	725000	19	33
3	0	1	4	1	5	0.6783	52	20	660000	29	34
5	0	3	10	3	13	0.5905	74	30	290000	32	35
6	0	3	14	4	18	0.61132	86	134	1142500	19	36
0	0	1	1	4	5	0.00082	62	24	482500	34	37
5	0	4	18	3	21	0.00148	53	52	1700000	18	38
6	0	1	13	3	16	0.00051	72	88	515000	27	39
4	4	2	8	2	10	0.11502	182	340	1300000	31	40
6	2	11	21	7	28	0.6071	84	30	1285000	25	41
2	1	0	2	0	2	1.81504	50	30	1205000	33	42

Abstract

Melatonin is a hormone secreted by the pineal gland and regulated by the circadian rhythm; it plays a crucial role as a potent antioxidant and a regulator of ovarian functions. Oocyte quality and maturation within the ovarian follicle are crucial determinants for the success of Assisted Reproductive Technologies (ART) and pregnancy outcomes. Ovarian granulosa cells play a vital role in sustaining the microenvironment necessary for oocyte development and protecting it against oxidative stress. This study aimed to evaluate the efficiency of a locally modified method for isolating granulosa cells using Percoll density gradient centrifugation, measure melatonin levels as a potent antioxidant in both blood serum and follicular fluid, determine the gene expression of Melatonin Receptor 1 (MT1) in these cells, and correlate these parameters with oocyte quality and successful pregnancy outcomes. The study population comprised 42 women (under 38 years of age) undergoing assisted reproduction (IVF/ICSI) due to unexplained or male-factor infertility. The results demonstrated that the Percoll gradient technique was highly efficient and rapid in isolating pure granulosa cells while avoiding contamination with red and white blood cells. Molecular analysis via Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) revealed a prominent gene expression of the MT1 receptor in 15 of the studied cases, where the Relative Quantification (RQ) value exceeded 1. Furthermore, ROC curve analysis indicated that an RQ value threshold above 3.1795 serves as a strong prognostic biomarker predicting a significantly higher probability of positive pregnancy outcomes. Conversely, no statistically significant linear correlation was established between total melatonin levels (in serum or follicular fluid) and definitive pregnancy success, suggesting that successful pregnancy is a multifactorial outcome heavily influenced by localized, molecular receptor responses within the ovarian follicle.

Keywords: Melatonin - Follicular Fluid - Percoll Gradient - Granulosa Cells – ELISA - Ovarian Reactive Oxygen Species (ROS).

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Science
Department of Animal Biology



A Study of Melatonin and its Receptor in Ovarian Granulosa Cells

Case Study: Its Effect on Pregnancy Outcomes in Patients Undergoing Assisted Reproductive Technology

A dissertation submitted in fulfilment of the requirements for
the degree of (PhD) in Biology

Prepared By:

Walaa Issam Naji

Supervisors

Principal Supervisor:

Prof. Dr. Ameera Omari

Faculty of Science
Damascus University

Co-Supervisor:

Prof. Dr. Marwan Alhalbi

Faculty of Medicine
Damascus University

2025/2026

إعلان

استناداً لقرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا رقم **3466** تاريخ **2026/8/3** المتضمن تشكيل لجنة الحكم على رسالة الدكتوراه في قسم علم الحياة الحيوانية بكلية العلوم جامعة دمشق التي أعدتها الطالبة **ولاء عصام ناجي** لنيل درجة الدكتوراه بإشراف: **أ. د. أميرة أومري** ومشاركة **أ. د. مروان الحلبي**

بعنوان: ((دراسة الميلاتونين ومستقبله في الخلايا الحبيبية المبيضية حالة دراسية: تأثيره على نتاج الحمل لدى المريضات الخاضعات للإخصاب المساعد))

المؤلفة من السادة الأساتذة:

عضواً ومشرفاً	الأستاذ في قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم جامعة دمشق (الاختصاص: علم الجنين والنسج الحية)	أ. د. أميرة أومري
عضواً	الأستاذ في قسم التوليد وأمراض النساء - كلية الطب البشري جامعة دمشق (الاختصاص: توليد ونسائية)	أ. د. صلاح الشیخة
عضواً	الأستاذ المساعد في قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم جامعة دمشق (الاختصاص: علم الجنين الجزيئي)	د. شادي سكرية
عضواً	المدرس في قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم جامعة دمشق (الاختصاص: البيولوجية الجزيئية)	د. رنا العجوري
عضواً	المدرس في قسم التشريح والنسج والجنين - كلية الطب البشري جامعة دمشق (الاختصاص: وراثه وهندسة وراثية)	د. سامر الزعبي

وذلك في تمام الساعة **12:00 ظهراً** من يوم **الأحد** الواقع في **2026 / 8 / 16** في **المدرج الثالث مبنى الفيزياء** لمناقشة الطالبة في رسالتها والحكم عليها.

عميد كلية العلوم
أ. د. عبد الناصر دركل

نائب العميد للشؤون العلمية
أ. د. سمر النحاس

دراسة الميلاتونين ومستقبله في الخلايا الحبيبية المبيضية حالة دراسية: تأثيره على نتاج الحمل لدى المريضات الخاضعات للإخصاب المساعد

إعداد الباحثة: **ولاء عصام ناجي** وبإشراف أ.د. أميرة الأومري و مشاركة أ.د. مروان الحلبي
قسم علم الحياة الحيوانية- كلية العلوم- جامعة دمشق

المقدمة

الميلاتونين هو هرمون تفرزه الغدة الصنوبرية وتنظمه الساعة البيولوجية، وله دور مهم جداً كمضاد قوي للأكسدة ومنظم لوظائف المبيض. تحدد جودة البويضة ونضجها داخل الجريب المبيضي نجاح عمليات الإخصاب المساعد ونتاج الحمل، حيث تلعب الخلايا الحبيبية المبيضية دوراً حيوياً ومباشراً في توفير البيئة الحيوية الملائمة لنمو البويضة وحمايتها من

أهداف البحث

انطلاقاً من دور الميلاتونين غير الواضح في فيزيولوجيا المبيض للإنسان وخاصة أن السائل الجريبي يحتوي على تراكيز عالية من الميلاتونين وأعلى بثلاثة أضعاف تقريباً من تراكيزها في الدم وبشكل رئيسي في الجريبات قبل عملية الإباضة.

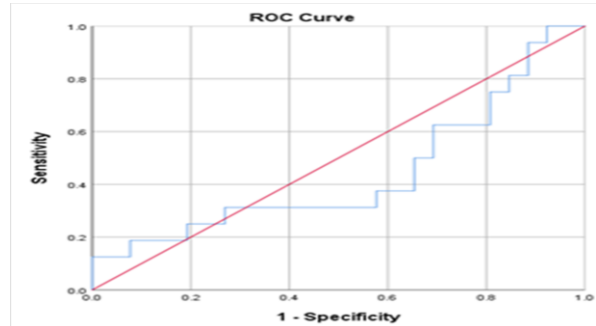
أهداف البحث

- عزل الخلايا الحبيبية من السائل الجريبي باستعمال البيركول.
- عزل الحمض الريبي النووي من الخلايا الحبيبية المستخلصة واصطناع الدنا المتمم لأجل الدراسة الجزيئية التي تهدف لقياس كمية التعبير الجيني لمستقبل الميلاتونين MT1
- التحري عن تأثير الميلاتونين على جودة الخلية البويضية وعلى نتاج الحمل عند بعض النساء الخاضعات لتقانة الإخصاب المساعد.

النتائج

أظهرت النتائج نجاحاً عالياً لمدرج بيركول في عزل وفصل الخلايا الحبيبية بنقاوة ممتازة وحمايتها من التلوث بخلايا الدم الأخرى. كما كشف التحليل الجزيئي بواسطة تقنية الـ RT-qPCR عن وجود تعبير جيني واضح لمستقبل الميلاتونين الأول (MT1) في 15 حالة من الحالات المدروسة (حيث تجاوزت قيمة التعبير النسبي RQ الواحد الصحيح). وبين تحليل منحني ROC التشخيصي أن زيادة قيمة الـ RQ عن 3.1795 تعد مؤشراً حيوياً قوياً يتنبأ بارتفاع احتمالية الحصول على نتيجة حمل إيجابية. في المقابل، لم يثبت إحصائياً وجود فروق ذات دلالة حاسمة تربط مستويات هرمون الميلاتونين الإجمالية في الدم أو السائل الجريبي مباشرة مع نتاج الحمل الإجمالي.

تحليل حساسية ونوعية RQ ونتيجة الحمل



منحني ROC لقيم RQ حسب متغير نتيجة الحمل

Area Under the Curve				
Test Result Variable(s): RQ				
Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0.440	0.097	0.517	0.250	0.630

Under the nonparametric assumption

Null hypothesis: true area = 0.5

المساحة تحت المنحنى وقيمة اختبار المغنوية حسب متغير نتيجة الحمل وفق RQ

الاستنتاجات

1. تم التأكيد على أن العزل بتقنية بيركول هي الطريقة الأفضل والأنسب والأجود.
2. لا علاقة للعمر وعدد الخلايا الحبيبية بجودة البويضات.
3. لا يوجد علاقة بين نسبة الميلاتونين في الدم أو السائل الجريبي بجودة البويضات.