مجلة جامعة دمشق للعلوم الطبية المجلد: (40) العدد: 4 (2024) الصفحات: (246-267)

أَثر المُستويات الجُريبيَة للهُرمون المُضاد للمولر على نتائج الإِخْصَاب فِي المُختَبر لدَى سيدات سويات الإِباضة خلال بروتوكولات مُختلفة من تحريض المَبيض المُراقَب

سالي سعيد قدورة[1*]، مروان جميل الحلبي[2]، عبد الحكيم محمود نتوف[3]

*1 طالبة دكتوراة (معيدة) قسم الصّيدلانيّات والتّكنولوجيا الصّيدليّة، كلية الصّيدلة، جامعة دمشق، دمشق، الجمهوريّة العربيّة السّوريّة.

2أستاذ في قسم النّسج والتّشريح والجنين، كلية الطب، جامعة دمشق، دمشق، الجمهوريّة العربيّة السّوريّة.

2رئيس وحدة الإخْصَاب المساعد، مُستشفى الشّرق، دمشق، الجمهوريّة العربيّة السّوريّة .

3أستاذ مساعد في قسم الصّيدلانيّات والتّكنولوجيا الصّيدليّة، كلية الصّيدلة، جامعة دمشق، دمشق، الجمهوريّة العربيّة السّوريّة.

الملخص:

خلفية البحث وهدفه: يلعب الهُرمون المُضاد للمُولّر Anti Müllerian Hormone (AMH) دوراً جوهريّاً في تنظيم تطوّر الجُريبات فِي المَبيض، إلا أنَّ المعلومات المتوفرة حالياً والّتي تربط ما بين مُستوياته الجُريبيَّة (FF AMH) ونتائج الإِخْصَاب فِي المُختَبر لدَى السَّيدات سويات الإِباضة محدودة، مُتضاربة، ومُستسقاة فِي معظمها مِن دراساتٍ اعتمدت البروتوكول الطَّويل لناهِضَات GnRH بروتوكولاً للتَّحريض. لذلك أُجريت هذ الدّرَاسَة لتوضيح العلاقات ما بين AMH FF ونتائج الإِخْصَاب فِي المُختَبر لدَى السَّيدات سويات الإِباضة خلال بروتوكولات مُختلفة من تحريض المَبيض المُراقَب.

مواد البحث وطرائقه: شملت عينةُ البحث لهذه الدّرَاسَة الاستباقيَّة 83 سيدة سوية الإِباضة (مَجمُوعة نَاهِضات(n=50) GnRH ، مَجمُوعة ضَواد GnRH (n=33))من المُراجِعَات لمُستشفى الشّرق للإخصَاب ومُعالجة العقم وأَطفال الأَنابيب فِي دمشق والرّاغبات بإجراء إِخْصَاب فِي المُختَبر فِي الفَتْرَة المُمتدة بين شهري كانون الأَول 2019 وآب 2021. جُمِعَت عيناتُ السَّائل الجُريبيّ يوم بزل البيوض، وتمَّت مُقايسة المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH (FF AMH) باستخدام عَتائِد اليزا. كما تمَّ التَّحري عن نتائج الإِخْصَاب فِي المُختَبر الجنينيَّة والسَّريريَّة على حد سواء. حُسِبَ معامل الارتباط Spearman Rank لتقييم عَلاقات الارتباط ما بين مُتغيرات الدّرَاسَة، كما حُسِبَت المساحة تحت مُنحنى ROC (Receiver Operating Characteristic)لتقييم دقة FF AMH للتَّنبؤ بتحقق الحمل لدَى المُشاركَات.

النتائج: لم تُلاحظ أَيَّة فروقات يُعتد بها إحصائيّاً فى الخصائص البدئيَّة ما بين السَّيدات المُشاركَات فِى كلتا مَجموعَتى الدّرَاسة. لُوحِظَت علاقةُ ارتباطٍ عكسيَّةٍ ما بين المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH والجرعة الكليَّة المُستهلكة مِن FSH فِى كلتا المَجمُوعَتين (مَجمُوعَة GnRH Agonist، r=-0.515 ،P<0.001؛ مَجمُوعَة GnRH Antagonist، r=-0.420، P=0.015). ارتبطت مُستويات FF AMH طرديّاً مع مَنْسَب حساسيَّة المبيض OSI فِى مَجمُوعَة(r=0.514 GnRH Agonist ، (P<0.001، وقاربت العلاقة مع عَدد الخَلايا البيضيَّة المُسترجَعة من بلوغ الدَّلالة الإِحْصَائيَّة(r=0.245 ، .(P=0.087فى المُقابل، ارتبطت مُستويات FF AMH عكسيّاً مع عدد الخَلايا البيضيَّة النَّاضِجَة(r=-0.404 MII ، (P=0.020، عدد اللواقح(r=-0.439 ، (P=0.011، وعدد الأجنَّة المُستحصَلة(r= 0.439 ، (P=0.011فِى مَجمُوعَة GnRH Antagonist ، وقاربت العلاقة مع عَدد الخَلايا البيضيَّة المُسترجَعة من بلوغ الدَّلالة الإِحْصَائيَّة(r=-0.326 ، .(P=0.064بينما لم تُلاحظ أَيَّة علاقة ما بين مُستويات FF AMHومُعدَّل نضج الخَلايا البيضيَّة، مُعدَّل الإِخْصَاب، مُعدَّل الأَجنَّة عالية الجودة، مُعدَّل التَّشطُّر، أَو مُعدَّل الانغراس فِى أَي مَجمُوعَة. علاوة على ذلك، لم تُلاحظ أَيَّة فروقاتٍ يُعتد بها إحصائيّاً فِى المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH ما بين السَّيدات الحَوامل واللاتى لم يتحقق لديهن الحَمل، وهو ما تمَّ تأكيده مِن خلال تحليل منحنى.ROC

الاستنتاج: تُؤثِّر المُستويات المُرتفعة من FF AMH سلباً على تطوّر الجُريبات خلال البروتوكول المَرن من ضَوَادGnRH ، بينما تتغلب التَّروية الدّمويَّة الجيدة للجُريب خلال البروتوكول الطَّويل مِن نَاهِضَات GnRH على تأثيراتFF AMH ، وتُحسِّن مِن مردود البيوض المُسْترجَعة.

الكلمات المفتاحية: الهُرمون المُضاد للمولر، الإِخْصَاب فِي المُختَبر، حقن النِّطَاف داخِلَ الهَيولَى، نَاهِضَات GnRH، ضَوَاد GnRH.

تاريخ الإيداع: 2022/4/8 تاريخ القبول: 2022/5/19

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب **CC BY-NC-SA**

ISSN: 2789-7214 (online)

http://journal.damascusuniversity.edu.sy

Effect of follicular fluid levels of AMH on IVF/ICSI outcomes among normo ovulatory women during different controlled hyperstimulation protocols

Sally Saied Kadoura[*1], Marwan Jamil Alhalabi[2], Abdulhakim Mahmoud Nattouf [3]

[*1]PhD candidate (Teaching Assistant) in the Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic. sally.kadoura@damascusuniversity.edu.sy

[2] Professor in the Department of Embryology and Reproductive Medicine, Faculty of Medicine, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic. Profalhalabi@damascusuniversity.edu.sy

[2] Head of Assisted Reproduction Unit, Orient Hospital, Damascus, Syrian Arab Republic.

[3] Associated Professor in the Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic. Abdulhakim.nattouf@damascusuniversity.edu.sy

Abstract:

Introduction: Anti-Müllerian hormone (AMH) plays a pivotal role in the regulation of ovarian folliculogenesis. However, the data link between its follicular fluid levels (FF AMH) and the IVF/ICSI outcomes in normo ovulatory women are limited, contradicted, and mainly obtained from Long-GnRH agonist cycles. Thus, we conducted this study to compare the correlations between the FF AMH levels and the IVF/ICSI outcomes in normo ovulatory women during different controlled hyperstimulation protocols.

Methods: A total of 83 normo ovulatory women (GnRH agonist group, n=50; GnRH antagonist group, n=33) who were referred to the Assisted Reproductive Unit of Orient Hospital, Damascus, Syrian Arab Republic, from December 2019 to August 2021 were included in this prospective trial. Follicular fluid samples were collected on the retrieval day, and the FF AMH levels were measured using ELISA Kits. In addition, the embryological and clinical IVF/ICSI outcomes were detected. Spearman rank correlation coefficients were computed to assess the correlations among the studied parameters. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) was used to evaluate the accuracy of FF AMH levels in predicting pregnancy rates among participants.

Results: The patients' baseline characteristics were comparable between the studied groups. FF AMH levels were negatively correlated with the total FSH dose in both groups (GnRH agonist group, r=-0.515, P<0.001; GnRH antagonist group, r=-0.420, P=0.015)

FF AMH levels were positively correlated with ovarian sensitivity index (OSI) in the GnRH agonist group (r=0.514, P<0.001), and the correlation with the number of retrieved oocytes trend to be significant (r=0.245, P=0.087). Negative correlations were noted between FF AMH levels and M II oocytes (r=-0.404, P=0.020), fertilized oocytes (r=-0.439, P=0.011), number of obtained embryos (r=-0.439, P=0.011) in the GnRH antagonist group, and the correlation with the number of retrieved oocytes trend to be significant (r=-0.326, P=0.064). However, there were not any correlations between FF AMH levels and the rates of oocyte maturation or fertilization, or with the high quality embryo rate, embryos cleavage rate, or implantation rate in any of the studied groups. In addition, no significant differences were noted in FF AMH levels between pregnant and non pregnant women in any of the studied groups, which also was confirmed by the Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve analysis.

Conclusions: High FF AMH negatively affects ovarian folliculogenesis during the flexible GnRH antagonist protocol. However, the good follicular angiogenesis during the long GnRH agonist protocol overcomes FF AMH effects and improves the retrieved oocytes' yield.

Keywords: Anti-Müllerian Hormone, Amh, In-Vitro Fertilization, Ivf, Intra-Cytoplasmic Sperm Injection, Icsi, Gnrh Agonist, Gnrh Antagonist.

Submitted: 8/4/2022 Accepted:19/5/2022

Copyright: Damascus University Syria.
The authors retain copyright under CC BY-NC-SA

المُقدمة Introduction:

يُعاني مَا يزيدُ عَن 186 مليون شخص حول العَالم مِن العقم؛ إذْ يُصيب ما بين 8-12% مِنَ الأَزواج فِي سِنِّ الإنجاب، وتتزايدُ المُشكلةُ سوءً فِي البلدانِ النَّاميةِ (Vander Borght *et al.*, 2018, pp. 2–10). طُوِّرَت العديد مِن التّقنيات لتحسين احتماليّة تحقيق حمل ناجح لدَى هؤلاء الأَفراد، ومِن أَهم هَذهِ التّقنيات؛ تقنية الإخصاب فِي المُختبَر In-Vitro Fertilization (IVF). تتطلب هذه التّقنية جَمع الخَلايَا البيضيَّة النَّاضِجَة ومِن ثمَّ تخصيبها بالنّطاف خَارِج الجسم، وتُعاد بعدها الأَجنَّة المُتشكّلة إلى تجويفِ الرَّحمِ (Farquhar *et al.*, 2019, p. 7; Kaser *et al.*, 2019, p. 779–822.e16). ولزيادة احتماليّة نجاح عمليات IVF لابد مِن الحصول على عددٍ كافٍ مِن الخَلايَا البيضيَّة النَّاضِجَة ليتم عليها الإخصاب، لذلك يتم تحريض المَبيض على تطوير عدة جُريباتٍ مُسيطرةٍ مما يتعارض مع الحالة الفيزيولوجية الطبيعيَّة والّتي تشترط تطورَ جُريبٍ مُسيطرٍ وحيد خلال الدَّورة الحَيضيَّة الواحِدَة (Fauser *et al.*, 2019, p. 743–778.e7). لذلك استُخدِمَت نَاهِضَات الهُرمُون المُطلِق لمُوجِّهَات الغُدَد التَّناسُلِيَّة Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists (GnRH Agonists) فِي بروتوكولات فَرط تحريض المَبيض المُراقب Controlled Ovarian Hyperstimulation (COH) منذ ثمانيات القرن المَاضي لمنع حدوث إباضَة مُبكرة أَو دفقة مُبكرة للهُرمُون المُلوتِن Premature Luteinizing Hormone Surge بينما لاتزال الخَلايَا البيضيَّة غير نَاضِجَة، ومنع اللوتنة المُبكرة للخَلايَا الحُبيبيَّة، مما يزيدُ مِن عددِ الخَلايَا البيضيَّة المُسترجَعة ومُعدَّلات الحَمل المُحققة، كمَا يُنقِص مِن مُعدَّل إلغاء الدَّورَات (Copperman *et al.*, 2013, p. 20; Kaser *et al.*, 2019, p. 779–822.e16). تزيدُ نَاهِضَات GnRH إفراز الهُرمُون المُلوتِن Luteinizing Hormone (LH) والهُرْمون المُنَبِّه للجُرَيب Follicle-Stimulating Hormone (FSH) فِي البداية (الطور النَّاهض Agonist Phase)، ولكن مع استمرار التَّعرض لهَذهِ العَوامِل يُثبَّط إنتاج مُوجِّهَات الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة مِن خلال التَّنظيم نزولاً Downregulation لمُستقبلات GnRH النّخاميَّة (Kaser *et al.*, 2019, p. 779–822.e16). يُطيلُ الطور التَّحريضيّ البدئيّ لناهِضات GnRH الفترة اللّازمة للوصول إلى مرحلة التَّثبيط، مما ينعكس سلباً على التَّكلفة الإجماليَّة للبروتوكول، كمَا يزيدُ من خطر تطوير كيسات مبيضيَّة، وأَعراض فقدان الاستروجين (كسب وزن، صداع، هبَّات ساخِنَة Hot Flushes، تعرق ليليّ، تقلبات المزاج، آلام فِي الثَّدي والبطن...) لدَى السّيَدات المُعالَجات. لذلك أُستُخدِمَت ضواد الهُرمُون المُطلِق لمُوجِّهَات الغدد التَّناسليَّة GnRH Antagonists مُنذ أواخر تسعينات القرن المَاضي فِي بروتوكولات COH لمنع حدوث دفقة مبكرة لهُرمُون LH (Vloeberghs *et al.*, 2011, pp. 80–86; Copperman *et al.*, 2013, p. 20). تمارسُ GnRH Antagonists تأثيراتها مِن خلال الحجب التَّنافسي لمُستقبلات GnRH النّخاميَّة (Copperman *et al.*, 2013, p. 20). وبخلاف GnRH Agonists، تنقصُ الضواد تركيز مُوجِّهَات الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة بعد عدة ساعات مِن الاستخدام، ولا تمتلك أَية تأثيراتٍ بدئيةٍ مُحرِّضَة (Vloeberghs *et al.*, 2011, pp. 80–86).

تشيرُ بعض الدّراسات إلى تبدُّل البيئة الجريبيَّة بفعل بروتوكولات تحريض المبيض المُراقب (Jancar *et al.*, 2009, pp. 2069–2071; Baskind *et al.*, 2014, p. 218769; von Wolff *et al.*, 2014, pp. 1049–1057; Wu *et al.*, 2015, pp. 417–427)، ولكن من غير المعروف إلى حد الآن مدى اتساق هذه التَّغيرات ما بين البروتوكولات المختلفة. ينتمي الهُرمُون المُضاد للمُولِّر، أَو ما يُعرف بالمادة المُثبِّطة للمُولِّر

Müllerian Inhibiting Substance (MIS)، إلى عائلة عامل النَّمو المحوّل بيتا Transforming Growth Factor β (TGF-β)، وهو عبارة عن بروتين سُكَّرِيّ مَثْنَوِيّ، يلعبُ دوراً هاماً فِي تنظيم تطوّر الجُريبات (Rey *et al.*, 1998, pp. 17–33; Jancar *et al.*, 2008, pp. 640–648). تُستخدَم مُستويات AMH المَصليَّة على نطاقٍ واسعٍ فِي عيادات العقم كواصماتٍ حيويَّةٍ للتَّنبؤ بمخزون المبيض Penzias Ovarian Reserve) (*et al.*, 2020, pp. 1151–1157، إلا أَنَّها غير قادرة على التَّنبؤ باحتمالية تحقق الحَمل فِي حالات الإخْصَاب الطَّبيعي (Lin *et al.*, 2021, p. 1260)، ولا تزال النَّتائج حول نجاعتها فِي التَّنبؤ باحتمالية تحقق الحَمل بعد الإخْصاب فِي المُختَبر IVF/ICSI مُتضارِبَة (Wu *et al.*, 2009, pp. 383–389; Sahmay *et al.*, 2012, pp. 589–595; Yao *et al.*, 2015, pp. 1755–1767; Nikmard *et al.*, 2016, pp. 769–776; Pereira *et al.*, 2016, pp. 185–192). كما أَنَّ المعلومات المتوفرة حالياً والّتي تربط ما بين المُستويات الجُريبيَّة للهرمون المُضاد للمولر AMH FF ونتائج الإخْصَاب فِي المُختَبر، ومدى نجاعتها في التَّنبؤ بتحقق الحَمل لدَى السَّيدات سويات الإباضة محدودة، مُتضاربة، ومُستسقاة فِي معظمها مِن دراساتٍ اعتمدت البروتوكول الطَّويل لناهِضَات GnRH بروتوكولاً للتَّحريض (Hattori *et al.*, 2013, pp. 252–256; Lin *et al.*, 2013, pp. 649–655; Mehta *et al.*, 2013, pp. 99–105; Bastu *et al.*, 2015, pp. 30–34; Chen *et al.*, 2017, pp. 1138–1147).

أَهداف الدّراسَة Objectives:

تهدفُ هذه الدراسة إلى تقييم أَثر AMH FF على نتائج الإخْصَاب فِي المُختبر لدَى السَّيدات سويات الإباضة، ومدى نجاعتها فِي التَّنبؤ باحتمالية تحقق الحَمل لديهن. بالإضافة لدرَاسة مدى تأثُّر النَّتائج المُستحصلة بالبروتوكول المُستخدم فِي تحريض المبيض المُراقب (البروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات الهُرْمون المُطْلِق لمُوَجِّهَةِ الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة Long-GnRH Agonist Protocol مقارنةً مع البروتوكول المَرن لضَواد الهُرْمون المُطْلِق لمُوَجِّهَةِ الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة Flexible-GnRH Antagonist Protocol).

المَواد والطرائق Material and Methods:

تصميم الدّراسة Study Design:

دِرَاسَة سريريَّة مضبوطة بشاهد Controlled Clinical Trial، استباقيَّةٌ Prospective، غير مُعشَّاة Non-Randomized، ذاتُ توزيعٍ متوازٍ Parallel. حَظيت هَذهِ الدّرَاسَة عَلى موافقةِ لجنة أَخلاقيات البحث العلميّ فِي كليّة الصَّيدلَة–جامعة دمشق، وسُجِّلَت عَلى موقع ClinicalTrials.gov استباقيّاً، وحَصَلَت عَلى الرّقَم NCT04724343. أُجرِيَت هَذهِ الدّرَاسَة على السَّيدات المُراجِعَات لمُستشفى الشَّرق للإخصَاب ومُعالجة العقم وأَطفال الأَنابيب فِي دمشق والرّاغبات بإجراء إِخْصَاب فِي المُختَبَر فِي الفَترَة المُمتدة بين شهري كانون الأَول 2019 وآب 2021 بعد الحصول على مُوافقتهن المُستنيرة.

أفراد الدراسة Participants:

شملت عينة البحث 83 سيدة سوية الإباضة، وكان العَامِل الذَّكريّ أو العَامِل البوقيّ سبب إجراء الإخصاب فِي المُختَبَر لديهن. تَلقَّت 50 سيدة من المُشارِكات البروتوكول الطويل لنَاهِضَات GnRH، بينما تلقت 33 سيدة البروتوكول المَرن لضَواد GnRH. تم استبعاد السَّيدات بأعمار ≤ 40 سنة، المَريضات الخاضِعَات لعدة محاولات IVF فاشلة (≤ 3 محاولات)، السَّيدات ضعيفات الاستجابة Poor responders (وفق معايير Bologna (Ferraretti *et al.*, 2011, pp. 1616–1624)، المَريضات اللّاتي يُعانين من اضطراب هرمونيّ مرافق (مثل اضطرابات الغدة الدَّرقيَّة، فَرط بروﻻكتين

الـدّم، أورام منتجـة للأنـدروجين، داء كوشـينغ Cushing's syndrome، فَـرْط تَنَسُّـج الكُظْـر الخِلْقِـيّ Congenital Adrenal Hyperplasia، مُتَلاَزِمَـةُ المَبيضِ المُتَعَدِّدِ الكيسات Polycystic Ovary Syndrome)، المَريضات اللّاتي خَضعن مُسـبقاً لاستئصـال أَحـد المبيضـين Unilateral Oophorectomy، المَريضات المُصابات بآفات قد تُؤثر على الانغـراس والحَمـل (مثـل انتبـاذ البطانـة الرَّحميَّـة Endometriosis، الأَورام الليفيَّة، مَوَه البوق Hydrosalpinx، العُضـال الغـديّ الرَّحمـيّ Adenomyosis، أَمـراض المَناعـة الذّاتيَّة)، المَريضـات المُشخَّصَات مُسبقاً بـأَمراض مُزمِنَـة (مثل الأَمراض القلبيَّة الوعائيَّة، الصَّرع، السّكري، اضطرابات الكلية واضطرابات الكبد)، والمَريضات المُشخَّصات مُسبقاً بالسَّرطان.

بروتوكولات فرط تحريض المبيض المُراقَب المُستخدَمة COH Protocols:

مَجموعَة نَاهِضَات GnRH

(Long-GnRH Agonist Protocol):

تَلقَّـت المَريضَـات فِـي هَـذهِ المَجموعَـة البروتوكـول الطويـل لنَاهِضَات GnRH (Long-GnRH Agonist Protocol)؛ إِذْ تمَّ حقنهنَّ بمستحضر Triptorelin Acetate 0.1-0.05 ملغ تحت الجلد (Subcutaneously؛ SC) لمرة واحدة فِي اليوم منذ مُنتصف الطور الأَصفريّ مِن الدّورَة الحَيضيَّة (اليوم 21) إلى يوم إِعطاء مُوجِّهَة الغُدد التَّناسُلية المشيمائيَّة البشريَّة Human Chorionic Gonadotropin (hCG). لدى التَّأكد من وصول تأثير GnRH Agonist لمَرحلة التَّأثير المُثَبِّط، واستيفاء شروط التَّثبيط؛ وصول مستويات الاستراديول المصليَّة لقيم أدنى من 50 بيكوغرام/مل، توفُّر ثخانة رحميَّة بأبعاد أَقل من 5 ملم، مع عدم القدرة عَلى تحري أَي كيسة أَو جريب بأَبعاد تتجاوز 1 سم باستخدام الأَمواج فوق الصَّوتيَّة، تمَّ حقن المَريضات بالشَّكل المُؤشب من الهُرمُون المُنبِّه للجُريب recombinant FSH (r-FSH) و/أَو بمُوجِّهـة الغُـدد التَّناسُـليَّة الإياسـيَّة البَشـريَّة Human Menopausal Gonadotrophin (hMG)، وضُبطت الجُرعـة تبعـاً لاسـتجابة المَريضَـات، والمُقـدرة بمُنـاطرة نمـوّ الجُريبات باستخدام الأَمواج فوق الصَّوتيَّة (Voluson ^{TM} E10، GE Healthcare Ultrasound، الولايات المُتحدة الأَمريكيَّة).

مَجموعَة ضَواد GnRH

(Flexible-GnRH Antagonist Protocol):

تَلقَّت المَريضَات فِي هَذهِ المَجموعَة البروتوكول المرن لضواد GnRH (Flexible-GnRH Antagonist Protocol)؛ إِذْ تمَّ حقنهنَّ بالشَّكل المُؤشب من الهُرمُون المُنبِّه للجُريب r-FSH و/أَو مُوجِّهة الغُدد التَّناسُليَّة الإياسيَّة البَشريَّة فِي اليوم الثَّالث مِن الدّورة الحَيضيَّة، مع ضبط الجرعة تبعاً لاستجابة المَريضَات، والمُقدرة بمُناطرة نموّ الجُريبات باستخدام الأَمواج فوق الصَّوتيَّة (Voluson ^{TM} E10، GE Healthcare Ultrasound، الولايات المُتحدة الأَمريكيَّة). تمَّ إِدخال GnRH Antagonist إِلى البروتوكول بحقن السّيدات بمستحضر Cetrorelix 0.25 ملغ يومياً لمرة واحدة بدءً مِن اليوم الّذي يُلاحظ فيه جُريب مُسيطر على الأَقل بحجم ≤ 14 ملم، إِلى يوم إِعطاء مُوجِّهة الغُدد التَّناسُليَّة الميشمائيَّة البشريَّة hCG.

تحريض الإباضة واسترجاع الخلايا البيضية

Ovulation Triggering and Oocytes Retrieval:

حُقنت المَريضات بـ 10000 وحدة دوليَّة مِن hCG بُغية تحريض الإِباضَة لديهنّ لدَى مُلاحظة 3 جُريبات على الأَقل بقطر أَكبر من 16–17 ملم، ومن ثمَّ أُسترجِعَت الخَلايَا البيضيَّة بعد 35±2 ساعة من ذلك من خلال بَزل الجُريبات المُوجَّه بالتَّصوير المهبليّ بالأَمواج فوق الصَّوتيَّة.

إجراءات الإخصاب فِي المُختَبَر IVF Procedure:

أُستُخدِمت أَوْسَاط وطرق اِسْتِنْبات متماثلة فِي كل مجموعات الدّراسَة.

تَعْرِيَـة الخَلايـا البَيْضـيَّة وتقيـيم درَجـة النَّضـج Oocytes Denudation and Maturation Assessment:

غُسلت معقدات الخَلايا البَيضِيَّة–الخَلايَا الرُّكَاميَّة (Cumulus-Oocyte Complexes؛ COCs) المُستحْصَلة بدايةً باستخدام وَسط G-MOPS ™ Plus (G-MOPS ™ Plus، Vitrolife، السّويد) لصيانة البَاهاء (درجة الحموضة PH) أثناء وجودها خارج الحَاضِنَة، ومن ثَمَّ تَمَّ الاحتفاظ بها ضِمن مُستنْبتات تحوي وَسط الاستِنْبَات G-IVF ™ Plus (G-IVF ™ Plus، Vitrolife، السّويد) مُغطاة بزيت البارافين (OVOIL، Vitrolife، السّويد) ريثما تتمّ تَعْرِيَة الخَلايا البيضيَّة وَفصلها عن الخَلايَا الرُّكَاميَّة خلال ساعتين مِن الجمع كحد أَقصى. تمَّت التَّعْرِيَة بتعريض مُعقد COC لإنزيم هيالورونيداز Hyaluronidase (HYASE-10× in G-Mops ™ Plus Media، Vitrolife، السّويد) لعدة ثوانٍ قبل نقلها إلى وَسط G-MOPS ™ Plus حيث أُستُكمِل فَصل الخَلايَا الرُّكَاميَّة عَن الخَلايا البَيضِيَّة ميكانيكيًّاً.

قُيِّمَت درجة النّضج النّوويّ للخَلايَا البَيْضيَّة المُعرَّاة باستخدَام مِجْهَر مُجَسِّم Stereoscopic Microscope طراز Nikon SMZ1500، وصُنِّفَت إلى: خَلايَا بَيْضيَّة ناضجة (Metaphase II Oocytes، M II؛ خَلايَا بيضيَّة مع انْبِثَاق الجسم القطبيّ الأَوّل)، خَلايَا بَيْضيَّة غير ناضجة (Metaphase I Oocytes، M I؛ خَلايَا بَيْضيَّة لا يُلاحَظ فيها الجسم القطبيّ أَو الحُوَيصِلَة المُنْتشَة Germinal Vesicle)، خَلايَا بَيْضيَّة غير ناضجة (Germinal Vesicle Oocytes، GV؛ خَلايَا بَيْضيَّة ذات حُوَيصِلَة مُنْتشَة Germinal Vesicle)، خَلايَا بَيْضيَّة رتقيَّة Atretic Oocytes (خَلايَا بَيْضيَّة مع علامات تَنَكُّس Degeneration). وحُسِبَ مُعدَّل النّضج Maturation Rate بقسمة عَدد الخَلايَا البَيْضيَّة النَّاضجة على العَدد الإجْمالِيّ للخَلايا البَيْضيَّة المُسترجَعة.

كما تمَّ حساب منسب حساسيَّة المبيض Ovarian Sensitivity Index (OSI) بقسمة عَدد الخَلايَا البَيْضيَّة المُسترجَعة على الجرعة الكليَّة المُستهلكة من FSH وضرب حاصل القسمة بـ 1000 (Huber *et al.*, 2013, pp. 1270–1276).

الإمْنَاء وتقيـيم عمليَّـة الإخْصـاب Insemination and Fertilization Assessment:

أُستُخدِمَت تِقْنِيَّة ICSI فِي الإمْنَاء، وتمَّ الحَقْنُ المِكْرَوِيّ Microinjection بالاستعانة بمجهر مقلوب Inverted Microscope طراز Nikon Eclipse Ti2 (Nikon، طوكيو، اليابان) تحت تكبير X400 عَلى منصَّة مُسخنة Heated Stage لدرجة حرارة 37 درجة سيلزيوس. وُضعت قُطَيرَة مكْرَوِيّة Microdroplet مِن وَسط ICSI™ (ICSI™، Vitrolife، السّويد)، الحاوي عَلى PVP، فِي مركز طبق بتري مُغطى بزيت البارافين (OVOIL، Vitrolife، السّويد)؛ بُغيَة اسْتِيْقاف Immobilization النّطَاف ميكانيكيًّاً بتخريب ذيلها باسْتخدام رأس إبرة الحقن (Origio، الولايات المُتحدة الأَمريكيَّة) ومن ثَمَّ اصْطفاء الأَمثل منها. بينما وُزِّعَت الخَلايَا البَيْضيَّة النَّاضجة والمُعدَّة للحَقن عَلى قُطيرَاتٍ من وسط G-Gamete ™ (G-Gamete ™، Vitrolife، السّويد) مَوضوعة فِي مُحيط الطبق. ثُبِّتَت كلّ خليَّة بَيْضيَّة باستخدام مِمَص مِكرَوي مَاسك Holding Micropipette (Origio، الولايات المُتحدة الأَمريكيَّة) بزاوية 35 درجة، بحيث يتوضَّع الجسم القُطبيّ باتجاه السَّاعة 6 أَو السَّاعة 12، وبعدها حُقِنَت الهَيولَى الخاصة بها بنطفةٍ واحدةٍ بالاستعانة بمُيَاداة مَجْهَرِيَّة Micromanipulator (TransferMan® 4r، eppendorf،

ألمانيـا). وُضِـعت الخَلايَـا البَيْضـيَّة المُلقَّحَـة بعـد ذلـك ضـمن مُستَنْبَتات تحوي وسط الاستِنْبَات G1-Plus ™ (G1-Plus ™، Vitrolife، السّويد). أُستخدمت حاضنة Thermo Scientific HERACELL 150i CO2 (Thermo Fisher Scientific، الولايـات المُتحـدة الأَمريكيَّـة) لمُسـتَنْبتات COCs ومُسـتَنْبَتات الخَلايا البَيْضيَّة (مـع المحافظـة علـى جوٍّ رطـبٍ ذو مستويات CO_2 6%، حـرارة 37 درجـة سـيلزيوس، وقيمـة بَاهـاء 7.28–7.35)، بينمـا أُسـتُخدِمَت حاضـنة K-Systems G210 InviCell (K-Systems Kivex Biotec Ltd.، الدنمارك) لمُسـتَنْبَتات الأَجنَّـة. تـمَّ التَّحقـق مِـن حـدوث الإخْصـاب، بعـد 16-18 ساعة مِن إتمام الإمْنَاء، بمُلاحظة طليعتي نواة ضِمن الخَلايـا البَيْضـيَّة المَحقونـة بـالتزامن مـع انْبِثَـاق الجسـم القطبـيّ الثَّاني. حُسِبَ مُعدَّل الإخْصاب Fertilization Rate بقسمة عـدد اللـواقِح (2PN) المُتشـكِّلَة علـى عـدد الخَلايَـا البَيْضـيَّة المَحقونة.

تصـنيف الأَجنَّـة Embryos Grading، وحسـاب مُعـدَّل التَّشـطُّر Cleavage Rate ومعـدل الأَجنَّـة عاليـة الجـودة High-Quality Embryos Rate:

قُيِّمَـت الأَجنَّـة النَّاتجـة مُورفُولُوجِيّـاً باسـتخدام مِجْهَـر مُجَسِّـم Nikon SMZ1500 Stereoscopic Microscope طـراز (Nikon، طوكيـو، اليابـان) وفـق مَعـايير ESHRE (2011) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology *et al.*, 2011, pp. 1270–1283). تُصنَّف الأَجنَّةُ فِي مرحلة التَّشطُّر Cleavage-stage Embryos كأَجنَّة عالية الجودة وفق معايير ESHRE (2011) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology *et al.*, 2011, pp. 1270–1283) فِي حال امتلاكها لقُسيمَات أَرومِيَّة مُتناظِرة Symmetric Blastomeres (عدد 2–4 خلايا فِي اليوم الثَّاني من الإخْصَاب أَو 6–8 خلايا فِـي اليـوم الثَّالـث مِـن الإخْصـاب)، دون وجـود نـوى متعـددة Multinucleation، مـع نسـبة تشـدُّف < 10%. حُسِـبَ مُعـدَّل التَّشطُّر Cleavage Rate بقسمة عدد الأَجنَّة المُتشطِّرَة على عدد اللواقِح (2PN) المُتشكِّلَة، بينما حُسِبَ مُعدَّل الأَجنَّة عالية الجودة High-Quality Embryos Rate بقسمة عدد الأَجنَّة عاليـة الجـودة المُستحصَـلة (Grade I) علـى العـدد الإجْمـالِيّ للأَجنَّة المُتشطِّرَة النَّاتجة.

نقل الأجنـة ودعم الطَّور الأَصْفَرِيّ Embryos Transfer and Luteal Phase Support:

وُضِـعَت الأَجنَّـة المُختارَة للإرجَـاع فِي وَسط EmbryoGlue® (EmbryoGlue®، Vitrolife، السّـويد) قُبيـل نقلهـا إِلـى الأُم لـدَعم الانغراس، ومـن ثـمَّ نُقِلَـت باسـتخدام قِنْطـار Sure-Pro Ultra Catheter (Wallace، الولايـات المُتحـدة الأَمريكيَّـة) وبالاسْترشَاد بالتَّصوير المهبليّ بالأَمواج فوق الصَّوتيَّة فِي اليوم الثَّـاني أَو الثَّالـث بعـد الإمْنـاء (مَرحلـة التَّشَـطُّر Cleavage Stage). تـمَّ الامتِنَـاع عَن نقل الأَجنَّـة وأُنتُخِبَت أَفضـل الأَجنَّـة للتَّجميد Elective Embryo Cryopreservation فِي الحالات العالية الاخْتطار لتطوير فَرْط استثَارة مُهددة للحياة (Navot *et al.*, 1992, pp. 249–261; Golan *et al.*, 2009, pp. 28–32) أَو تلـك المُستوفية لمَعايير القُبُول فِي المُسْتَشْفَى (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine *et al.*, 2008, pp. S188–S193). حُسِبَ مُعدَّل إلغاء الدَّورَات Cycle Cancellation Rate (CCR) بقسمة عَدد الدَّورَات المُلغَاة عَلى العدد الإجْمالِيّ للمُشارِكَات.

أُستخدِمَ مُستحضَر بروجستيرون مهبلي (Crinone ® 8% gel، Merck Serono) لـدعم الطَّـور الأَصْـفَرِيّ؛ بـدءً مـن يـوم اسْـترجَاع الخَلايَـا البَيْضـيَّة إِلـى يـومِ إجـراء اختبَـار الحَمـل،

وتواصل إعطاء المُستحضَر لغاية الأَسبوع 12 مِن الحَمل فِي الحَالات إيجابية الاختبَار.

اعْتِيان السَّائل الجُريبيّ ومُعايرته

Follicular Fluid Sampling and Analysis:

جُمِعَت عينات السَّائل الجُريبيّ مِن الجُريبات ذات الأَقطار > 15 ملم. نُبِّذَت العيناتُ بعد عَزل الخَلايَا البَيْضيَّة ضِمنَ أَنابيبٍ جافةٍ فِي حرارةِ الغرفة بُغية فَصل السَّائل الجُريبيّ عن الحطام الخلويّ. حُفِظَ السَّائل الطَّافي Supernatant بعد ذلك ضِمن أَنابيب ايبندروف Eppendrof فِي الدَّرجة −80 درجة سيلزيوس. جُمِّدَت العيناتُ لمرةٍ واحدةٍ فقط، وفُكَّ التَّجميد عنها قبل إجراء المُقايسات الحَيويَّةَ مُباشرةً. أُستخدِمَت عتيدةُ اليزا مِن شركة Biorex Diagnostics (المملكة المتحدة) لمُقايسة تراكيز AMH، وتمَّت قراءة نتائج المُقايسة باستخدام قارئ اليزا Humareader plus مِن شركة Human (أَلمانيا)، والمُتوفر فِي المخبر المركزيّ الخاص بمُسْتَشْفَى التَّوليد وأَمراض النّساء الجامعيّ.

تقييم الحمل ومتابعته

Pregnancy Assessment and Follow Up:

أُجري اختبار حَمل β-hCG (مصليّ) لكلّ السَّيدات اللّاتي خَضعن لنقل أَجنة بعد 14 يوماً مِن إتمام عملية النَّقل، ومِن ثمَّ تمَّ التَّأكد مِن تحقق الحَمل السَّريريّ لدَى الحَالات إيجابيَّة الاختبار؛ بتحري وجود الأَكياس الحَمليَّة باستخدام التَّصوير المهبليّ بالأَمواج فوق الصَّوتيَّة بعد 3−4 أَسابيع من النَّقل. شمل الحمل السَّريري حالات الحَمل داخل الرحم Intra-Uterine وحالات الحمل المُنتَبَذ Ectopic Pregnancy على حد سواء (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017, pp. 1786–1801)، وحُسِبَ مُعدَّل الانغراس بقسمة عَدد الأَكياس الحَمليَّة المُلاحَظة خلال التَّصوير بالأمواج فوق الصَّوتيَّة عَلى عَدد الأجنَّة المَنْقُولة، ومن ثم نُوطِرَتْ حالات الحَمل إلى الأسبوع 12 منه (حمل تطوّريّ Ongoing Pregnancy).

الدّرَاسَة الإِحْصَائيَّة Statistical Analysis:

تمَّت الدّرَاسَة الإِحْصَائيَّة باستخدام برنامج SPSS (Statistical Package for Social Science software) الإصدار 24.0. (IBM Corp., Armond, N.Y., USA). أُختبرت كلّ الفرضيات باختبارات إحصائيّة ثُنائيّة الذيل مع عد الفارقُ مُعتداً به إحصائيَّاً لدَى بلوغ الدّالة الإحصائيَّة P قيمةً أَقل من 0.05. جَرى التَّعبير عَن البيانات المُستمرة باستخدام المُتوسط الحسابيّ والانحراف المعياريّ، بينما عُبِّرَ عَن البيانات الفئويَّة بناء على التَّكرار والنّسب المئويَّة. أُستخدِمَ اختبار Independent T-Test أو Mann–Whitney U test للمقارنة ما بين المجموعات في حالة البيانات المُستَمِرَة بما يتناسب مع التَّوزع الطَّبيعيّ للبيانات، بينما أُستخدِمَ اختبار Chi-Square أو Fisher's Exact Test فِي حَالة البيانات الفئويَّة. حُسبَ معامل الارتباط Spearman Rank لتقييم عَلاقات الارتباط ما بين مُتغيرات الدّرَاسَة. حُسِبَت المساحة تحت مُنحنى ROC (Receiver Operating Characteristic) لتقييم دقة FF AMH للتَّنبؤ بتحقق الحمل.

النَّتائج Results:

لم تُلاحظ أَيَّة فروقات يُعتد بها إحصائيَّاً على صعيد الخصائص البدئيَّة ما بين السَّيدات المُشارِكَات فِي كلتا مَجموعَتي الدّرَاسة (الجدول 1)، كمَا تماثلت خصائص الدَّورات المَدروسة ما بين المَجموعتين باستثناء مدة التَّحريض، والتي كانت أَقصر فِي مَجمُوعَة GnRH Antagonist مقارنةً بمَجمُوعَة GnRH Agonist، كما يُوضِّح الجدول 2. لُوحِظَت علاقةُ ارتباطٍ عكسيَّةٍ ما بين المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون

AMH والجرعة الكليَّة المُستهلكة مِن FSH فِي كلتا المَجمُوعَتين (مَجمُوعَة GnRH Agonist، r=-0.515، P<0.001؛ مَجمُوعَة GnRH Antagonist، r=-0.420، P=0.015؛ الجدول 3). ارتبطت مُستويات AMH FF طرديَّاً مع مَنْسَب حساسيَّة المبيض OSI فِي مَجمُوعَة GnRH Agonist (r=0.514، P<0.001؛ الجدول 3)، وقاربت العلاقة مع عَدد الخَلايَا البيضيَّة المُسترجَعة من بلوغ الدَّلالة الإِحْصَائيَّة (r=0.245، P=0.087؛ الجدول 3). في المُقابل، ارتبطت مُستويات AMH FF عكسيَّاً مع عدد الخَلايا البيضيَّة النَّاضِجَة MII (r=-0.404، P=0.020)، عدد اللواقح (r=-0.439، P=0.011)، وعدد الأجنَّة المُستحصَلة (r=-0.439، P=0.011) فِي مَجمُوعَة GnRH Antagonist، وقاربت العلاقة مع عَدد الخَلايَا البيضيَّة المُسترجَعة من بلوغ الدَّلالة الإِحْصَائيَّة (r=-0.326، P=0.064). بينما لم تُلاحظ أَيَّة علاقة ما بين مُستويات AMH FF ومُعدَّل نضج الخَلايَا البيضيَّة، مُعدَّل الإِخْصَاب، مُعدَّل الأَجنَّة عالية الجودة، مُعدَّل التَّشطُّر، أَو مُعدَّل الانغراس فِي أَي مَجمُوعَة (الجدول 3). علاوة على ذلك، لم تُلاحظ أَيَّة فروقاتٍ يُعتد بها إِحصائيَّاً فِي المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH ما بين السَّيدات الحَوامل واللاتي لم يتحقق لديهن الحَمل (الجدول 4)، وهو ما تمَّ تأكيده مِن خلال تحليل منحنى ROC (الجدول 5).

الجدول (1): الخصائص البدئيَّة للمُشارِكَات فِي الدّرَاسَة:

	كلّ السَّيدات N=83	مجموعة ناهِضَات GnRH N=50	مجموعة ضَواد GnRH N=33	P value
عمر الزَّوجة (سنوات)	5.69 ± 28.42	5.30 ± 28.12	6.29 ± 28.88	0.555
عمر الزَّوج (سنوات)	7.81 ± 37.16	7.13 ± 36.88	8.84 ± 37.58	0.635
نمط العقم % (n) أَوليّ ثانويّ	(83/63) %75.9 (83/20) %24.1	(50/37) %74.0 (50/13) %26.0	(33/26) %78.8 (33/7) %21.2	0.618
مدة العقم (سنوات)	3.99 ± 6.38	4.06 ± 6.93	3.80 ± 5.54	0.088
التَّدخين (الزَّوجة)	(83/16) %19.3	(50/8) %16.0	(33/8) %24.2	0.352
التَّدخين (الزَّوج)	(83/43) %51.8	(50/22) %44.0	(33/21) %63.6	0.080
شرب الكحول (الزَّوجة)	(83/0) %0.0	(50/0) %0.0	(33/0) %0.0	-
شرب الكحول (الزَّوج)	(83/2) %2.4	(50/0) %0.0	(33/2) 6.1%	0.155
تصنيف النُّطاف لدَى الزَّوج: سوي Normozoospermia عامل ذكري خفيف–متوسط نقص في العدد، الحركة، والأشكال السَّويّة* فُقد النُّطاف Azoospermia مَوْت النُّطاف Necrozoospermia النُّطاف الخفي Cryptozoospermia	(83/14) %16.9 (83/19) %22.9 (83/31) %37.4 (83/8) %9.6 (83/3) %3.6 (83/8) %9.6	(50/5) %10.0 (50/12) %24.0 (50/23) %46.0 (50/4) %8.0 (50/2) %4.0 (50/4)%8.0	(33/9) %27.3 (33/7) %21.2 (33/8) %24.2 (33/4) %12.1 (33/1) %3.0 (33/4) %12.1	0.208

*: Oligoasthenoteratozoospermia.

الجدول (2): خصائص الدَّورَات الخَاصة بالدّرَاسَة:

	كلّ السَّيدات N=83	مجموعة ناهِضَات GnRH N=50	مجموعة ضَواد GnRH N=33	P value
نوع المحرِّض المستخدم % (n):	(83/49) %59.1	(50/32) %64.0	(33/17) %51.5	0.410
r-FSH	(83/6) %7.2	(50/4) %8.0	(33/2) %6.1	
hMG	(83/28) %33.7	(50/14) %28.0	(33/14) %42.4	
r-FSH + hMG				
الجرعة البدئيَّة من FSH (وحدة)	108.24 ± 309.04	106.97 ± 294.00	107.76 ± 331.82	0.104
الجرعة الكليَّة من FSH (وحدة)	970.38 ± 2501.20	1034.11 ± 2523.00	879.53 ± 2468.18	0.952
مدة التَّحريض (أيام)	1.13 ± 7.87	1.09 ± 8.28	0.89 ± 7.26	**<0.001**
مصدر النُّطاف % (n):				0.384
قذف	(83/62) %74.7	(50/35) %70.0	(33/27) %81.8	
Tesa	(83/15) %18.1	(50/11) %22.0	(33/4) %12.1	
Pesa	(83/2) %2.4	(50/2) %4.0	(33/0) %0.0	
نطاف مجمدة	(83/1) %1.2	(50/1) %2.0	(33/0) %0.0	
قذف + Tesa	(83/3) %3.6	(50/1) %2.0	(33/2) %6.1	
يوم نقل الأَجنَّة				0.933
اليوم الثَّاني	(78/60) %76.9	(47/36) %76.6	(31/24) %77.4	
اليوم الثَّالث	(78/18) %23.1	(47/11) %23.4	(31/7) %22.6	
مُعدَّل إِلغاء الدَّورَات % (n)	(83/5) %6.0	(50/3) %6.0	(33/2) %6.1	1.000
مُعدَّل إِلغاء الدَّورَات بسبب OHSS % (n)	(83/0) %0.0	(50/0) %0.0	(33/0) %0.0	–

hMG: مُوجِّهة الغُدد التَّناسُليَّة الإياسيَّة البَشريَّة، OHSS: مُتلازِمَة فَرْط تحريض المَبِيض، Pesa: رشف النِّطَاف مِن البربخ عبر الجلد، r-FSH: الشَّكل المُؤشب من الهُرمُون المُنبِّه للجُريب، Tesa: رشف النِّطَاف مِن الخصى.

الجدول (3): العلاقة ما بين المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH ونتائج الإِخْصَاب فِي المُختَبر:

	كلّ السَّيدات N=83		مجموعة ناهِضَات GnRH N=50		مجموعة ضَواد GnRH N=33	
	Correlation Coefficient	P value	Correlation Coefficient	P value	Correlation Coefficient	P value
عمر الزَّوجة (سنوات)	-0.197	0.075	-0.193	0.178	-0.189	0.292
مدة العقم (سنوات)	0.022	0.845	-0.067	0.642	0.228	0.202
الجرعة الكليَّة من FSH	**-0.485**	**<0.001**	**-0.515**	**<0.001**	**-0.420**	**0.015**
مدة التَّحريض (أيام)	-0.190	0.085	-0.214	0.135	-0.110	0.542
ثخانة البطانة الرَّحميَّة يوم hCG	-0.160	0.149	-0.222	0.122	-0.063	0.728
عَدد الخَلايا البيضيَّة المُسترجَعة	0.006	0.957	0.245	0.087	-0.326	0.064
مَنْسب حساسيَّة المَبيض OSI	**0.304**	**0.005**	**0.514**	**<0.001**	-0.048	0.792
عَدد الخَلايا البيضيَّة M II	-0.038	0.730	0.189	0.189	**-0.404**	**0.020**
عَدد الخَلايا البيضيَّة M I	0.000	0.998	0.095	0.512	-0.119	0.509
عَدد الخَلايا البيضيَّة GV	0.093	0.402	0.199	0.165	-0.078	0.666
عَدد الخَلايا البيضيَّة غير النَّاضِجَة (GV + M I)	0.064	0.566	0.207	0.149	-0.135	0.452
عَدد الخَلايا البيضيَّة الرتقيَّة	-0.056	0.613	0.227	0.112	-0.206	0.250
عدد اللَّوَاقِح	-0.136	0.220	0.040	0.781	**-0.439**	**0.011**
عدد الأَجنَّة	-0.136	0.220	0.040	0.781	**-0.439**	**0.011**
مُعدَّل النَّضج %	-0.117	0.294	-0.068	0.641	-0.210	0.242
مُعدَّل الإِخْصَاب%	-0.108	0.329	-0.160	0.268	-0.056	0.756
مُعدَّل الأَجنَّة عالية الجودة	-0.069	0.537	-0.055	0.702	-0.069	0.703
مُعدَّل التَّشطرُ	-0.049	0.658	-0.009	0.952	-0.167	0.353
مُعدَّل الانغراس	-0.047	0.675	0.043	0.768	-0.209	0.244

FSH: الهُرمُون المُنبِّه للجُريب، GV: خَلايَا بَيْضيَّة ذات حُوَيصِلَة مُنْتِشَة، hCG: مُوجِّهَة الغُدد التَّناسُلية المشيمائيَّة البشريَّة.

الجدول(4): المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH فِي مَجمُوعَات الدِّرَاسَة وفق حَالة الحمل:

المجموعة	الحمل السَّريريّ	الحمل التَّطوريّ

	حامل	غير حامل	P Value	حامل	غير حامل	P Value
كلّ السَّيدات	3.03 ± 6.42	7.59 ± 8.41	0.659	3.22 ± 6.56	7.39 ± 8.25	0.790
مجموعة ناهِضَات GnRH	3.37 ± 6.65	6.45 ± 7.72	0.907	3.78 ± 6.64	6.20 ± 7.64	0.874
مجموعة ضَواد GnRH	2.51 ± 6.05	9.06 ± 9.43	0.328	2.38 ± 6.44	8.96 ± 9.17	0.726

الجدول(5): مُنحنى ROC لتقييم دقة مّستويات FF AMH للتَّنبؤ بتحقق الحَمل:

المجموعة	الحمل السَّريريّ					الحمل التَّطوريّ				
	AUC	Std. Error	P Value	مجال الثّقة 95%		AUC	Std. Error	P Value	مجال الثّقة 95%	
				الحد الأعلى	الحد الأدنى				الحد الأعلى	الحد الأدنى
كلّ السَّيدات	0.469	0.064	0.659	0.344	0.594	0.480	0.066	0.790	0.350	0.610
مجموعة ناهِضَات GnRH	0.510	0.083	0.907	0.349	0.672	0.485	0.089	0.874	0.311	0.658
مجموعة ضَواد GnRH	0.384	0.102	0.312	0.185	0.583	0.455	0.100	0.705	0.258	0.652

AUC: المساحة تحت المنحنى.

المناقشة Discussion:

تُظهر نتائج الدّرَاسَات ضمن الزّجاج In-Vitro فعاليَّة هُرمون AMH فِـي تنظـيم تطـوّر الجُريبـات Folliculogenesis فِـي المراحل غير المُعتَمدة والمُعتَمدة على FSH على حدٍ سواء مِن خـلال؛ الحـد مـن بـدء تطـوّر الجُريبـات البدْئِيّـة Primordial Follicles (Durlinger *et al.*, 1999, pp. 5789–5796; Durlinger *et al.*, 2002, pp. 1076–1084; Nilsson *et al.*, 2007, pp. 209–221)، إِضـعاف استجابة الجُريب لهُرمـون FSH (Durlinger *et al.*, 2001, pp. 4891–4899; Pellatt *et al.*, 2011, p. 1246–1251.e1)، وتثبيط الأَروماتاز فِي الخَلايا الحُبَيبيَّة Granulosa Cell (Grossman *et al.*, 2008, pp. 1364–1370; Pellatt *et al.*, 2011, p. 1246–1251.e1)، إلا أَنَّ تلك التأثيرات غير مُتسقة ما بين الأَنواع؛ إذ يحـدُّ AMH مِـن بـدء تطـور الجُريبـات البدْئِيّـة لـدَى الفئـران (Durlinger *et al.*, 1999, pp. 5789–5796; Durlinger et al., 2002, pp. 1076–1084)، والجرذان (Nilsson *et al.*, 2007, pp. 209–221)، دون الخراف (Campbell *et al.*, 2012, pp. 4533–4543)، بينما لا تزال البيانات المُتوفرة عن الجُريبات البشريَّة مُتضاربة (Schmidt *et al.*, 2005, pp. 87–93; Carlsson *et al.*, 2006, pp. 2223–2227). أَضف على ذلك، فمن غير الواضح إلى حد الآن أثر AMH على كفاءة الخَلايَا البَيْضيَّة للتّطوّر والإخصاب Oocyte Competence. تُبيّن الدّرَاسَاتُ المُتعلِّقَة بإِنْضَاج الخَلايَا البَيْضيَّة فِي المُختَبر In

Oocyte Competence تحسُّنَ (IVM) Vitro Maturation لدَى الفِئران تحت تأثير AMH مِن خلال زيادة التَّعبير عن البروتين المُخَلِّق العظميّ-15 (Bone Morphogenetic Protein-15، BMP-15) وعامل تَمايُز النّمو-9 (Growth Differentiation Factor-9، GDF-9) (Zhang *et al.*, *2014, p. e99393)*، ولكن لم تُلاحظ تأثيرات مُشابِهَة على الخلايا البَيْضيَّة البقريَّة (Velásquez *et al.*, 2019, pp. 209– 223). فِي المُقابل، تحسّنَ مُعدَّل نضج الخلايا البَيْضيَّة البشريَّة (GV) لدَى إضافة AMH إلى أَوساط IVM، وتناقص المُعدَّل بإضافة AMH بالتَّزامن مع FSH و hCG (Bedenk *et al.*, 2021). مما يُشير إلى احتمالية اعتماد تأثيرات AMH على النَّوع Species-Specific، وإمكانية تباينها ما بين الأَنواع أُحادية الإباضة Mono-Ovulatory وتلك المُتعددة الإباضة Poly-Ovulatory (Convissar *et al.*, 2017, pp. 745– 753; Mamsen *et al.*, 2021, p. 617523)، ويستدعي إجراء المزيد من الأَبحاث بُغية إيضاح الدّور الحقيقيّ الّذي يلعبه هُرمُون AMH فِي تنظيم تطوّر الجُريبات، نُضج الخلايا البَيْضيَّة، اتمام الإخْصَاب، ودعم تطوّر الأَجنَّة لدَى البشر.

تتباين تأثيرات مُوَجِّهَات الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة على مُعدَّل التَّعبير عن هُرمون AMH باختلاف درجة تطوّر الجُريب؛ إذ يُؤدي تثبيط مُوَجِّهَات الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة إلى خفض مُستوى التَّعبير عن هُرمون AMH فِي الخَلايَا الحُبيبيَّة خلال المَراحل المُبكِّرة من تطوّر الجُريبات ما قبل الغاريَّة (Thomas *et al.*, 2007, pp. 2273– 2281)، بينما يُثبط FSH التَّعبير عن AMH في الخَلايَا الحُبيبيَّة اللوتينيَّة (Fang *et al.*, 2016, pp. 5157–5162)، مما يُفسِّر العلاقة العكسيَّة ما بين المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH والجرعة الكليَّة المُستهلكة مِن FSH في دراستنا. أَظهرت دِرَاسَتنا علاقة ارتباط طرديَّة مُعتدّ بها إحصائيَّاً ما بين مُستويات AMH و FF ومَنْسَب حساسيَّة المبيض OSI فِي مَجمُوعَة GnRH Agonist (P<0.001)، وقاربت العلاقة مع عَدد الخَلايَا البيضيَّة المُسترجَعة من بلوغ الدَّلالة الإحْصَائيَّة في تلك المَجمُوعَة (P=0.087). كما بينت وجود علاقات ارتباط عكسيَّة ذات دلالة إحْصَائيَّة ما بين AMH و FF وعدد الخَلايا البيضيَّة النَّاضِجَة MII (P=0.020)، عدد اللواقح (P=0.011)، وعدد الأجنَّة المُستحصَلة (P=0.011) فِي مَجمُوعَة GnRH Antagonist، وقاربت العلاقة مع عَدد الخَلايَا البيضيَّة المُسترجَعة من بلوغ الدَّلالة الإحْصَائيَّة (P=0.064). فِي المُقابل، لم تُلاحظ أَيَّة علاقة ما بين مُستويات AMH و FF ومُعدَّل النَّضج، مُعدَّل الإخْصَاب، مُعدَّل الأَجنَّة عالية الجودة، مُعدَّل التَّشطُّر، أَو مُعدَّل الانغراس فِي كلتا المَجمُوعَتين. مما يشير أن العلاقات العكسيَّة المُلاحظة في مَجمُوعَة GnRH Antagonist قد تعود بشكل أَساسي إلى التَّأثيرات السَّلبية لهُرمون AMH على المردود النّهائيّ للبيوض. علاوة على ذلك، لم تُلاحظ أَيَّة فروقاتٍ يُعتد بها إحصائيَّاً فِي المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH ما بين السَّيدات الحَوامل واللاتي لم يتحقق لديهن الحَمل بغض النَّظر عن البروتوكول المُستخدَم. تتناسبُ المُستويات الجُريبيَّة لهُرمون AMH طرداً مع عدد الجريبات الغاريَّة Antral Follicules Counts (AFCs)، والذي يُعدُّ واصماً لمَخزون المبيض (Lin *et al.*, 2013, pp. 649–655; Chen *et al.*, 2017, pp. 1138–1147). قد يعود ذلك إلى ممارسة الجُريبات الغاريَّة لتأثيرات نَظيرة صَمَّاوِيّة Paracine على الجُريبات المُجاورة (إلا أنَّ ذلك غير مُثبت إلى حد الآن)، أَو يكون أثر غير مباشر للعلاقة العكسيَّة ما بين المُستويات الجُريبيَّة AMH والجرعة المُستهلَكَة من مُوَجِّهَات الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة؛ إذْ تستهلك السَّيدات ذوات المخزون المبيضي المرتفع جرعاتٍ أقل من مُوَجِّهَات الغُدَدِ

التَّناسُلِيَّة، وبالتالي يكون الأثر التَّثبيطي لمُوَجِّهات الغُدَدِ التَّناسُلِيَّة على مستوى التَّعبير عن AMH أقل حدة. وفقاً لنتائج أبحاثنا الأخيرة (Kadoura et al., 2022b)، إنَّ مستويات عامل النمو المَشيمِيّ Placental Growth Factor (PlGF) في عينات السَّائل الجريبي المَأخوذة من سيدات سويات الإباضة مُحرَّضات بالبرتوكول المَرِن لضَوَاد GnRH أقل من تلك المُستحصَلة مِن سيداتٍ مُحرَّضات بالبروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH (Kadoura et al., 2022b). يُعدُّ PlGF عامل نمو مولداً للأوعيَّة الدَّمويَّة، ويلعب دوراً هاماً في تنظيم التَّرويَة الدَّمويَّة للمَبيض، تطوّر الجُريبات، والإباضة (Carmeliet et al., 2001, pp. 575–583; Hou et al., 2014, p. e256; Bender et al., 2018, pp. 710–722)، وترتبط مُستوياته الجُريبيَّة طرديَّاً مع مَنْسَب حساسية المَبيض OSI فِي البرتوكول المَرِن لضَوَاد GnRH، والبروتوكول الطويل لنَاهِضَات GnRH، على حد سواء لدَى السَّيدات سويات الإباضة (Kadoura et al., 2022a). وبناء عليه، يمكننا القول، أنَّ المُستويات العالية مِن PlGF خلال البرتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH تؤمن تروية دمويَّة كافية وبيئة مُناسبة لتسهيل تطوّر عدد أكبر مِن الجُريبات، والتَّغلب على التَّأثيرات السَّلبية لهُرمون AMH، وفِي هذه الحَالة، يعكس التَّزايد فِي مُستويات AMH الزيادة فِي المخزون المبيضيّ، ولذلك تتناسب مُستويات AMH FF خلال البرتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH طرداً مع مَنْسَب حساسية المَبيض. بينما لا تستطيع المُستويات المحدودة من PlGF في البروتوكول المَرِن لضَوَاد GnRH التَّغلب على الأثر السَّلبيّ لهُرمون AMH، ويُحدِّدُ كلا العاملين معاً عدد الخلايا البَيْضيَّة المُسْتَرجَعة.

توافقت نتائجنا مع نتائج دراسَة Chen وزملاؤه (Chen et al., 2017, pp. 1138–1147) والتي لاحظت علاقات ارتباط طردية ما بين AMH FF وعَدد الخَلايَا البَيْضيَّة المُسْتَرجَعة، لدَى السَّيدات المُعَالَجات بالبروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH، كما توافقت جزئيَّاً مع نتائج دراسة Lin وزملاؤه (Lin et al., 2013, pp. 649–655) والّتي أَظهَرت علاقة ارتباط طرديَّة ما بين AMH FF و AFCs، عَدد الخَلايَا البَيْضيَّة المُسْتَرجَعة، وعَدد الأَجنَّة عالية الجودة لدَى السَّيدات المُعَالَجات بالبروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH. مِن جهة أُخرى، فقد أظهرت تلك الدّرَاسة وجود علاقة ارتباط طرديَّة ما بين FF AMH ومُعدَّل الولادات الحيَّة Live Birth Rate، كما كانت مُستويات FF AMH أَعلى لدَى السَّيدات الحَوامل مُقارنة بغير الحَوامل (Lin et al., 2013, pp. 649–655). بالمُقابل، تضاربت مع نتائج دراسَة Hattori وزملاؤه (Hattori et al., 2013, pp. 252–256) والّتي لم تستطع تحري أَي علاقة ذات دلالة إحْصَائيَّة ما بين AMH FF وعَدد الخَلايَا البَيْضيَّة المُسْتَرجَعة خلال البروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH، وأَظهَرت مُستويات أَعلى مِن FF AMH لدَى السَّيدات الحَوامل مقارنةً بغير الحَوامل. كما تضاربت نتائجنا مع نتائج دراسَة Mehta وزملاؤه (Mehta et al., 2013, pp. 99–105) والّتي أَظهرت تزايد عَدد الخَلايَا البَيْضيَّة عالية الجودة، مُعدَّل الإخْصَاب، مُعدَّل الانغراس، ومُعدَّل الحَمل السَّريريّ لدَى السَّيدات اللاتي يمتلكن مُستويات جُريبيَّة مُنخفضة مِن هُرمون AMH مقارنةً مع اللاتي يمتلكن مُستويات عالية منه خلال البروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH، ولاحظت مُستويات أَقل مِن FF AMH لدَى السَّيدات الحَوامل مقارنةً بغير الحَوامل. بلغ مُتوسط أَعمار السَّيدات الخاضعات للبرتوكول الطَّويل لنَاهِضَات فِي دراسَتنا GnRH 28.12 ± 5.30 سنة، بينما فِي دراسة Hattori وزملاؤه (Hattori et al., 2013, pp. 252–256) 35.6 ± 4.5 سنة (واشتملت الدّرَاسَة على سيدات بأَعمار

تتجاوز 40 سنة)، وقارب مِن 32 سنة فِي دراسَة Mehta وزملاؤه (Mehta *et al.*, 2013, pp. 99–105) (لم يذكر الباحثون المتوسط الكليّ لأَعمار السَّيدات المُشارِكَات، إنما ذُكِرَ مُتوسط الأَعمار لدَى السَّيدات ذوات المُستويات المُنخفضة من AMH FF وقد بلغ 32.03 ± 3.84 سنة، ومُتوسط الأَعمار لدَى السَّيدات ذوات المُستويات المُرتفعة من FF AMH وقد بلغ 32.37 ± 4.55سنة). أَضف على ذلك، لم تَستبعد دراسَة Mehta وزملاؤه (Mehta *et al.*, 2013, pp. 99–105) السَّيدات ضعيفات الاستجابة واكتفت باستبعاد الدّورات المُلغاة لعدم استرجاع أَي خلية بَيْضيَّة أَثناء البزل. فِي المُقابل، كانت الفئة العمريَّة فِي دراستنا أَقرب ما يكون للفئة العمريَّة فِي دراسة Lin وزملاؤه (Lin *et al.*, 2013, pp. 649–655)، (مُتوسط أَعمار السَّيدات المُشارِكَات 30.2 سنة (23–38 سنة))، ودراسة Chen وزملاؤه (Chen *et al.*, 2017, pp. 1138–1147) (مُتوسط أَعمار السَّيدات المُشارِكَات 30.3 ± 3.9 سنة)، كما استبعدت كلتا الدراستين السَّيدات اللاتي تجاوزت المُستويات المصليَّة لديهن لهُرمون FSH فِي اليوم الثَّالث مِن الدَّورة عتبة 12 وحدة/ليتر، مما يُقلِّل مِن احتمالية اشتمال تلك الدّرَاسَات على سيدات ضعيفات الاستجابة، كما كانت نسبة حالات العقم المجهول السَّبب فِي دراسة Lin وزملاؤه (Lin *et al.*, 2013, pp. 649–655)، أَقل من تلك المُلاحظة فِي دراسة Hattori وزملاؤه (Hattori *et al.*, 2013, pp. 252–256)، بينما لم تشتمل دراسَة Chen وزملاؤه (Chen *et al.*, 2017, pp. 1138–1147) على حالات عقم مجهول السَّبب، مما قد يُفسِّر توافق نتائجنا المُتعلقة بوجود علاقة طرديَّة ما بين AMH FF واستجابة المبيض للتَّحريض خلال البروتوكول الطَّويل لنَاهِضَات GnRH مع نتائج دراسة Lin وزملاؤه (Lin *et al.*, 2013, pp. 649–655) ودراسة Chen وزملاؤه (Chen *et al.*, 2017, pp. 1138–1147)، وتضاربها مع نتائج الدّرَاستين الأخريين. مِن جهة أُخرى، مثَّلَ العاملُ الذّكريُّ السّبب الأساسي للعقم فِي دراسَتنا، فبالرغم من استخدام تقنية ICSI فِي الإِمْنَاء، لا يمكن استبعاد تأثُّر نتائج الإِخْصَاب والحَمل لدينا بذلك. اشتملت الدّرَاسَات الأُخرى أَيضاً على حالات عقم ذكريّ، إلا أَنَّ نسبة العقم الذّكريّ كانت أَقل فِي دراسة Hattori وزملاؤه (Hattori *et al.*, 2013, pp. 252–256) ودراسة Lin وزملاؤه (Lin *et al.*, 2013, pp. 649–655) مقارنة بدرَاسَتنا. الدّرَاسَة الوحيدة الّتي أَظهرت وجود علاقة عكسيَّة ما بين AMH FF ومُعدَّل الإِخْصَاب كانت دراسَة Mehta وزملاؤه (Mehta *et al.*, 2013, pp. 99–105) والّتي اعتمدت تقنية Conventional IVF فِي الإِمْنَاء لكلِّ حَالات الدّرِاسَة، مما قد يُفسِّر تضارب نتائجها مع نتائجنا ونتائج بقية الدّرَاسَات. أَما فيما يخص نتائجنا حول البروتوكول المَرِن لضَوَاد GnRH، فقد توافقت جزئيَّاً مع نتائج دراسة Bastu وزملاؤه (Bastu *et al.*, 2015, pp. 30–34) والّتي لم تُظهِر أَيَّة فروق فِي المُستويات الجُريبيَّة لهرمون AMH ما بين الحَوامل وغير الحَوامل رغم استبعادها للعامل الذَّكريّ مِن الدّرَاسَة، كما لم تُظهِر أَيَّة علاقة ما بين مُستويات FF AMH ومُعدَّل نُضج الخَلايَا البَيْضيَّة أَو مُعدَّل الإِخْصَاب، إلا أَنَّها أَيضاً فشلت فِي مُلاحظة أَيَّة علاقة ما بين مُستوياتAMH FF وعَدد الخَلايا البَيْضيَّة المُسْترجَعَة أَو عَدد الخَلايَا البَيْضيَّة النَّاضِجَة. بالرغم مِن تشابه مُجتَمع دراسة Bastu وزملاؤه (Bastu *et al.*, 2015, pp. 30–34) مع مُجتمع دراستنا لحدٍ ما؛ إذ استبعدوا الحَالات المُتوقع تطوير المبيض فيها لاستجابة ضعيفة، والسَّيدات المُصابات بانتباذ بطانة رحميَّة، أَو موه البوق، إلا أَنَّها شملت حالات عقم مجهول السَّبب (دون ذكر نسبة حالات العقم مجهول السَّبب مِن العدد الكليّ للحَالات المُشارِكَة)، وكانت السَّيدات لحد ما

أَكبر سناً من السَّيدات فِي دراستنا (لم يذكر الباحثين المُتوسط الكليّ لأَعمار السَّيدات المُشارِكَات، إنما ذُكِرَ مُتوسط الأَعمار لدَى السَّيدات الحَوامل= 31.55 ± 4.76 سنة، وغير الحَوامل= 33.12 ± 4.67 سنة). علاوة على ذلك، قد تعود التَّغايرية Heterogenity ما بين النَّتائج فِي كلا البروتوكولين إلى الاختلافات فِي طرق مُقايسة AMH FF. تتوفر حالياً فِي الأَسواق العالميَّة إحدى وعشرون طريقة مناعيَّة لمُعايرة مُستويات AMH كميَّاً، دون وجود أَي اتفاق عالميّ على مُستحضرات معياريَّة له (Li *et al.*, 2021, p. 620; Punchoo *et al.*, 2021, p. 1062). فبالرغم من محاولة منظمة الصّحة العالميَّة اعتماد مُستحضرٍ بشريٍّ مُنَقَّى من AMH (رمز 190/16) كمستحضرٍ عياري عالميَّاً، إلا أَنَّ ضعف خصائص Commutability الخاصة بالمُستحضر أَدت إلى فشل المُحاولة (Li *et al.*, 2021, p. 620; Punchoo *et al.*, 2021, p. 1062)، ويَعودُ ذلك لعدم شموليَّة المُستحضر المُقترح على جميع نظائر هرمون AMH (AMH Isoforms) المعروفة حالياً (Punchoo *et al.*, 2021, p. 1062). تُمثِّل هذه المُشكلة عقبة فِي تطوير نموذجٍ موحدٍ لمُعايرة AMH، وقد يكون الوضع أَكثر خطورة لدَى تحري مُستوياته فِي عينات السَّائل الجُريبيّ؛ إذ أَشارت دراسَة حديثة لوجود نظائر جديدة لا تنسجم مع النَّظائر المَعروفة حالياً والمُتفق عليها عالميَّاً فِي عينات السَّائل الجُريبيّ وخُلاصات الخَلايَا الحُبيبيَّة البشريَّة، مما يُشير إلى تعقدٌ عملية تحلل بروتين AMH ضمن البيئة الجُريبيَّة، واشتمالها على خطواتٍ إضافيَّةٍ غير معروفة إلى حد الآن (Mamsen *et al.*, 2021, p. 617523).

الاستنتاجات Conclusions:

تُؤثِّر المُستويات المُرتفعة من AMH FF سلباً على تطوّر الجُريبات خلال البروتوكول المَرِن من ضَوَاد GnRH، بينما تتغلب التَّروية الدّمويَّة الجيدة للجُريب خلال البروتوكول الطَّويل مِن نَاهِضَات GnRH على تأثيرات AMH FF، وتُحسِّن مِن مردود البيوض المُسْترجَعة.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Human Reproduction. 26, 6, pp. 1270–1283. doi: 10.1093/humrep/der037.
2. Baskind, N.E., Orsi, N.M. and Sharma, V. (2014). Impact of Exogenous Gonadotropin Stimulation on Circulatory and Follicular Fluid Cytokine Profiles. Nottola, S. A. ed. International Journal of Reproductive Medicine. 2014, p. 218769.
3. Bastu, E. et al. (2015). The association between follicular fluid levels of cathepsin B, relaxin or AMH with clinical pregnancy rates in infertile patients. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 187, pp. 30–34.
4. Bedenk, J., Jančar, N., Vrtačnik-Bokal, E. and Virant-Klun, I. (2021). In vitro maturation of human immature (GV) oocytes after controlled ovarian hormonal stimulation with recombinant AMH in the maturation medium. Human Reproduction. 36, Supplement_1
5. Bender, H.R., Trau, H.A. and Duffy, D.M. (2018). Placental Growth Factor is required for ovulation, luteinization, and angiogenesis in primate ovulatory follicles. Endocrinology. 159, 2, pp. 710–722. doi: 10.1210/en.2017-00739.
6. Vander Borght, M. and Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clinical Biochemistry. 62, pp. 2–10.
7. Campbell, B.K., Clinton, M. and Webb, R. (2012). The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). Endocrinology. 153, 9, pp. 4533–4543. doi: 10.1210/en.2012-1158.
8. Carlsson, I.B., Scott, J.E., Visser, J.A., Ritvos, O., Themmen, A.P.N. and Hovatta, O. (2006). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. Human reproduction (Oxford, England). 21, 9, pp. 2223–2227. doi: 10.1093/humrep/del165.
9. Carmeliet, P. et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. Nature medicine. 7, 5, pp. 575–583. doi: 10.1038/87904.
10. Chen, Y., Ye, B., Yang, X., Zheng, J., Lin, J. and Zhao, J. (2017). Predicting the outcome of different protocols of in vitro fertilization with anti-Muüllerian hormone levels in patients with polycystic ovary syndrome. Journal of International Medical Research. 45, 3, pp. 1138–1147. doi: 10.1177/0300060517704140.
11. Convissar, S., Armouti, M., Fierro, M.A., Winston, N.J., Scoccia, H., Zamah, A.M. and Stocco, C. (2017). Regulation of AMH by oocyte-specific growth factors in human primary cumulus cells. Reproduction (Cambridge, England). 154, 6, pp. 745–753. doi: 10.1530/REP-17-0421.
12. Copperman, A.B. and Benadiva, C. (2013). Optimal usage of the GnRH antagonists : a review of the literature. Reproductive Biology and Endocrinology. 11, p. 20.
13. Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A. and Themmen, A.P. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. Endocrinology. 140, 12, pp. 5789–5796. doi: 10.1210/endo.140.12.7204.
14. Durlinger, A.L.L. et al. (2001). Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary. Endocrinology. 142, 11, pp. 4891–4899. doi: 10.1210/endo.142.11.8486.
15. Durlinger, A.L.L. et al. (2002). Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary. Endocrinology. 143, 3, pp. 1076–1084. doi: 10.1210/endo.143.3.8691.
16. Fang, Y. et al. (2016). Vascular endothelial growth factor induces anti‑Müllerian hormone receptor 2 overexpression in ovarian granulosa cells of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection patients. Molecular medicine reports. 13, 6, pp. 5157–5162. doi: 10.3892/mmr.2016.5173.

17. Farquhar, C.M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M.S., Marjoribanks, J. and Boivin, J. (2019). Female subfertility. Nature Reviews Disease Primers. 5, p. 7.
18. Fauser, B.C.J.M.B.C.J.M. (2019). Medical Approaches to Ovarian Stimulation for Infertility. In: Strauss, J. F., Barbieri, R. L., and Gargiulo, A. R. eds. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. no: 3. Reproductive Technologies*. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc., p. 743–778.e7.
19. Ferraretti, A.P., La Marca, A., Fauser, B.C.J.M., Tarlatzis, B., Nargund, G., Gianaroli, L. and Res, E.W.G.P.O. (2011). ESHRE consensus on the definition of "poor response" to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. HUMAN REPRODUCTION. 26, 7, pp. 1616–1624. doi: 10.1093/humrep/der092.
20. Golan, A. and Weissman, A. (2009). Update on prediction and management of OHSS. A modern classification of OHSS. Reproductive biomedicine online. 19, 1, pp. 28–32. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60042-9.
21. Grossman, M.P., Nakajima, S.T., Fallat, M.E. and Siow, Y. (2008). Müllerian-inhibiting substance inhibits cytochrome P450 aromatase activity in human granulosa lutein cell culture. Fertility and Sterility. 89, 5, Supplement, pp. 1364–1370. doi: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.066.
22. Hattori, Y., Sato, T., Okada, H., Saito, C. and Sugiura-Ogasawara, M. (2013). Comparison of follicular fluid and serum anti-Mullerian hormone levels as predictors of the outcome of assisted reproductive treatment. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology. 169, 2, pp. 252–256. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.03.021.
23. Hou, L., Taylor, R.N., Shu, Y., Johnston-MacAnanny, E.B. and Yalcinkaya, T.M. (2014). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PLGF) directly correlate with ovarian follicle size in women undergoing in vitro fertilization (IVF). Fertility and Sterility. 102, 3, p. e256. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1265.
24. Huber, M., Hadziosmanovic, N., Berglund, L. and Holte, J. (2013). Using the ovarian sensitivity index to define poor, normal, and high response after controlled ovarian hyperstimulation in the long gonadotropin-releasing hormone-agonist protocol: suggestions for a new principle to solve an old problem. Fertility and sterility. 100, 5, pp. 1270–1276. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.06.049.
25. Jancar, N., Virant-Klun, I. and Bokal, E.V. (2009). Serum and follicular endocrine profile is different in modified natural cycles than in cycles stimulated with gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone antagonist. Fertility and sterility. 92, 6, pp. 2069–2071. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.06.054.
26. Jancar, N., Virant-Klun, I., Osredkar, J. and Vrtacnik Bokal, E. (2008). Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Müllerian hormone in natural versus stimulated cycles. Reproductive biomedicine online. 16, 5, pp. 640–648. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60477-4.
27. Kadoura, S., Alhalabi, M. and Nattouf, A.H. (2022a). Correlations between Follicular fluid PlGF and IVF/ICSI outcomes among polycystic ovary syndrome women and normo-ovulatory women using different controlled hyperstimulation protocols. PREPRINT (Version 1).
28. Kadoura, S., Alhalabi, M. and Nattouf, A.H. (2022b). Effect of Flexible GnRH antagonist and long GnRH agonist protocols on follicular fluid levels of PlGF, AMH, oocyte's morphology, and other IVF/ICSI outcomes in normo-ovulatory women. PREPRINT (Version 1).
29. Kaser, D.J., Ginsburg, E.S., Carrell, D.T. and Racowsky, C. (2019). Assisted Reproduction. In: Strauss, J. F., Barbieri, R. L., and Gargiulo, A. R. eds. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. no: 3. Reproductive Technologies*. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc., p. 779–822.e16.
30. Li, H.W.R., Robertson, D.M., Burns, C. and Ledger, W.L. (2021). Challenges in Measuring AMH in the Clinical Setting. Frontiers in Endocrinology. 12, p. 620.
31. Lin, C. et al. (2021). The Value of Anti-Müllerian Hormone in the Prediction of Spontaneous Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in Endocrinology. 12, p. 1260.

32. Lin, W.-Q., Yao, L.-N., Zhang, D.-X., Zhang, W., Yang, X.-J. and Yu, R. (2013). The predictive value of anti-Mullerian hormone on embryo quality, blastocyst development, and pregnancy rate following in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET). Journal of assisted reproduction and genetics. 30, 5, pp. 649–655. doi: 10.1007/s10815-013-9973-5.
33. Mamsen, L.S. et al. (2021). High Variability of Molecular Isoforms of AMH in Follicular Fluid and Granulosa Cells From Human Small Antral Follicles. Frontiers in endocrinology. 12, p. 617523. doi: 10.3389/fendo.2021.617523.
34. Mehta, B.N., Chimote, M.N., Chimote, N.N., Nath, N.M. and Chimote, N.M. (2013). Follicular-fluid anti-Mullerian hormone (FF AMH) is a plausible biochemical indicator of functional viability of oocyte in conventional in vitro fertilization (IVF) cycles. Journal of human reproductive sciences. 6, 2, pp. 99–105. doi: 10.4103/0974-1208.117168.
35. Navot, D., Bergh, P.A. and Laufer, N. (1992). Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. Fertility and sterility. 58, 2, pp. 249–261. doi: 10.1016/s0015-0282(16)55188-7.
36. Nikmard, F., Aflatoonian, B., Hosseini, E., Aflatoonian, A., Bakhtiyari, M. and Aflatoonian, R. (2016). A comparative study on the results of agonist and antagonist protocols based on serum AMH levels in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. International journal of reproductive biomedicine. 14, 12, pp. 769–776.
37. Nilsson, E., Rogers, N. and Skinner, M.K. (2007). Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. Reproduction (Cambridge, England). 134, 2, pp. 209–221. doi: 10.1530/REP-07-0119.
38. Pellatt, L. et al. (2011). Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. Fertility and Sterility. 96, 5, p. 1246–1251.e1. doi: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.08.015.
39. Penzias, A. et al. (2020). Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. Fertility and Sterility. 114, 6, pp. 1151–1157.
40. Pereira, N., Setton, R., Petrini, A.C., Lekovich, J.P., Elias, R.T. and Spandorfer, S.D. (2016). Is anti-Müllerian hormone associated with IVF outcomes in young patients with diminished ovarian reserve?. Women's health (London, England). 12, 2, pp. 185–192. doi: 10.2217/whe.15.102.
41. Punchoo, R. and Bhoora, S. (2021). Variation in the Measurement of Anti-Müllerian Hormone – What Are the Laboratory Issues?. Frontiers in Endocrinology. 12, p. 1062.
42. Rey, R. and Picard, J.Y. (1998). Embryology and endocrinology of genital development. Bailliere's clinical endocrinology and metabolism. 12, 1, pp. 17–33. doi: 10.1016/s0950-351x(98)80427-8.
43. Sahmay, S., Demirayak, G., Guralp, O., Ocal, P., Senturk, L.M., Oral, E. and Irez, T. (2012). Serum anti-müllerian hormone, follicle stimulating hormone and antral follicle count measurement cannot predict pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. Journal of assisted reproduction and genetics. 29, 7, pp. 589–595. doi: 10.1007/s10815-012-9754-6.
44. Schmidt, K.L.T., Kryger-Baggesen, N., Byskov, A.G. and Andersen, C.Y. (2005). Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. Molecular and cellular endocrinology. 234, 1–2, pp. 87–93. doi: 10.1016/j.mce.2004.12.010.
45. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2008). Ovarian hyperstimulation syndrome. Fertility and Sterility. 90, 5, Supplement, pp. S188–S193. doi: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.034.
46. Thomas, F.H., Telfer, E.E. and Fraser, H.M. (2007). Expression of anti-Mullerian hormone protein during early follicular development in the primate ovary in vivo is influenced by suppression of gonadotropin secretion and inhibition of vascular endothelial growth factor. Endocrinology. 148, 5, pp. 2273–2281. doi: 10.1210/en.2006-1501.
47. Velásquez, A., Mellisho, E., Castro, F.O. and Rodríguez-Álvarez, L. (2019). Effect of BMP15 and/or AMH during in vitro maturation of oocytes from involuntarily culled dairy cows. Molecular

reproduction and development. 86, 2, pp. 209–223. doi: 10.1002/mrd.23096.
48. Vloeberghs, V., Blockeel, C. and Devroey, P. (2011). Agonists or antagonists for ovarian stimulation?. In: Kovacs, G. ed. *How to Improve Your ART Success Rates*. New York: Cambridge University Press, pp. 80–86.
49. von Wolff, M., Kollmann, Z., Flück, C.E., Stute, P., Marti, U., Weiss, B. and Bersinger, N.A. (2014). Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. Human reproduction (Oxford, England). 29, 5, pp. 1049–1057. doi: 10.1093/humrep/deu044.
50. Wu, C.-H., Chen, Y.-C., Wu, H.-H., Yang, J.-G., Chang, Y.-J. and Tsai, H.-D. (2009). Serum anti-Müllerian hormone predicts ovarian response and cycle outcome in IVF patients. Journal of assisted reproduction and genetics. 26, 7, pp. 383–389. doi: 10.1007/s10815-009-9332-8.
51. Wu, Y.-T. et al. (2015). Preliminary proteomic analysis on the alterations in follicular fluid proteins from women undergoing natural cycles or controlled ovarian hyperstimulation. Journal of assisted reproduction and genetics. 32, 3, pp. 417–427. doi: 10.1007/s10815-014-0419-5.
52. Yao, L., Zhang, W., Li, H. and Lin, W. (2015). The role of serum AMH and FF AMH in predicting pregnancy outcome in the fresh cycle of IVF/ICSI: a meta-analysis. International journal of clinical and experimental medicine. 8, 2, pp. 1755–1767.
53. Zegers-Hochschild, F. et al. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. Human Reproduction. 32, 9, pp. 1786–1801. doi: 10.1093/humrep/dex234.
54. Zhang, Y., Shao, L., Xu, Y., Cui, Y., Liu, J. and Chian, R.-C. (2014). Effect of anti-Mullerian hormone in culture medium on quality of mouse oocytes matured in vitro. PloS one. 9, 6, p. e99393. doi: 10.1371/journal.pone.0099393.