Feyz Medical Sciences Journal
2023, Volume 27, Issue 6
Pages: 599-609
Doi: 10.48307/FMSJ.2023.27.6.599
Original Article

Impact of nanomagnetic graphene oxide (MGO) drug delivery with gonadotropin on glutathione levels and free radicals in oocytes during *in vivo* maturation of NMRI mice

Mitra Rahimi Fathkouhi [1*], Tahereh Foroutan [1], Maryam Hosseinzadeh Shirzeyli [1]

[1] Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
[2] Department of Biology and Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

[*]**Corresponding author:** Mitra Rahimi Fathkouhi, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Email: mitrarahimi34@yahoo.com

Received: 20 September 2023 **Revised:** 31 December 2023 **Accepted:** 31 December 2023

Abstract

Background and Aim: In assisted reproductive techniques (ART) to obtain more oocyte, it is important to use nanomaterials based on graphene oxide (GO) and superparamagnetic Fe_3O_4, which increase the effectiveness of the drug in the appropriate dose. The aim of this study was to investigate the impact of nano-magnetic graphene oxide (MGO) drug delivery with gonadotropin on glutathione levels and free radicals in oocytes during *in vivo* maturation of NMRI mice.

Methods: In this experimental study, 30 female NMRI mice were divided into 6 groups of 5 each, including a control group receiving PMSG and HCG hormones, a control group without hormones, a PMSG hormone group with nano-MGO, a PMSG and HCG hormone group with nano-MGO, and a nano-MGO group. Ovulation-stimulating hormone (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; PMSG) was intraperitoneally injected followed by human chorionic gonadotropin (HCG) after 48 hours. Twelve hours later, the number of metaphase II oocytes retrieved from the left fallopian tubes was counted in each group. Immunocytochemical staining for glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) was performed, and ovarian histological examination was conducted.

Results: Simultaneous administration of HCG and PMSG with nano-MGO significantly increased cytoplasmic GSH expression compared to the control hormone group ($P<0.01$). The group treated with a combination of hormones and MGO showed a significant increase in the number of corpus luteum ($P<0.01$). The level of ROS in groups treated with nano-MGO and hormone did not differ significantly from the group receiving only hormones.

Conclusion: Nano-MGO may enhance the efficacy of ovulation hormones, improve protein and hormone absorption in ovarian tissue, and with further research, could potentially be utilized in the development of ovulation drugs.

Keywords: Oocyte maturation, Magnetic graphene oxide, Glutathione, ROS

Copyright© 2023. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۷، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۴۰۲
صفحات: ۶۰۹-۵۹۹
Doi: 10.48307/FMSJ.2023.27.6.599
اصیل پژوهشی

تاثیر دارورسانی نانو مگنتیک گرافن اکساید (MGO) با گنادوتروپین بر میزان گلوتاتیون و رادیکال آزاد تخمک در بلوغ درون تنی موش سوری نژاد NMRI

میترا رحیمی فتحکوهی [۱*]، طاهره فروتن [۱]، مریم حسین زاده شیرذیلی [۲]

[۱] گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
[۲] گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۱/۱۰/۱۰ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: در تکنیک‌های کمک باروری (ART) برای دستیابی به تخمک‌های بیشتر، استفاده از نانومواد بر پایه اکسید گرافن (GO) و سوپرپارامگنتیک Fe3O4 که اثربخشی دارو را در دوز مناسب افزایش می‌دهند، اهمیت دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین تاثیر دارورسانی نانو مگنتیک گرافن اکساید بر میزان گلوتاتیون و رادیکال آزاد تخمک در بلوغ درون تنی موش سوری نژاد NMRI انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۰ راس موش سوری ماده NMRI در ۶ گروه ۵ تایی شامل گروه کنترل با هورمون PMSG و HCG و گروه کنترل بدون هورمون، گروه هورمون PMSG به همراه نانو MGO، گروه هورمون PMSG و HCG به همراه نانو و گروه نانو MGO تخصیص یافتند. ابتدا تزریق داخل صفاقی هورمون تحریک تخمک گذاری (PMSG) و بعد از ۴۸ ساعت، تزریق داخل صفاقی هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی (HCG) انجام شد و ۱۲ ساعت بعد، تعداد تخمک‌های متافاز II به‌دست آمده از لوله‌های فالوپ چپ در هر گروه شمارش شد. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی گلوتاتیون و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) انجام شد. همچنین تخمدان‌ها مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفت.

یافته‌ها: استفاده همزمان از HCG و PMSG به همراه نانو MGO، باعث افزایش معنی دار در میزان بیان سیتوپلاسمی گلوتاتیون در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده هورمون شد ($P<0/01$). در گروه تیمار شده با مخلوطی از هورمون‌ها و MGO افزایش معنی‌دار در تعداد جسم زرد حاصل از آزاد شدن تخمک مشاهده شد ($P<0/01$). میزان ROS در گروه‌های تیمارشده با نانو MGO و هورمون در مقایسه با گروهی که فقط هورمون گرفته بود، تفاوت معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود نانو MGO بتواند کارایی هورمون‌های تخمک‌گذاری را بهبود بخشد و موجب افزایش جذب پروتئین و هورمون در بافت تخمدانی شود و با کارآزمایی‌های بیشتر، در طراحی داروهای تخمک گذاری مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: بلوغ تخمک، اکسید گرافن، گلوتاتیون، رادیکال آزاد

*نویسنده مسئول: **میترا رحیمی فتحکوهی**. پست الکترونیک: mitrarahimi34@yahoo.com
آدرس: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مقدمه

یکی از مهمترین علل ناباروری، با شیوع جهانی ۱۰-۱۵٪، اختلال تخمک گذاری است. بسیاری از روش‌های درمانی از جمله هورمون درمانی، بلوغ آزمایشگاهی (IVM) تخمک‌ها، لقاح آزمایشگاهی (IVF)، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و انجماد جنین‌ها و گامت‌ها تا حدودی به حل این مشکل کمک کرده است [۳-۱]. اگرچه تزریق گنادوتروپین برای به دست آوردن تخمک بیشتر رواج دارد، با این وجود، تحریک بالای تخمدان عوارض جانبی دارد. هزینه‌های سنگین و تخمدان پلی‌کیستیک از جمله پیامدهای این روش است [۳،۴]. کیفیت و شایستگی تخمک‌های IVM به طور قابل توجهی پایین‌تر از تخمک‌های بالغ در شرایط درون تنی است و تعداد کمتری از آنها وارد مرحله متافاز دو (MII) می‌شوند [۵-۷]. از سوی دیگر، بلوغ تخمک آزمایشگاهی بدون مکمل در مقایسه با آنهایی که در شرایط درون تنی بالغ میشوند، پایین تر است. بنابراین، ترکیب محیط کشت نقش کلیدی در بلوغ تخمک، لقاح، رشد جنین دارد و ممکن است بر بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک تاثیر بگذارد [۸-۱۱]. در واقع، کشف روش هایی برای افزایش بلوغ تخمک یکی از راه های بهبود تکنیک های کمک باروری (ART) است.

اخیراً، برخی از نانومواد مانند اکسید گرافن (GO) به دلیل خواص آن از جمله سطح بزرگ آن، قابلیت انتقال الکترون بالا، کشش، هدایت حرارتی، تحویل دارو، مهندسی بافت، ژن درمانی و کاربردهای زیست پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. گرافن اکساید با توجه به بزرگی سطح، می‌تواند جهت بارگذاری مولکول‌های زیستی استفاده شود. در دهه گذشته، پیشرفت سریع فناوری نانو ایده‌های جالب و فرصت‌های فراوانی برای تشخیص و درمان بیماریها به همراه داشته است. کاربرد بیوشیمیایی مواد مبتنی بر گرافن، از جمله تحویل مواد دارویی، به سرعت در چند سال گذشته افزایش یافته است که این ناشی از خواص منحصربه فرد این نانومواد ازجمله ساختار دو بعدی مسطح، پایداری مکانیکی، سمیت سلولی پایین و زیست سازگاری بالای آن است. این خواص موجب رویکرد امیدوارکننده به سوی طراحی سیستم‌های دارورسانی پیشرفته و ارائه طیف جدیدی از درمان بر مبنای گرافن شده است. ساختار مسطح گرافن، قابلیت بسیار عالی در زمینه انتقال مواد از جمله مولکول‌های زیستی فراهم می‌کند. ترکیبی از مواد GO و سوپرپارامگنتیک Fe_3O_4 به‌عنوان یک کاندید خوب برای برخی از برنامه‌های کاربردی مانند حمل دارو معرفی شده است [۱۲].

در برخی زنان نابارور با وجود استفاده از داروهای هورمونی و مکمل‌ها، همچنان پاسخ ضعیف تخمدان‌ها در آنها مشاهده می‌شود. از این رو استفاده از روش‌هایی که بتواند موجب افزایش پاسخگویی تخمدان به گنادوتروپین‌ها شود و موجب تولید تخمک مناسب جهت انجام تکنیک‌های کمک باروری گردد؛ همیشه مورد توجه بوده است. یکی از چالش‌های جدید در حوزه ناباروری زنان، به تاخیر افتادن بارداری به علت عدم پاسخ مناسب تخمدان‌ها به داروهای تحریک تخمک گذاری است. مطالعات زیادی برای ارایه پروتکل های درمانی در این رابطه انجام شده، اما با این وجود هنوز شواهد کافی و قابل استنادی برای معرفی یک پروتکل واحد درمانی وجود ندارد [۱۳]. جهت این بررسی از نانو مگنتیک گرافن اکساید به همراه هورمون PMSG در تزریق داخل صفاقی استفاده شد و این موضوع که ممکن است بتواند موجب اثربخشی بیشتر بر روی اووژنز بافت تخمدانی شود؛ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای سنجش میزان بلوغ سیتوپلاسمی تخمک از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی گلوتاتیون استفاده شد. گلوتاتیون به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و یک عامل کلیدی برای ارزیابی بلوغ تخمک در حیوانات، از آسیب به اجزای سلولی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، جلوگیری می‌کند [۱۴]. گلوتاتیون نقش بهبود فعالیت‌های سلولی را با کاهش ROS ایفا می‌کند. به عبارت دیگر، کاهش گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی با افزایش تولید ROS همراه است. مطالعات پیشین نشان دادند که مکمل آنتی‌اکسیدانی در محیط کشت با افزایش گلوتاتیون سیتوپلاسمی همراه است [۱۶]. غلظت گلوتاتیون در تخمک پس از بلوغ آزمایشگاهی می‌تواند به‌عنوان شاخص بلوغ سیتوپلاسمی تخمک در نظر گرفته شود [۱۷،۱۸].

در مطالعه حاضر اثر میزان بهبود دارورسانی گنادوتروپین‌ها در حضور و عدم حضور نانو مگنتیک گرافن اکساید بررسی شد و تعیین اثر نانو بر روی فولیکوژنز از طریق شمارش تعداد فولیکول در بررسی میکروسکوپی برش‌های بافت تخمدانی گروه‌های مورد مطالعه، بررسی بلوغ هسته‌ای تخمک از طریق مشاهده پولار بادی، بررسی بلوغ سیتوپلاسمی تخمک از طریق اندازه گیری گلوتاتیون و میزان تولید رادیکال آزاد در تخمک با رنگ‌آمیزی فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه افزایش اثربخشی داروهای گنادوتروپین با استفاده از نانو مگنتیک گرافن اکساید و تعیین تاثیر تزریق داخل صفاقی MGO بر بلوغ درون تنی تخمک‌های موش سوری بود.

روش‌ها

موش‌ها و نحوه جمع آوری تخمک‌های متافاز دو

در این مطالعه تجربی، ۳۰ موش ماده نژاد NMRI، ۶ تا ۸ هفته‌ای با وزن ۲۵-۳۰ گرم به‌طور تصادفی در ۶ گروه ۵ تایی قرار گرفتند. موش ها به مدت ۲ هفته در حیوانخانه دانشگاه خوارزمی نگهداری شدند تا با شرایط جدید خو بگیرند. موش‌ها در طی دوره تحقیق دسترسی آزاد به آب و خوراک استاندارد (شرکت به پرور، تهران، ایران) داشتند. شرایط حیوانخانه (۱۲ ساعت: چرخه نور / تاریکی ۱۲ ساعته، دمای ۲۲ C^o) کنترل می‌شد. گروه‌های مورد مطالعه به شرح زیر بود:

گروه کنترل: بدون تزریق هورمون

گروه کنترل با تزریق هورمون: تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد میکروگرم بر میلی لیتر PMSG و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۱۰ واحد HCG

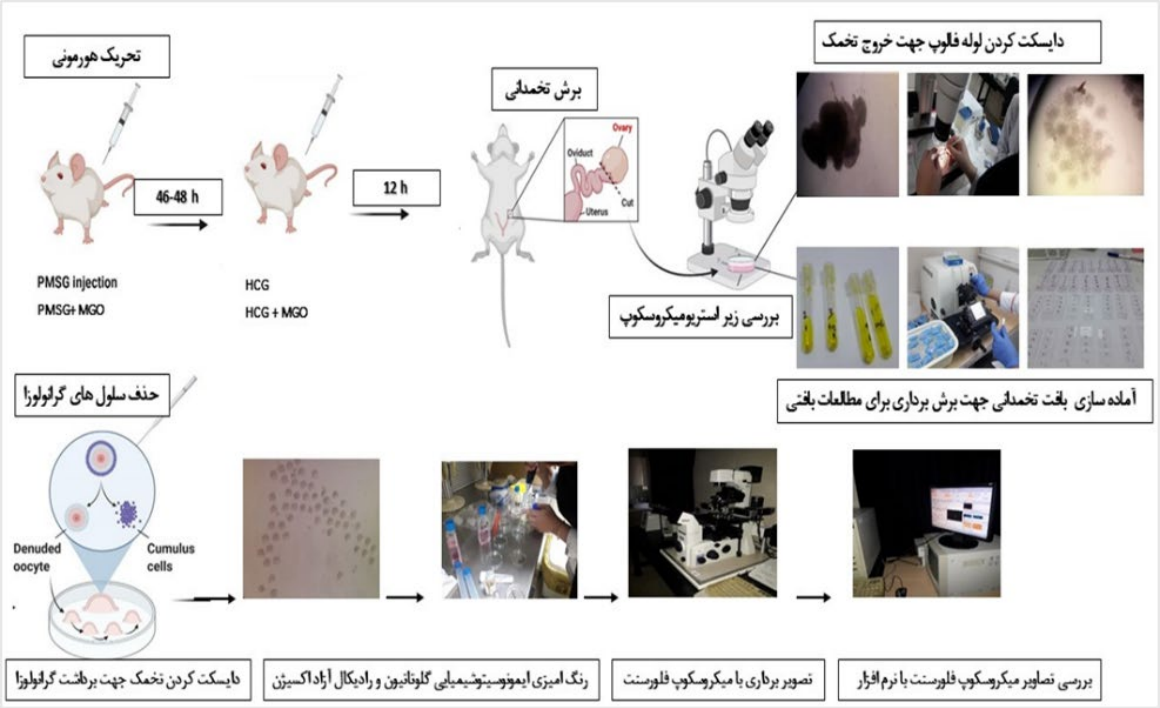
گروه شم: تزریق آب مقطر و ۴۸ ساعت بعد، تزریق۱۰ واحد میکروگرم بر میلی لیتر HCG

گروه هورمون به همراه نانو: تزریق ۱۰ واحد PMSG به همراه ۱۰ واحد میکروگرم بر میلی لیتر نانو و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۱۰ واحد HCG

گروه هورمون به همراه نانو: تزریق ۱۰ واحد PMSG به همراه ۵ واحد نانو، در مرحله دوم، ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۱۰ واحد HCG به همراه ۵ واحد نانو

گروه نانو: تزریق ۱۰ واحد نانو و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۱۰ واحد HCG

برای به دست آوردن تخمک‌های متافاز دو، ۴۸ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین المللی PMSG، ۱۰ واحد بین‌المللی هورمون HCG تزریق شد و پس از ۱۲ ساعت لوله فالوپ خارج و تخمک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. تخمک‌ها در مرحله MII از لوله های فالوپ جمع آوری و سپس در TCM-199 (Tissue Culture Medium 199) کشت داده شدند. در گروه‌های مورد مطالعه نانو و نانو هورمون، ۱۰ واحد بین المللی نانو به صورت داخل صفاقی تزریق شد. موش‌ها به روش جابه جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و با ایجاد شکاف طولی در ناحیه شکم، تخمدان آنها در شرایط استریل خارج و به محیط کشت منتقل شد. تخمدان ها پس از شست‌وشو در زیر استریو میکروسکوپ قرار گرفتند و بافت همبند و چربی اطراف تخمدان‌ها با استفاده از سرنگ‌های انسولین برداشته شد و برای مطالعات پاتولوژیکی در داخل فیکساتور بوئن قرار داده شد (شکل۱).



شکل ۱. مراحل انجام کار از مرحله تزریق داخل صفاقی هورمون و نانو تا جمع‌آوری تخمک و انجام رنگ‌آمیزی

لوله فالوپ به درون محیط HTF (Human Tubal Fluid) به همراه ۱۰٪ SPS (Serum Protein Substitute) انتقال داده شد. سپس با استفاده از سرنگ‌های انسولین، تخمک از لوله فالوپ خارج و بلافاصله بلوغ در آنها بررسی شد. تخمک‌های بدست آمده از لوله فالوپ هر گروه در زیر استریو میکروسکوپ شمارش شدند و جهت ارزیابی بلوغ هسته‌ای و مشاهده پلاربادی در تخمک ها مورد دایسکت قرار گرفتند. برای برداشتن سلول‌های گرانولوز از دور تخمک از آنزیم هیالورونیداز استفاده شد و سپس تخمک ها ارزیابی شدند [۱۹،۲۰].

مواد مورد استفاده

پودر گرافیت طبیعی توسط کارخانه محصولات گرافیتی (Shandong, Laixi China)Qingdao Dingding و ترکیبات H_2SO_4(۹۸٪)، H_2O_2 (۳۰٪)، اسید هیدروکلریک (HCl، ۳۷٪) و $KMnO_4$ از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند.

تهیه نانو هیبرید MGO

MGO با توجه به مطالعات قبلی [۲۳-۲۱, ۱۸-۲۲] سنتز شد.

خصوصیات

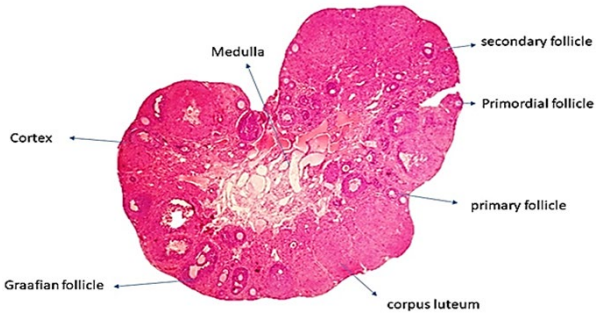
نمونه های آماده شده با استفاده از پراش پرتو ایکس (XRD, Philips Xpert MPD, Co K irradiation, 1.78897AA)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) (میکروسکوپ Philips XL30 با ولتاژ شتاب ۲۵ کیلو ولت) و پراکندگی نور (DLS, Horiba SZ-100) مشخص شدند.

پارامترهای مورد بررسی

فولیکول‌های بافت تخمدانی، جسم زرد بافت تخمدانی، تخمک‌های متافاز II بدست آمده از لوله فالوپ، بلوغ سیتوپلاسمی و میزان رادیکال آزاد درون سیتوپلاسمی تخمک های بالغ در گروه‌ها بررسی شدند.

ارزیابی فولیکوژنز در بافت تخمدان

تخمدان‌های فیکس شده هر گروه در بوئن جهت برش برداری سریالی از تخمدان‌ها و تهیه لام، مورد آبگیری با درجات صعودی الکل قرار گرفت. سپس شفاف سازی نمونه ها با زایلین انجام شد و مراحل بعدی پارافین دهی، قالب گیری و برش گیری توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۶-۷ میکرومتر انجام گرفت و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد. لام‌های آماده شده از برش‌های بافت تخمدانی در گروه‌های مختلف، در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و تعداد فولیکول‌ها در مراحل مختلف و جسم زرد مورد شمارش قرار گرفتند. ملاک شمارش فولیکول و جسم زرد در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲. فولیکول‌های تخمدان موش سوری و معیار شمارش تعداد آنها در گروه‌های مطالعه

سطوح سیتوپلاسمی گلوتاتیون و ROS در تخمک‌ها

برای مطالعه مکانیسم‌هایی که MGO بر بلوغ تخمک‌های موش سوری می‌گذارد، محتوای ROS و گلوتاتیون در تخمک‌های لوله فالوپ اندازه‌گیری شد. تخمک‌های MII به‌دست آمده از گروه‌های کنترل و تیمار با آنتی بادی های گلوتاتیون و ROS رنگ‌آمیزی شدند. ۳۰-۴۰ تخمک MII از گروه های کنترل و تیمار در PBS انکوبه شد و سپس با قطره (Phosphate Baffered Saline) PVA/PBS (Polyvidon Alcohol) شسته شد، زیر روغن معدنی قرار گرفت و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت معکوس در ۳۷۰ نانومتر تصویربرداری گردید. بررسی میزان بیان گلوتاتیون و رادیکال آزاد از روی میزان شدت رنگ شدگی فلورسنت انجام شد و تصاویر با فرمت TIFF ثبت و هر تخمک با نرم افزار Image J مورد سنجش قرار گرفت. داده ها از طریق ارزیابی میزان شدت رنگ‌شدگی با نرم‌افزار Image J به صورت کمی در آمد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در هر گروه ۳۰ تا ۴۰ تخمک در ۳ تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. تمام آزمایشات در تاریکی انجام شد.

محاسبات آماری

آنالیز داده‌ها با نرم افزار Graph Pad Prism 8 و توسط آزمون واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA و تست Tukey انجام گرفت. نتایج به‌صورت Mean±SD گزارش شد. P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد. شدت گلوتاتیون، ROS در تخمک‌ها با تجزیه تحلیل رنگ‌آمیزی با برنامه Image J بررسی و نیمه کمی شد.

ملاحظات اخلاقی

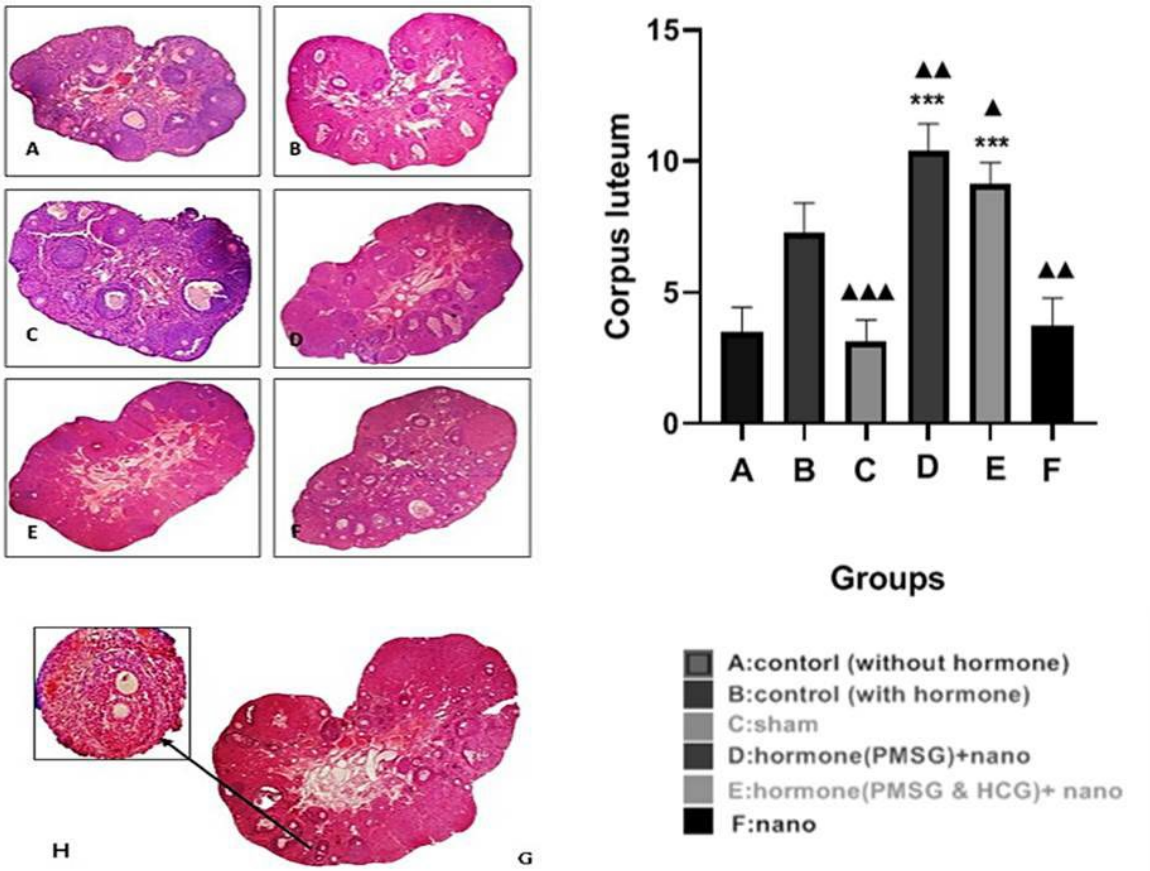
در تمامی مراحل پژوهش، اصول اخلاقی مطابق با منشور اخلاق آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی و همچنین مفاد معاهده هلسینکی رعایت شد و با کد اخلاق IR.KHU.REC.1401.04 ثبت گردید.

نتایج

مطالعه بافت شناسی و مورفومتریک

تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه و گراف در گروه‌های تحت درمان با هورمون مخلوط با MGO در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش یافته است. تعداد فولیکول اولیه در گروه کنترل بدون هورمون در مقایسه با گروه هورمون PMSG و HCG به همراه نانو و گروه نانو MGO اختلاف معنی‌دار دارد. تعداد فولیکول گراف در گروه کنترل بدون هورمون در مقایسه با گروه هورمون اختلاف معنی‌دار دارد (P<۰/۰۱) و در گروه کنترل بدون هورمون در مقایسه با گروه هورمون PMSG به همراه نانو اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) دارد. گروه کنترل بدون هورمون در مقایسه با گروه هورمون PMSG و HCG به همراه نانو اختلاف معنی دار در سطح دارد (P<۰/۰۱). افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول های اولیه و در حال رشد در گروه نانو نسبت به سایر گروه ها وجود دارد. مقدار جسم زرد که نتیجه آزاد شدن تخمک در تخمدان است، افزایش معنی داری در گروه های نانو به همراه هورمون نسبت به سایر گروه ها نشان داد. گروه کنترل با هورمون در مقایسه با گروه هورمون PMSG به همراه نانو اختلاف معنادار دارد (P<۰/۰۱). گروه کنترل با هورمون در مقایسه با گروه نانو اختلاف دارد (P<۰/۰۱). گروه کنترل با هورمون در مقایسه با گروه هورمون PMSG و HCG به همراه نانو اختلاف معنی دار دارد (P<۰/۰۵).

فولیکولوژنز و جسم زرد باقی مانده از انتشار تخمک در گروه های تحت درمان با MGO افزایش یافته است که نشان دهنده افزایش جذب هورمون های PMSG و HCG در گروه‌های تحت درمان با MGO است (شکل ۲ و جدول ۱). تعداد تخمک‌های MII در گروه های PMSG، HCG، MGO و PMSG، MGO در مقایسه با گروه های کنترل و شم به طور قابل توجهی افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). جزئیات مقایسه‌ای تعداد جسم زرد همه گروه‌ها در شکل G۲ و جدول ۲ آمده است. در برخی از تخمدان‌های دریافت کننده هورمون های مخلوط MGO، فولیکول‌هایی با دو تخمک مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳. سمت چپ: تصاویر بافت شناسی از تخمدان ها در گروه کنترل (A, B)، تیمار شده با گروه‌های MGO مخلوط هورمونی (D,E) و نانو MGO در گروه (F) (H & E, × 400). G: افزایش تعداد جسم زرد پس از درمان با MGO .(H) در برخی از تخمدان‌های دریافت کننده MGO، فولیکول‌هایی با دو تخمک نیز مشاهده شد. * P<۰/۰۵، P<۰/۰۱ ** و P<۰/۰۰۱ ***تفاوت معنی داری را بین گروه شاهد بدون هورمون و سایر گروه ها نشان می‌دهد. # P<۰/۰۵، ##P<۰/۰۱ و ###P<۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری را بین گروه کنترل با هورمون و سایر گروه‌ها نشان می‌دهد.

جدول ۱. میانگین فولیکول های تخمدان کنترل و تحت درمان با هورمون‌ها و گروه‌های MGO

گروه پارامتر	کنترل بدون هورمون M±SD	کنترل با هورمون M±SD	شم M±SD	هورمون PMSG به همراه نانو MGO M±SD	هورمون PMSG و HCG به همراه نانو MGO, M±SD	نانو MGO M±SD
فولیکول اولیه	۴±۰/۸۱	۵/۴۲±۱/۱۳	۴/۴۲±۰/۹۷	۵/۷۱±۰/۷۵	*۵/۵۷±۰/۹۷	*۶/۱۴±۱/۰۶
فولیکول گراف	۴±۰/۵۳	۵/۱۱±۰/۶ **	۴/۳۳±۰/۷	***۵/۸۸±۰/۶۰	**۵/۷۷±۰/۶۶	۴/۶۶±۰/۵
جسم زرد	۳/۵±۰/۹۲	۷/۲۵±۱/۱۶	۳/۱۲±۰/۸۳ ###	***۱۰/۳۷±۱/۰۶ ##	***۹/۱۲±۰/۸۳ #	##۳/۷۵±۱/۰۳

تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل (بدون هورمون) و گروه‌های دیگر؛ (*) (P<۰/۰۵)، (**)(P<۰/۰۱)، (***) (P<۰/۰۰۱). تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل (با هورمون) و گروه‌های دیگر؛ (#) (P<۰/۰۵)، (###)(P<۰/۰۱)، (####)(P<۰/۰۰۱).

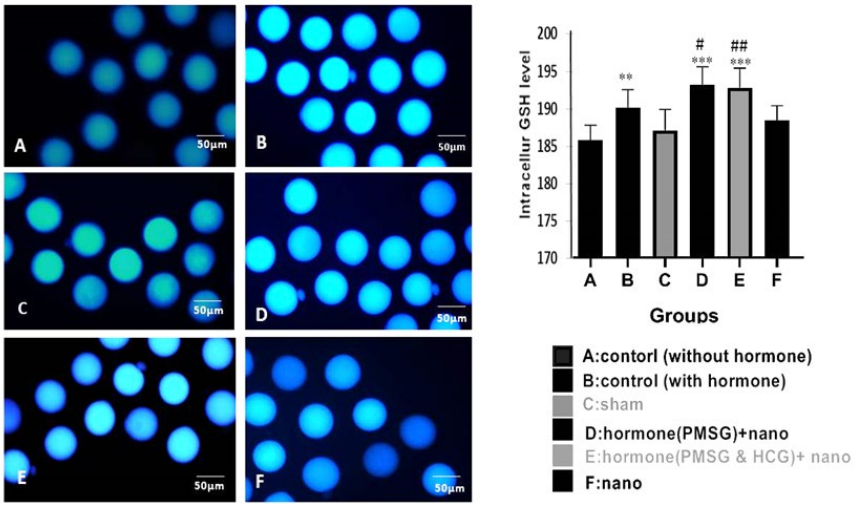
جدول ۲. میانگین تخمک‌های MII به‌دست امده از لوله فالوپ در کنترل و تحت درمان با هورمون‌ها و MGO

گروه پارامتر	کنترل بدون هورمون M±SD	کنترل با هورمون M±SD	شم M±SD	هورمونPMSG به همراه نانوMGO M±SD	هورمون PMSG و HCG به همراه نانو MGO M±SD	نانو MGO M±SD
تخمک متافاز II	۵/۸۳±۰/۷۵	۲۱/۳۳±۱/۹۶ ***	###۵/۱۶±۱/۱۶	##۲۶/۳۳±۱/۳۶ ****	##۲۹/۳۳±۱/۷۵ ****	/۳۳±۱/۰۳ ####۶

تعداد تخمک‌های MII به دست آمده از گروه های مختلف. تعداد تخمک های MII در گروه های هورمون + MGO در مقایسه با گروه کنترل (بدون هورمون) به طور معناداری افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). تفاوت معنی داری بین گروه کنترل + هورمون و گروه هورمون + MGO وجود دارد (P<۰/۰۱ ##).

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون توسط رنگ فلوروسنت Cell Tracker Blue

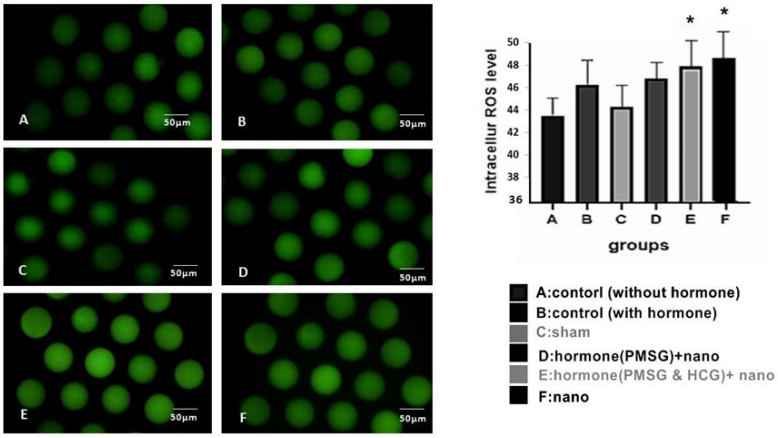
برای تعیین مکانیسم‌هایی که نانوگرافن اکساید بر بلوغ تخمک‌های موش سوری می‌گذارد، سطح گلوتاتیون در تخمک‌های بدست آمده از لوله فالوپ در گروه‌های کنترل و گروه تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت. گلوتاتیون درون سیتوپلاسمی در تخمک‌های بالغ گروه‌های مختلف توسط رنگ فلوروسنت Cell Tracker Blue رنگ‌آمیزی گردید و سپس با میکروسکوپ معکوس فلورسنت در طول موج ۳۷۰ نانومتر تصویربردای شد. تصاویر با فرمت TIFF ثبت و داده‌های هر تخمک با نرم افزار Image J به لحاظ کمیت مورد سنجش قرار گرفت. افزایش گلوتاتیون درون سیتوپلاسمی که نشان دهنده بلوغ سیتوپلاسمی تخمک است؛ در گروه‌های هورمون به همراه نانو به طور معنی‌دار ثبت شد. میزان بیان گلوتاتیون بین گروه کنترل بدون هورمون در مقایسه با گروه PMSG به همراه نانو MGO و گروه PMSG و HCG به همراه نانو افزایش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۰۱). گروه کنترل با هورمون در مقایسه با گروه PMSG و HCG به همراه نانو افزایش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۱) (شکل ۴).



شکل ۴. استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت برای اندازه‌گیری محتوای گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی در تخمک‌های MII در گروه‌های تجربی. *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری را بین گروه شاهد بدون هورمون و سایر گروه ها نشان می دهد. #P<۰/۰۵، ##P<۰/۰۱ و ###P<۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌داری را بین گروه شاهد با هورمون و سایر گروه‌ها نشان می‌دهد. بین کنترل بدون هورمون و PMSG+ MGO و PMSG+HCG+MGO افزایش معنی‌داری وجود دارد P<۰/۰۰۱. افزایش معنی‌داری بین کنترل با هورمون و PMSG+ MGO (P<0.05) PMSG+HCG+MGO (P<0.01) وجود دارد. A: کنترل + هورمون، B: PMSG + MGO، C: PMSG + HCG + MGO، بزرگنمایی: ۱۰۰×.

میزان ROS درون سیتوپلاسمی با رنگ H2DCFDA

استفاده از رنگ امیزی فلورسنت H2DCFDA برای اندازه‌گیری محتوای ROS داخل سیتوپلاسمی در تخمک‌های MII در گروه‌های مختلف، افزایش معنی‌داری بین گروه‌های کنترل با هورمون و گروه نانو به همراه PMSG + HCG و گروه نانو MGO را نشان نداد (شکل ۵). افزایش اندک بیان ROS در گروه‌های تجربی، از اثرات گلوتاتیون و افزایش تعداد تخمک‌های MII جلوگیری نکرد.



شکل ۵. استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت H2DCFDA برای اندازه‌گیری محتوای ROS داخل سیتوپلاسمی در تخمک‌های MII در گروه‌های مختلف. بین کنترل با هورمون و گروه‌های PMSG+HCG+MGO و MGO افزایش معنی داری مشاهده نشد.

بحث

در مطالعه حاضر، میزان فولیکول‌های اولیه، ثانویه، جسم زرد و تعداد تخمک متافاز II به‌دست آمده از لوله فالوپ در گروه‌های تیمار شده با هورمون و نانو MGO افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل بدون نانو داشت؛ که این امر نشان‌دهنده افزایش جذب سرمی هورمون‌های محرک تخمک‌گذاری در حضور این نانو بوده است. بررسی سطوح گلوتاتیون در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که استفاده از نانو MGO باعث افزایش میزان گلوتاتیون در گروه‌های تیمار شده با نانو شده است. با توجه به نتایج این مطالعه، تزریق داخل صفاقی MGO باعث افزایش گلوتاتیون سیتوپلاسمی تخمک‌ها می‌شود. این نتیجه نشان‌دهنده نقش القای MGO در بلوغ و افزایش فولیکوژنز است. گلوتاتیون به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و یک عامل کلیدی برای ارزیابی بلوغ تخمک در حیوانات از آسیب ناشی از ROS جلوگیری می‌کند [۲۴-۱۴]. گلوتاتیون نقش بهبود فعالیت‌های سلولی را با کاهش ROS ایفا می‌کند. به عبارت دیگر، کاهش گلوتاتیون داخل سیتوپلاسمی با افزایش تولید ROS همراه است [۱۵]. به نظر می‌رسد نقش MGO در افزایش تعداد و بلوغ تخمک‌ها با کاهش مقدار ROS در سلول‌ها ایجاد می‌شود. شاید افزایش بلوغ تخمک‌ها توسط MGO از طریق کاهش ROS ناشی از گلوتاتیون باشد. بر اساس این نتیجه تزریق MGO باعث افزایش گلوتاتیون سلولی و تعداد فولیکول‌های تخمدان در مقایسه با گروه کنترل بدون هورمون می‌شود. نشان داده شده که MGO سازگاری زیستی سلول‌ها را بهبود می‌بخشد [۲۲،۲۱]. می‌توان نتیجه گرفت که MGO فعالیت سلول‌های تخمدان را بهبود می‌بخشد و بلوغ آنها را با افزایش گلوتاتیون در سلول‌ها و پس از آن، کاهش چربی در سلول‌های تخمدان تسهیل می‌کند. به‌نظر می‌رسد که MGO باعث افزایش بیان گلوتاتیون سیتوپلاسمی می‌شود و در نتیجه بلوغ تخمک را تسهیل می‌کند.

داروها در صورتی موثر هستند که بتوانند، نیازهای فیزیولوژیکی بدن را در زمان و موقعیت مناسب برآورده کنند. امروزه نانومواد در طراحی سیستم‌های تحویل دارو برای غلبه بر نقص‌ها و معایب فرمولاسیون‌های دارویی معمولی، کاهش مصرف دارو یا افزایش اثربخشی دارو استفاده می‌شود. شیمی سطح منحصر به فرد، سازگاری زیستی بالا و سمیت کم، GO را به‌عنوان یک کاندید مناسب برای سیستم‌های تحویل دارو معرفی می‌کند [۳۳]. گزارش‌های متناقضی در مورد سمیت مشتقات گرافن وجود دارد. در مطالعه‌ای گزارش شده که نانو ذرات کربن تاثیر منفی بر تولیدمثل و فرزندآوری دارند. همچنین اثر مضر نانوذرات کربن بر اسپرم و تخمک گزارش شده است [۲۵]. در مطالعه دیگر، نشان داده شده که اثرات GO بر سمیت سلول‌ها وابسته به دوز است، در حالی که اضافه کردن برخی از مواد، سمیت آن را کاهش می‌دهد [۲۶]. در واقع، استفاده از دوزهای پایین تر در کاهش مارکرهای سمیت موثر است [۲۸]. مهمتر از همه، GOs در دوز ۱-۲۵ گرم بر میلی‌لیتر بر زیست‌پذیری اسپرم تاثیر منفی نمی‌گذارد [۳۲-۲۹]. دوز مورد استفاده در مطالعه حاضر نه تنها غیرسمی بود بلکه اثرات مثبتی در افزایش سطح گلوتاتیون داشت.

سطح گلوتاتیون در طول بلوغ تخمک افزایش می‌یابد به طوری که سطح آن در تخمک در متافاز II، سه برابر مرحله ژرمینال وزیکول GV است. از آنجا که افزایش گلوتاتیون در طول بلوغ تخمک مهم است، بنابراین افزایش سطح آن ناشی از تزریق MGO می‌تواند نشانه‌ای از نقش MGO در افزایش تعداد تخمک‌های متافاز II باشد. تحریک تخمک گذاری ناشی از PMSG و HCG برای افزایش تعداد تخمک‌های آزاد شده به طور گسترده‌ای در کلینیک‌های IVF استفاده می‌شود. پس از تحریک هورمونی تخمک گذاری، مقدار هورمون‌های ترشح شده توسط تخمدان، به ویژه استرادیول و پروژسترون، بیش از حد فیزیولوژیکی است.

تغییرات انجام شده در GO می تواند مقاومت مکانیکی آن را افزایش دهد، ورود آن به سلول را تسهیل کند و همچنین سمیت آن را کاهش دهد. GO دارای مزایایی نسبت به گرافن است مانند گروه‌های عملکردی هیدروفیلی که می تواند اثربخشی دارو را افزایش دهد. همچنین مشخص شده که اثربخشی GO هیبرید شده با پلیمرهای زیستی سازگار مثل آنتی‌بادی‌ها و داروهای خاص سرکوب تومور میتواند تحویل هدفمند دارو را افزایش دهد [۳۴]. به‌عنوان مثال، نشان داده شده که در محیط‌های in vivo و in vitro درمان با GO-polyethylene glycol به‌طور کامل تومورهای سرطان پروستات را در موش‌ها با عوارض کمتر از داروی مورد استفاده از بین می‌برد [۳۶]. به نظر می رسد با توجه به برخی خواص مانند تحویل دارو و جذب پروتئین توسط GO و مشتقات آن، اتصال و ورود هورمون‌های سرم و هورمون‌های تزریقی به سلول‌ها تسهیل می‌شود و در نتیجه میزان تکثیر و بلوغ تخمک‌ها افزایش می‌یابد. یکی دیگر از مکانیسم های ممکن برای توجیه افزایش بلوغ تخمک توسط گرافن می تواند اتصال کووالانسی گلوتاتیون بر روی نانوذرات مغناطیسی مانند MGO باشد [۳۶،۳۷]. GO درونی‌سازی کارآمد و انتشار فلورسانس پایدار در داخل سلول‌ها را نشان می‌دهد و سمیت سلولی پایینی در غلظت‌های مورد استفاده در تصویربرداری دارد [۴۳-۴۲]. این امر GO را به یک کاندید بالقوه برای تحویل دارو و تصویربرداری in vitro یا ex vivo تبدیل می‌کند (تفاوت اصلی بین سنجش in vitro و ex vivo این است که اولی به سادگی یک سیستم سلولی است که در آزمایشگاه کشت سلولی ایجاد شده است. در مقابل، دومی بافتی است که به‌طور مصنوعی ایجاد نشده، بلکه مستقیماً از یک موجود زنده گرفته شده است) که همزمان امکان تشخیص سرطان را فراهم می‌کند.

با توجه به خواص ذکر شده، به نظر می‌رسد MGO با جذب و اتصال به هورمون‌ها و پروتئین‌های خون و سپس تحویل آنها به

سلول‌های فولیکولی باعث تکثیر و بلوغ تخمک‌ها می‌شود. گزارش شده که در حضور GO، پروتئین‌های چسبندگی مانند وینکولین و فیبرونکتین و عوامل رشد مانند BMP به طور موثر بر روی سطح سلول‌ها جذب می‌شوند [۳۸]. به علت محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو در محیط آزمایشگاهی، سطح گلوتاتیون در تخمک در مقایسه با تخمک‌های بالغ شده در شرایط in vitro به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [۳۴-۳۱]. غلظت گلوتاتیون در تخمک پس از بلوغ آزمایشگاهی می‌تواند به‌عنوان شاخص بلوغ سیتوپلاسمی تخمک در نظر گرفته شود [۱۷،۱۸]. سطح گلوتاتیون در تخمک‌های بالغ در شرایط in vivo بسیار بالاتر از سطح آن در تخمک‌های بالغ در شرایط آزمایشگاهی است [۴۱،۴۰]. نتایج حاضر، افزایش رگ‌زایی تخمدان‌ها را نشان داد که به دنبال آن، افزایش تعداد فولیکول‌های فعال است. مطالعه قبلی ما نیز افزایش رگ‌زایی ناشی از MGO را تایید کرد [۲۳]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن MGO به PMSG به‌طور معنی‌داری سطح گلوتاتیون را در اووسیت ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد. اصلاح داروها توسط نانومواد با دو قطب مختلف کارایی آنها را افزایش می‌دهد. تحویل هدفمند دارو با استفاده از GO و مشتقات آن دارای مزایایی نسبت به سایر نانوذرات است. یک هم‌افزایی مثبت در استفاده همزمان نانو مگنتیک گرافن اکساید با هورمون PMSG و HCG برای افزایش تخمک‌گذاری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر، احتمال می‌رود که اثرات هورمون‌های محرک تخمک گذاری می‌تواند با تزریق داخل صفاقی MGO افزایش پیدا کند. به نظر می‌رسد؛ تزریق این نانوذره می تواند کارایی PMSG را در بافت تخمدان افزایش دهد و منجر به افزایش اووژنز و تعداد تخمک‌های متافاز II گردد. افزایش بلوغ تخمک توسط MGO می‌تواند از طریق افزایش جذب هورمون‌های سرم و فاکتورهای رشد باشد. می‌توان گفت که MGO کاندید مناسبی برای دارورسانی هورمونی است، با این وجود نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری است.

تشکر و قدردانی: از کمک‌های ارزشمند دکتر ناصر سلسبیلی تشکر می‌شود. اجرای مطالعه حاضر، بدون حمایت ایشان، دانشگاه خوارزمی و موسسه ملی ژنتیک ایران امکان پذیر نبود.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Valsangkar S, Bodhare T, Bele S, Sai S. An evaluation of the effect of infertility on marital, sexual satisfaction indices and health-related quality of life in women. J Hum Reprod Sci. 2011; 4: 80 doi:10.4103/0974-1208.86088 PMid:22065832 PMCid:PMC3205538
2. Newson A, Smajdor A. Artificial gametes: new paths to parenthood J Med Ethics. 2005; 31(3): 184-6. doi:10.1136/jme.2003.004986 PMid:15738444 PMCid:PMC1734101
3. Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: The French experience. Hum Reprod. 2005; 20: 420 doi:10.1093/humrep/deh603 PMid:15528263
4. Grynberg M, El Hachem H, Bantel AD, Benard J, Parco SI, Fanchin R. In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. Fertil Steril. 2013; 99: 118. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.090PMid:23380185
5. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, et al. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. Hum Reproduct. 2009; 228 doi:10.1093/humrep/dep228 PMid:19597190 PMCid:PMC2743446
6. Chang EM, Song HS, Lee DR, Lee WS, Yoon TK. In vitro maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities. Clin Exp Reprod Med. 2014; 2: 41 doi:10.5653/cerm.2014.41.2.41 PMid:25045627 PMCid:PMC4102689
7. Zhao HC, Ding T, Ren Y, Li TJ, Li R, Fan Y, et al. Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. Hum Reprod. 2016; 31:607 doi:10.1093/humrep/dev345 PMid:26787646
8. Jeon Y, David Yoon J, Cai L, Hwang SU, Kim E, et al. Zinc supplementation during in vitro maturation increases the production efficiency of cloned pigs. Journal of Reproduction and Development 2016; 62: 635. doi:10.1262/jrd.2016-072 PMid:27488694 PMCid:PMC5177983
9. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction. 2001; 121(1):51-75. doi:10.1530/rep.0.1210051 PMid:11226029
10. Combelles CMH. In vitro maturation of human oocytes: Current Practices and Future Promises. Human Reproduction: Updates and New Horizons 2016: 45. doi:10.1002/9781118849613.ch2
11. Rachdi Y, Lachkar A, Najib A, Yacoubi H. Surgical treatment of dupuytren's disease by aponeurectomy (15 Cases). Novel Clin Med 2022; 1(3): 151-155. doi: 10.22034/ncm.2022.338456.1043
12. Pham XH, Hahm E, Kim HM, Son BS, Jo A, An J, et al. Silica-Coated magnetic iron oxide Nanoparticles grafted onto graphene oxide for

protein isolation. Nanomaterials. 2020; 10: 117 doi:10.3390/nano10010117 PMid:31936217 PMCid:PMC7022723
13. Roustaei M, Lahouti A, Shami M. Success Rate of Sarem Protocol for Assisted Reproductive Techniques in Patients with Poor Ovarian Response. Sarem J Reproductive Med. 2019; 4(3): 143-8. doi:10.29252/sjrm.4.3.143
14. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol. 2003; 66(8): 1499-503. doi:10.1016/S0006-2952(03)00504-5 PMid:14555227
15. Lian HY, Gao Y, Jiao GZ, Sun MJ, Wu XF, Wang TY, Li H, et al. Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. Reproduction. 2013; 146(6): 559-68 doi:10.1530/REP-13-0268 PMid:24043846
16. Marthandan S, Murphy MP, Billett E, Barnett Y. An investigation of the effects of MitoQ on human peripheral mononuclear cells. Free Radic Res. 2011; 45(3): 351-8 doi:10.3109/10715762.2010.532497 PMid:21047171
17. Grier HJ, Neidig CL, Grassiotto QI. Development and fate of the postovulatory follicle complex, postovulatory follicle, and observations on folliculogenesis and oocyte atresia in ovulated common snook, Centropomus undecimalis J Morphol. 2017; 278: 547 doi:10.1002/jmor.20652 PMid:28261870
18. Coticchio G, Dal Canto M, Renzini MM, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. Hum Reprod Update. 2015; 21(4): 427 doi:10.1093/humupd/dmv011 PMid:25744083
19. Govil V, Rashmi R, Ritu R, Rani A, Puhal S, Bajaj N. Anesthetic management of a pregnant patient with uncontrolled hyperthyroidism for emergency caesarean section - a case report. Novel Clin Med, 2023; 2(3): 163-167. doi: 10.22034/ncm.2023.412332.1112
20. Kim KJ, Chun JL, Lee KB, Lee JI, Sun Park K, Woo Han K, et al. Effect of acteoside on the re-localization and abnormal morphology of mitochondria in porcine oocytes during in vitro maturation. J Assisted Reprod Genetics. 2016; 1. doi:10.1007/s10815-016-0729-x PMid:27189054 PMCid:PMC4930786
21. Foroutan T, Ahmady F, Moayer F, Khalvati. Effects of intraperitoneal injection of magnetic graphene oxide on the improvement of acute liver injury induced by CCl4. Biomater Res. 2020; 24: 14. doi:10.1186/s40824-020-00192-5 PMid:32864158 PMCid:PMC7449094
22. Foroutan T, Nazemi N, Kassaee MZ, Tavana M, Sonei Shargh S, Zareh zardini H. Suspended graphene oxide nanoparticle for accelerated multilayer osteoblast attachment. J Biomed Mater Res Part A. 2018; 106:293 doi:10.1002/jbm.a.36231 PMid:28891194
23. Foroutan T, Kassaee MZ, Salari M, Ahmady F, Molavi F, Moayer F. Magnetic Fe3O4@graphene oxide improves the therapeutic effects of embryonic stem cells on acute liver damage. Cell Prolif. 2021; 54(11): e13126 doi:10.1111/cpr.13126 PMid:34569673 PMCid:PMC8560617
24. Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL, Krisher RL. Glutathione and adenosine triphosphate content of in vivo and in vitro matured porcine oocytes. Mol Reprod Dev. 2003; 64(4): 492-8 doi:10.1002/mrd.10254 PMid:12589661
25. Holmannova D, Borsky P, Svadlakova T, Borska L, Fiala Z. Reproductive and Developmental Nanotoxicity of Carbon Nanoparticles. Nanoparticles. Nanomaterials. 2022; 12 doi:10.3390/nano12101716 PMid:35630937 PMCid:PMC9144754
26. Batiuskaite D, Grinceviciute N, Snitka V. Impact of graphene oxide on viability of Chinese hamster ovary and mouse hepatoma MH-22A cells. Toxicol Vitr. 2015; 29: 1195-200 doi:10.1016/j.tiv.2015.05.004 PMid:25982263
27. Asghar W, Shafiee H, Velasco V, Sah VR, Guo S, El Assal R, et al. Toxicology Study of Single-walled Carbon Nanotubes and Reduced Graphene Oxide in Human Sperm. Sci Rep. 2016; 6: 30270 doi:10.1038/srep30270 PMid:27538480 PMCid:PMC4990966
28. Mrdanovi J, Šolaji S, Bogdanovi V, Stankov K, Bogdanovi G, Djordjevic A. Effects of fullerenol C60(OH)24 on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. Mutat. Res.Genet. Toxicol Environ Mutagen. 2009; 680; 25-30. doi:10.1016/j.mrgentox.2009.08.008 PMid:19733687
29. Bernabò N, Fontana A, Sanchez MR, Valbonetti L, Capacchietti G, Zappacosta R, et al. Graphene oxide affects in vitro fertilization outcome by interacting with sperm membrane in an animal model. Carbon. 2018; 129: 428-37 doi:10.1016/j.carbon.2017.12.042
30. Aminzadeh Z, Jamalan M, Chupani L, Lenjannezhadian H, Ghaffari MA, Aberomand M, et al. In vitro reprotoxicity of carboxyl-functionalised single- and multi-walled carbon nanotubes on human spermatozoa. Andrologia. 2017; 49, e12741 doi:10.1111/and.12741 PMid:28000929
31. Zhao Y, Wu Q, Wang D. An epigenetic signal encoded protection mechanism is activated by graphene oxide to inhibit its induced reproductive toxicity in Caenorhabditis elegans. Biomaterials. 2016; 79: 15-24 doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.052 PMid: 26686978
32. Kong C, Aziz AI, Kakarla AB, Kong I, KongW. Toxicity evaluation of graphene and poly (Lactic-acid) using a nematode model. Solid State Phenom. 2019; 290: 101-6 doi:10.4028/www.scientific.net/SSP.290.101
33. Yang, XY, Wang Y, Huang X, Ma Y, Huang Y, Yang R, Duan H, et al. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with

dual-targeting function and pH-sensitivity. J Mater Chem. 2011; 21: 3448-54 doi:10.1039/C0JM02494E
34. Jermy BR, Ravinayagam V, Alamoudi WA, Almohazey D, Dafalla H, Hussain L, et al. Targeted therapeutic effect against the breast cancer cell line MCF-7 with a CuFe2O4/silica/cispl nanocomposit formation. Beilstein J Nanotech. 2019; 10: 2217-8 doi:10.3762/bjnano.10.214 PMid:31807407 PMCid:PMC6880833
35. Guo L, Shi H, Wu H, Zhang Y, Wang X, Wu D, An L, et al. Prostate cancer targeted multifunctionalized graphene oxide for magnetic resonance imaging and drug delivery. Carbon. 2016; 107. doi:10.1016/j.carbon.2016.05.054
36. Kuan WC, Lai JW, Lee WC. Covalent binding of glutathione on magnetic nanoparticles: Application for immobilizing small fragment ubiquitin-like-specific protease1. Enzyme Microb Technol. 2021; 143:109697. doi:10.1016/j.enzmictec.2020.109697 PMid:33375983
37. Chen X, Hai X, Wang J. Graphene/graphene oxide and their derivatives in the separation/isolation and preconcentration of protein species: A review. Analytica Chimica Acta. 2016; 922, 1-10 doi:10.1016/j.aca.2016.03.050 PMid:27154826
38. Gonzalez-Rodriguez R, Campbell E, Naumov A. Multifunctional graphene oxide/iron oxide nanoparticles for magnetic targeted drug delivery dual magnetic resonance/fluorescence imaging and cancer sensing. PLoS One. 2019; 14(6): 0217072 doi:10.1371/journal.pone.0217072 PMid:31170197 PMCid:PMC6553710
39. Amaro-Gahete J, Benítez A, Otero R, Esquivel D, Jiménez-Sanchidrián C, Morales J, et al. A comparative study of particle size distribution of graphene nanosheets synthesized by an ultrasound-assisted method. Nanomat. 2019; 9 doi:10.3390/nano9020152 PMid:30691102 PMCid:PMC6409618
40. Dahari RN, Heinemann-Yerushalmi L, Hadas R, Kalich-Philosoph L, Ketter D, Nevo N, et al. Galiani D, et al. Vasorin: a newly identified regulator of ovarian folliculogenesis. FASEB J. 2018; 32: 2124 doi:10.1096/fj.201700057RRR PMid:29259033
41. Leoni GG, Grazia Palmerini M, Satta V, Succu S, Pasciu V, Zinellu A, et al. Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. PLoS One. 2015; 10(4): 24911 doi:10.1371/journal.pone.0124911 PMid:25893245 PMCid:PMC4403920
42. Campbell E, Hasan MT, Pho Ch, Callaghan K, Akkaraju GR, Naumova AV. Graphene Oxide as a Multifunctional Platform for Intracellular Delivery, Imaging, and Cancer Sensing. Sci Rep 2019; 9(1): 416. doi:10.1038/s41598-018-36617-4 PMid:30674914 PMCid:PMC6344482
43. Seabra AB, Paula AJ, de Lima R, Alves OL, Durán N. Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide. Chem Res Toxicol. 2014; 27(2): 159-68. pmid: 24422439 doi:10.1021/tx400385x PMid:24422439

How to Cite this Article:
Rahimi fathkouhi M, Forotan T, Hosseinzadeh Shirzeyli M. Impact of nanomagnetic graphene oxide (MGO) drug delivery with gonadotropin on glutathione levels and free radicals in oocytes during in vivo maturation of NMRI mice. Feyz Med Sci J. 2023; 27 (6) :599-609. doi: 10.48307/FMSJ.2023.27.6.599