

## بررسی تاثیر جلبک اسپرولینا (*Spirulina platensis*) بر ساختار بافت بیضه و

### هورمون های جنسی در موش های نر کوچک آزمایشگاهی

اکبر کریمی<sup>۱</sup>، محبوبه ضیایی<sup>۲</sup>

۱-استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران. karimiakbar38@yahoo.com

۲-کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۵

#### چکیده

زمینه و هدف: اسپرولینا (*Spirulina platensis*) جلبک سبز آبی غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و مواد حیاتی می باشد و در این مطالعه تاثیر آن بر روی فرآیند اسپرماتوژنز در موش های آزمایشگاهی نر مورد بررسی قرار گرفت. روش کار: در این مطالعه ۴۰ سر موش نر سوری به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل: (نرمال سالین)، تیمار ۱: ۷۵ (mg/kg)، تیمار ۲: ۱۵۰ (mg/kg) و تیمار ۳: ۳۰۰ (mg/kg)، اسپرولینا به صورت گاوآذ و به مدت ۳۰ روز و یک روز در میان دریافت کردند. پس از اتمام زمان تیمار، بیضه راست گروه ها خارج و تثبیت گردید و از نمونه ها خون گرفته شد. در نمونه ها سلول های دودمان اسپرماتوژنز، ضخامت اپی تللیال، قطر لومن و سطوح هورمون های تستوسترون، FSH و LH مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها: تعداد اسپرماتوگونی ها، اسپرماتوسیت ها و سطح سرمی هورمون های تستوسترون FSH و LH و هم چنین ضخامت اپی-تلیموم و قطر لوله های اسپرم ساز در گروه تیمار ۳ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد. نتیجه گیری: مصرف اسپرولینا می تواند به افزایش تعداد سلول های دودمان اسپرماتوژنز و میزان هورمون های تستوسترون و FSH در موش های کوچک آزمایشگاهی منجر شود.

واژه های کلیدی: اسپرولینا، بافت بیضه، اسپرماتوژنز، تستوسترون.

#### مقدمه

وحیوانات آزمایشگاهی در کاهش کلسترول و لاغری نقش مهمی دارد. تغذیه با جلبک اسپرولینا باعث فعال شدن ساخت پروتئین ها و همچنین افزایش رشد می شود. جلبک ها به عنوان یک ماده موثر، دارای این ویژگی هستند که باعث تاخیر در روند جذب موادمغذی موجود در جیره غذایی شده و استفاده از کربوهیدرات و پروتئین افزایش یافته، بنابراین استفاده از این جلبک در جیره های غذایی منجر به افزایش رشد می شود (۱۳). جلبک اسپرولینا به عنوان یک منبع پروتئینی بالقوه باتوجه به محتوای پروتئین بالا، وجود اسیدهای چرب ضروری، ویتامین ها و مواد معدنی شناخته شده است. به علاوه، این گونه فاقد دیواره سلولی است که خود منجر به بهبود

اسپرولینا (*Spirulina platensis*) یک جلبک سبز آبی تک سلولی، دارای ساختاری ساده می باشد که در عین حال ترکیبات پیچیده ای دارد. اسپرولینا متعلق به خانواده Oscillatoraceae که معمولاً در آب های قلیایی رشد می نماید. این جلبک منبع متراکمی از مواد غذایی، آنتی اکسیدان ها و پروبیوتیک ها می باشد (۸). اسپرولینا منبع مهمی از پروتئین رنگدانه دار فتوسنتزی به نام فیکوسیاینین C می باشد که خواص فوق العاده ضد التهابی و آنتی اکسیدانی دارد (۱۲، ۷). ارزش غذایی اسپرولینا فوق العاده بالا بوده به گونه ای که ۷۰ درصد وزن خشک آن را پروتئین تشکیل می دهد. یافته ها حاکی از آن است که مصرف اسپرولینا در انسان

تصادفی به ۴ گروه مساوی شامل: کنترل و گروه های تیمار ۱، ۲ و ۳ تقسیم شدند. پودر *Spirulina platensis* از شرکت سینا ریزجلبک قشم خریداری شد (شرکت مزبور زیر نظر وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی اقدام به واردات و تولید محصولات به دست آمده از جلبک های دریایی می کند). جلبک اسپرولینا به صورت خوراکی (گاواژ)، در یک دوره ۳۰ روزه به موش های گروه تیمار ۱، ۲، ۳ به ترتیب ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم داده شد (۶). پس از گذشت ۳۰ روز جهت تهیه ی مقاطع بافتی هر یک از نمونه ها تشریح گردیده و بیضه به همراه اپی دیدیم خارج شده، و به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل گردید. آماده سازی و رنگ آمیزی نمونه ها با استفاده از روش هماتوکسیلین-اوتوزین انجام شد. از مقاطع بافتی هر حیوان تعداد ۱۰ برش به صورت تصادفی انتخاب و در هر برش ۵ مجاری منی ساز (مجموعاً ۵۰ مجرای منی ساز) گرد یا نزدیک به گرد بودند بررسی شدند. برای اندازه گیری قطر لومن و ضخامت اپی تلیوم از نرم افزار Jimage استفاده گردید. تعداد سلول های مجاری منی ساز شامل سلول های اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت اولیه با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $400 \times$  در ۵۰ مجاری منی ساز گرد در هر حیوان شمارش و پس از تعیین میانگین تعداد سلول های فوق در هر گروه با گروه های دیگر مقایسه شدند. در عین حال از هر یک از نمونه ها حدود اسی سی خون گرفته و جهت اندازه گیری هورمون ها به آزمایشگاه منتقل گردید. تشخیص میزان هورمون ها در این تحقیق به روش سنجش ایمنونوآنزیماتیک (EIA) انجام شد. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و در کمیته ی اخلاق دانشگاه به تصویب رسید. داده های جمع آوری شده با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل

دریافت هضم و جذب آن می شود (۳). بررسی ها نشان داده است که عناصر حیاتی مثل آهن، کلسیم، روی، منیزیم، منگنز، سلنیوم به میزان قابل توجهی (۱۹) دارای مقادیری از ویتامین B12، کاروتنوئیدها، اسیدهای آمینه و چرب ضروری می باشد (۷). اسپرولینا خواص بیولوژیکی وسیعی دارد به دلیل وجود آهن و ویتامین ها در آن خاصیت درمان کم خونی دارد (۸). از دیگر خواص آن می توان به جلوگیری از گسترش عفونت های مرتبط با ویروس تب خال و ایدز (۴)، افزایش تولید آنتی بادی ها و ممانعت از تکثیر سلول های سرطانی (۱۸)، کاهش قند خون (۱۶)، کاهش چربی خون (۲)، خاصیت ضد فشارخون در انسان و حیوانات آزمایشگاهی (۱۷)، خواص محافظت از کبد (۱) و تقویت کننده قلب و عروق (۱۰) اشاره کرد. اسپرولینا از قدمت و اعتبار خاصی به لحاظ وجود مواد با ارزش در آن، در دنیای زیست شناسی برخوردار می باشد ولی متأسفانه جایگاه بررسی خواص سودمند آن در کشور ما خالی می باشد. مطالعات نشان داده است که اسپرولینا در بسیاری از کشورها جهت درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرد (۵، ۹). از آن جایی که ناباروری در مردان یک معضل روبه رشد در جامعه ما می باشد و نیاز به درمان های کم هزینه و کم خطر به عنوان یک ضرورت تلقی می شود و باتوجه به این که اسپرولینا دارای ترکیب آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و غنی از مواد معدنی و ویتامین ها می باشد. در این مطالعه به بررسی تاثیرات اسپرولینا روی فرآیند اسپرماتوزن روی موش های نر پرداخته شد.

### مواد و روش ها

در این تحقیق ۴۰ موش سوری نر بالغ با وزن ۲۵ الی ۳۰ گرم انتخاب و در شرایط دمایی  $20 \pm 2$  درجه سانتی گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگه داری شدند. موش ها به صورت

منی ساز در جدول ۱ آورده شده است که میزان عوامل یاد شده نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد ( $P < 0/01$ ).

#### نتایج حاصل از سنجش هورمون ها

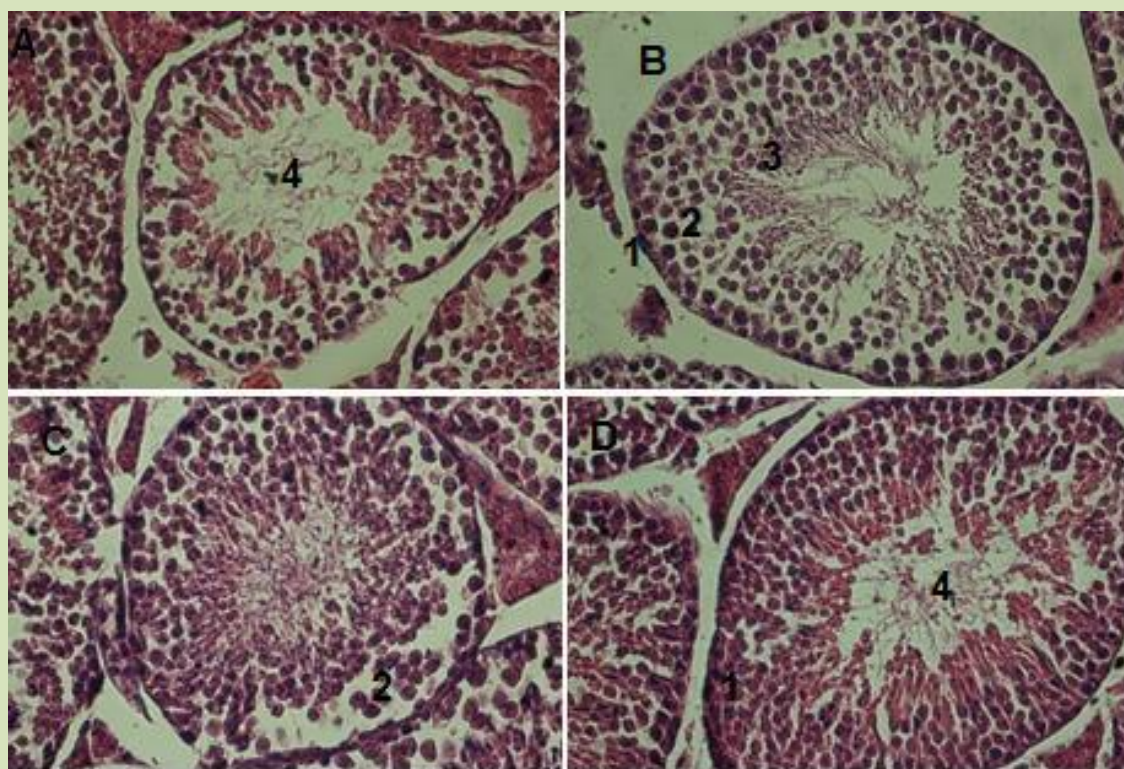
بررسی میانگین سطح سرمی هورمون FSH در سرم خون موش های گروه های تجربی و گروه کنترل بر حسب واحد (mLU/dI) مشخص نمود که میانگین گروه تیمار با دوز تجربی ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل دارای تفاوت معنی داری بود ( $P < 0/01$ ). بررسی میانگین سطح هورمون LH و تستوسترون در سرم خون موش های گروه های تجربی و گروه کنترل بر حسب واحد (mLU/dI) مشخص نمود که میانگین گروه تیمار با دوز تجربی ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل دارای افزایش معنی داری است ( $P < 0/01$ ).

قرار گرفتند. تفاوت ها در صورتی که  $P \leq 0/01$  باشد معنی دار در نظر گرفته شد.

#### نتایج

##### نتایج بررسی مقاطع بافتی

یافته های مورفومتریک حاصل از بررسی و شمارش تعداد اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه با استفاده از مقاطع بافتی تهیه شده و مقایسه ی بین میانگین تعداد اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه در گروه های تجربی و گروه کنترل نشان داد که میانگین تعداد اسپرماتوگونی-ها و اسپرماتوسیت ها در گروه های تجربی با گروه کنترل دارای افزایش معنی داری بود ( $P < 0/01$ ) (جدول ۱). شکل ۱ مقاطع بافتی را در گروه های مورد بررسی نشان می دهد همان طور که ملاحظه می شود در گروه تیمار شده با ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم اسپرولینا افزایش قابل توجهی در سلول های دودمان اسپرماتیدها دیده می شود. میانگین قطر لومن و ضخامت اپی تلیوم لوله های



شکل ۱- مقایسه ی مقاطع بافتی بیضه در گروه های تیمار و کنترل

(A) گروه کنترل، (B) گروه تیمار یک، (C) گروه تیمار دو، (D) گروه تیمار سه. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین (بزرگنمایی ۴۰۰).

۱- اسپرماتوگونی، ۲- اسپرماتوسیت اولیه، ۳- اسپرماتید، ۴- لومن مرکزی

جدول ۱- میانگین پارمترهای بافت بیضه و سلول های اسپرم ساز به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شده است  
تعداد اسپرماتوگونی      تعداد اسپرماتوسیت      قطر لوله اسپرم ساز      ضخامت لایه زاینده اولیه

گروه کنترل	۵۳±۸	۸۱±۱۵	۴۷۰±۸۶	۲۲۰±۳۵
گروه تیمار ۷۵	۵۷±۶	۹۷±۱۸	۵۱۰±۴۸	۲۳۰±۲۸
گروه تیمار ۱۵۰	۸۲±۱۰*	۱۴۲±۸*	۶۲۰±۲۰*	۳۱۰±۴۳*
گروه تیمار ۳۰۰	۸۶±۷*	۱۶۰±۷*	۷۱۰±۳۷*	۴۸۰±۷۶*

\* نشانه معنی دار بودن اختلاف با گروه کنترل می باشد ( $P < 0.01$ ).

جدول ۲- میانگین سطوح سرمی هورمون های جنسی به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شده است

گروه کنترل	تستوسترون (MIu/dl)	(MIu/dl) FSH	(MIu/dl) LH
گروه تیمار ۷۵	۰/۵۴ ± ۰/۳	۰/۱۱ ± ۰/۰۲	۰/۴۳ ± ۰/۰۶
گروه تیمار ۱۵۰	۲/۱ ± ۰/۵	۰/۱۲ ± ۰/۰۳	۰/۲۸ ± ۰/۰۵
گروه تیمار ۳۰۰	۳/۶ ± ۰/۴*	۰/۱۷ ± ۰/۰۴*	۰/۶۹ ± ۰/۰۷*

\* نشانه معنی دار بودن اختلاف با گروه کنترل می باشد ( $P < 0.01$ ).

## بحث و نتیجه گیری

دیابتی با اسپرولینا به بهبود بیان ژن Prdx4 کمک می کند. Prdx4 ژن مهمی در مسیرهای آنتی اکسیدانی می باشد و وجود آن ها در سلول های بافت بیضه به بهبود عملکرد آن ها کمک می کند زیرا در موش هایی که تحت استرس قرار دارند محتوی اسپرم و تحرک آن کاهش می یابد (۳). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج Rudic و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد. آن ها اعلام نمودند که اسپرولینا باعث افزایش سلول های دودمان اسپرماتوژنز می شود و این امر به خاطر خواص آنتی اکسیدانی آن می باشد (۲۰). در این مطالعه مشاهده شد که میزان FSH در گروه های دریافت کننده اسپرولینا افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دارد. FSH باعث تسریع در تقسیم سلولی، تحریک و تبدیل سلول-های اسپرماتوگونی به اسپرماتید می شود، در ضمن با اتصال به سلول های سرتولی سبب تحریک تولید CAMP شده و در نهایت باعث ساخت و ترشح پروتئین متصل شونده به آندروژن می گردد، این پروتئین با اتصال به تستوسترون آن را جهت فرآیند اسپرم زایی به درون لوله-هایی اسپرم ساز هدایت می کند (۱۱). EL-doesky و همکارانش در سال ۲۰۱۳ ثابت کردند که اسپرولینا می تواند پارمترهای کیفیت اسپرم در رت های القا شده با

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تاثیر اسپرولینا با دوزهای ۳۰۰، ۱۵۰ و ۷۵ mg/kg بر روی موش ها افزایش معنی داری در میزان اسپرماتوگونی ها، اسپرماتوسیت ها، سطح سرمی تستوسترون، سطوح LH و FSH، افزایش ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز در مقایسه با گروه کنترل دارد. یکی از نتایج مهم در این مطالعه افزایش میزان سطح سرمی تستوسترون در گروهی است که میزان بالایی از اسپرولینا را دریافت کرده است که با مشاهدات won و همکارانش در سال ۲۰۱۲ هم خوانی دارد. آن هادر سال ۲۰۱۲ با بررسی عصاره اسپرولینا روی فرآیند اسپرماتوژنز در رت های مبتلا به دیابت اعلام نمود که اسپرولینا پارمترهای مانند ضخامت لوله های اسپرم ساز، تعداد سلول های لیدینگ و سطوح سرمی تستوسترون و هم چنین میزان MRNA آنزیم های استروئیدساز را افزایش می دهد (۲۱). بررسی ها نشان داده است که اسپرولینا می تواند بیان ژن های NR5A1، StAR و 17BHsDE را که در مسیرهای استروئید سازی هستند افزایش دهد که همه این عوامل به بهبود عملکرد بیضه ها کمک می کند (۲۱). آزمایشات Agbaje و همکارانش در سال ۲۰۰۷ ثابت کرد که تغذیه موش های



محدود کننده مواجه هستند در نتیجه نوعی استرس بر آن-ها القاء و مصرف اسپرولینا به نحو شایسته ای در فرآیند اسپریماتوزن آن ها تاثیر مثبت ایجاد نموده و این به خاطر ترکیبات بالقوه آنتی اکسیدانی موجود در این گیاه می-باشد. اسپرولینا با دارا بودن خواص آنتی آکسیدانی و هم چنین مواد معدنی مورد نیاز می تواند ضمن افزایش هورمون های جنسی نر به روند ساخت و بهبود اسپرم ها کمک فراوانی نماید.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در دانشگاه پیام نور استان اصفهان انجام شد. از کلیه ی همکارانی که در اجرای این طرح ما را یاری نمودند سپاس گزاری می شود.

جیوه را افزایش دهد و این به خاطر ترکیبات آنتی اکسیدانی آن از قبیل آلفا-توکوفرول، ویتامین C و سلنیوم است که می تواند عملکرد بیضه و نهایتاً کیفیت اسپرم را بالا ببرد (۶). ویتامین C یک آنتی اکسیدان شناخته شده در کیفیت اسپرم بوده و در افزایش تولید آن نقش به سزایی دارد (۱۴). مضافاً این که بتاکاروتن یکی از ترکیبات مهم اسپرولینا می باشد و گزارش شده که این ماده به عملکرد بهتر دستگاه تولید مثل کمک می نماید، در واقع بتاکاروتن می تواند در بهبود سلول های لیدیگ و افزایش تستوسترون تاثیر داشته باشد (۱۵). با توجه به این موضوع که حیوانات آزمایشگاهی با زندگی درون فضاهای بسته به نوعی با فرآیندهای استرسی و

### منابع

1. Abd El-Baky, HH., El Baz, FK., El-Baroty, GS. (2007). Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31; 623-631.
2. Abdel-Daim, MM., Abuzead, SMM., Halawa, SM. (2013). Protective role of *Spirulina platensis* against acute deltamethrin-induced toxicity in rats. *Plos one*, 8; e72991. doi:10.1371/journal.pone.0072991.
3. Agbaje, I. M., Rogers, D. A., McVicar, C. M., McClure, N., Atkinson, A. B., Mallidis, C. (2007). Insulin dependant diabetes mellitus: implications for malereproductive function. *Human Reproduction*, 22; 1871-1877.
4. Ayeahunie, S., Belay, A., Baba, TW., Ruprecht, RM. (1998). Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 18; 7-12.
5. Belay, A. (2002). The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *JANA2*, 27-48.
6. El-Desoky, G., Bashandy, S., Alhazza, I., Al-Othman, Z. (2013). Improvement of mercuric chloride-induced testis injuries and sperm quality deteriorations by *Spirulina platensis* in rats. *Plos*, 5; 27-37.
7. Ferrera-Hermosillo, A., Torres-Duràn, PV., Shamosh-Halabe, S., Juárez-Oropeza, MA. (2011). Biological effects of *Spirulina* and current research on its antioxidant activity. *Revista Internacional de Cienciay Tecnologia Biomédica*. Toctli. RICTB, 2; 1.
8. Hemalatha, K., Pugazhendy, K., Jayachandran, K., Jayanthi, C., Meenambal, M. (2012). Studies on the protective efficacy of *Spirulina* against lead acetate induced hepatotoxicity in *rattus norvegicus*. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 3; 1509-1512.
9. Jarouliya, U., Zacharia, JA., Kumar, P., Bisen, PS., Prasad, GB. (2012). Alleviation of metabolic abnormalities induced by excessive fructose administration in wistar rats by *Spirulina maxima*. *Indian Journal of Medical Research*, 135; 422-428.
10. Khan, M., Shobha, JC., Mohan, IK., Naidu, MU., Sundaram, C., Singh, S. (2005). Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research*, 19; 1030-1037.
11. Kooshesh, L., Dashtnavard, H., Bahadoran, H. (2007). Evaluation of sulfur mustard effect on the spermatogenesis process of mature male rats. *J of Iranian Anatomical Sciences*, 5; 36-27.
12. Mazo, V. K., Gmoshinski, I. V., Zilova, I. S. (2004). Microalgae *Spirulina* in human nutrition. *Voprosy Pitaniia*, 73; 45-53.
13. Mona, N M S. (2015). Protective effect of *Spirulina* against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(1); 45-53.

14. Narayana, K., Prashanthi, N., Nayanatar, A., Kumar, HHC., Abhilash, K. (2005). Effects of methyl parathion (o,o-dimethyl o-4-nitropheny phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. *Mutat Res*, 588; 28-34.
15. Nagasawa, H., Konishi, R., Yamamoto, K., Ben-Amot, A. (1989). Effects of beta-carotene-rich algae on reproduction and body growth in mice. *In Vivo*, 3; 79-81.
16. Parikh, P., Mani, U., Iyer, U. (2001). Role of *Spirulina* in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*, 4; 193-199.
17. Ponce-Canchihuamán, JC., Pérez-Méndez, O., Hernández-Muñoz, R., Torres-Durán, PV., Juárez-Oropeza, MA. (2010). Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids in Health and Disease* 9;35.
18. Premkumar, K., Abraham, SK., Santhiya, ST., Ramesh, A. (2004). Protective effect of *Spirulina fusiformis* on chemical induced genotoxicity in mice. *Fitoterapia*, 75; 24-31.
19. Saxena, PS., Kumar, M. (2004). Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on testicular phosphatases in Swiss albino mice against mercury intoxication. *Indian Journal of Experimental Biology*. 42; 998-1002.
20. Rudic, V., Bulimaga, V., Macaria, V. (2009). BioR-anew preparation from spirulina biomass for reproductive function regulation of sire bulls and boars. *Intern.conf.Bucharest* ; 1-3.
21. Won, H N., Il Kyoo, K., Hae, S A., Mi Jeong, K., Hee-Gyoo, K. (2012). Effect of *Spirulina maxima* on spermatogenesis and steroidogenesis in streptozotocin-induced type I diabetic male rats. *Food Chemistry*, 134; 173-179.

