فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۴، جلد ۹، شماره ۳، تابستان۹۵، صفحه ۲۱ تا ۲۶

بررسی تاثیر جلبک اسپرولینا(*Spirulina platensis*)بر ساختار بافت بیضه و هورمون های جنسی در موش های نر کوچک آزمایشگاهی

اکبر کریمی[۱]، محبوبه ضیایی[۲]
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: ۹۵/٤/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: اسپیرولینا(*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 ٤٠ سر موش نر سوری به صورت تصادفی به ٤ گروه تقسیم شدند: کنترل: (نرمال سالین)، تیمار ۱: ۷۵ (mg/kg)، تیمار۲: ۱۵۰(mg/kg) و تیمار۳: ۳۰۰(mg/kg)، اسپیرولینا به صورت گاواژ 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 تلیال، قطر لومن و سطوح هورمون های تستوسترون، FSH و LH مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها 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-تلیوم و قطر لوله های اسپرم ساز در گروه تیمار ۳ در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد.

نتیجه‌گیری: مصرف اسپیرولینا می تواند به افزایش تعداد سلول های دودمان اسپرماتوژنز و میزان هورمون های تستوسترون و FSHدر موش های کوچک آزمایشگاهی منجر شود.

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

مقدمه

اسپرولینا(*Spirulina platensis*) یک جلبک سبز آبی تک سلولی، دارای ساختاری ساده می باشد که در عین حال ترکیبات پیچیده ای دارد. اسپیرولینا متعلق به خانواده Oscillatoraceae که معمولاً در آب های قلیایی رشد می نماید. این جلبک منبع متراکمی از مواد غذایی،آنتی اکسیدان ها و پروبیوتیک‌ها می باشد(۸). اسپیرولینا منبع مهمی از پروتئین رنگدانه دار فتوسنتزی به نام فیکوسیانینc می باشد که خواص فوق العاده ضد التهابی و آنتی اکسیدانی دارد(۱۲، ۷). ارزش غذایی اسپیرولینا فوق العاده بالا بوده به گونه ای که ۷۰ درصد وزن خشک آن را پروتئین تشکیل می دهد. یافته‌ها حاکی از آن است که مصرف اسپیرولینا در انسان وحیوانات آزمایشگاهی درکاهش کلسترول و لاغری نقش مهمی دارد. تغذیه با جلبک اسپیرولینا باعث فعال شدن ساخت پروتئین هاو 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 وپروتئین افزایش یافته، بنابراین استفاده از این جلبک درجیره های غذایی منجر به افزایش رشد می شود(۱۳). جلبک اسپیرولینا 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

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 تولیدآنتی بادی ها و ممانعت از تکثیر سلول های سرطانی(۱۸)، کاهنده قند خون(۱۶)، کاهنده 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 برخوردارمی باشد ولی متاسفانه جایگاه بررسی خواص سودمندآن در کشور ما خالی می باشد. مطالعات نشان داده است که اسپیرولینا در بسیاری از کشورها جهت درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می‌گیرد(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 اسپیرولینا دارای ترکیب آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و غنی از مواد معدنی و ویتامین ها می باشد. در این مطالعه به بررسی تاثیرات اسپیرولینا روی فرآیند اسپرماتوژنز روی موش های نر پرداخته شد.

مواد وروش ها

در این تحقیق۴۰ موش سوری نر بالغ با وزن ۲۵ الی ۳۰ گرم انتخاب و در شرایط دمایی ۲±۲۰درجه سانتی گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگه داری شدند. موش ها به صورت تصادفی به ۴گروه 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 اسپیرولینا به صورت خوراکی(گاواژ)، در یک دوره ۳۰ روزه به موش های گروه تیمار ۱، ۲، ۳ به ترتیب ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰میلی 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. آماده‌سازی و رنگ آمیزی نمونه ها با استفاده از روش هماتوکسیلین-ائوزین 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 ۴۰۰× در ۵۰ مجاری منی ساز گرد در هر حیوان شمارش و پس از تعیین میانگین تعداد سلول های فوق در هر گروه با گروه‌های دیگر مقایسه شدند. در عین حال ازهر یک از نمونه ها حدود ۱سی سی خون گرفته و جهت اندازه گیری هورمون ها به آزمایشگاه منتقل گردید. تشخیص میزان هورمون ها در این تحقیق به روش سنجش ایمونوآنزیماتیک(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

قرار گرفتند. تفاوت ها در صورتی که P≤ ۰/۰۱ باشد معنی دار در نظر گرفته شد.

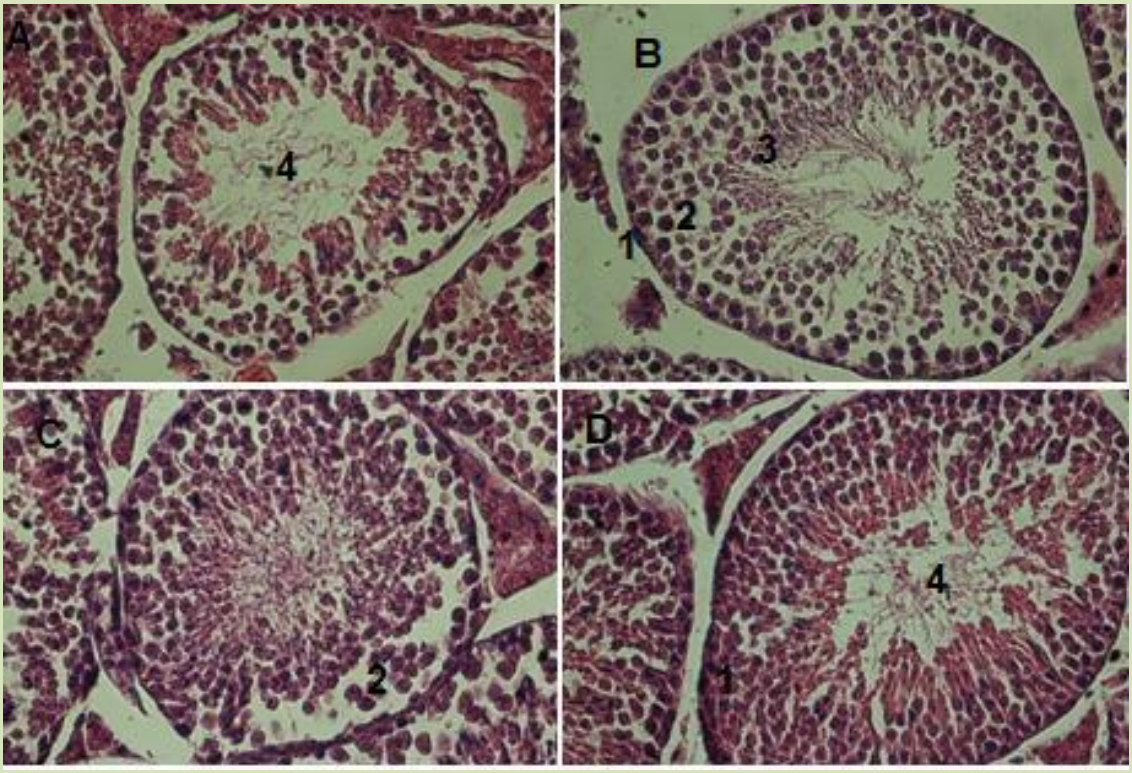
نتایج

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 مقایسه‌ی 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<۰/۰۱)(جدول ۱). شکل ۱مقاطع 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 منی ساز در جدول۱ آورده شده است که میزان عوامل یاد شده نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد(P<۰/۰۱).

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<۰/۰۱). 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<۰/۰۱).



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 ائوزین (بزرگنمایی ۴۰۰).

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

جدول ۱- میانگین پارمترهای بافت بیضه وسلول های اسپرم ساز به صورت mean±SEM ارائه شده است

	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوسیت اولیه	قطر لوله اسپرم ساز	ضخامت لایه زاینده
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<۰/۰۱).

جدول ۲- میانگین سطوح سرمی هورمون های جنسی به صورت mean±SEM ارائه شده است

	تستوسترون (MIu/dl)	(MIu/dl) FSH	(MIu/dl) LH
گروه کنترل	۰/۵۴ ± ۰/۳	۰/۱۱±۰/۰۲	۰/۴۳±۰/۰۶
گروه تیمار ۷۵	۲/۱ ± ۰/۵	۰/۱۲±۰/۰۳	۰/۲۸±۰/۰۵
گروه تیمار ۱۵۰	۲/۵±۰/۲*	۰/۱±۰/۰۴	۰/۳۱±۰/۰۴
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<۰/۰۱).

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تاثیر اسپیرولینا 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 پارامترهای مانند ضخامت لوله های اسپرم ساز، تعداد سلول های لیدیگ و سطوح سرمی تستوسترون و هم چنین میزان MRNA آنزیم های استروئیدساز را افزایش می دهد(۲۱). بررسی ها نشان داده است که اسپیرولینا 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 دیابتی با اسپیرولینا 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 ازاین مطالعه با نتایج Rudicو همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد. آن ها اعلام نمودندکه 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 پارامترهای کیفیت اسپرم در رت های القا شده با

جیوه را افزایش دهد و این به خاطر ترکیبات آنتی اکسیدانی آن از قبیل آلفا-توکوفرول ، ویتامین C و سلنیوم است که می توانند عملکرد بیضه و نهایتاً کیفیت اسپرم را بالا ببرند(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 دربهبود 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 محدودکننده مواجه هستند در نتیجه نوعی استرس بر آن-ها القاء و مصرف اسپرولینا به نحو شایسته ای در فرآیند اسپرماتوژنز 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.

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.Ayehunie, 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 (Arthrospora) 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.Ferrira-Hermosillo, A., Torres-Duràn, PV., Shamosh-Halabe, S., Juàrez-Oropeza, MA. (2011). Biological effects of Spirulina and current research on its antioxidant activity. RevistaInternacional 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., Gmoshinskiı, 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.