

Protective Effect of *Spirulina* and Phycocyanin on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Adult Rats Treated with Hydrogen Peroxide

Katayoun Sedaghatizadeh¹,
Maryam Gholamitabar Tabari²,
Roya Bishekolaei³,
Fatemeh Peyravii Ghadikolaii³,
Farkhondeh Nemati³

¹ PhD Student in Developmental Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran

² Associate Professor, Health Reproductive Research Center, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran

(Received September 11, 2022 ; Accepted November 13, 2022)

Abstract

Background and purpose: About 50% of infertility in couples is related to male factors and oxidative stress is one of the main causes of infertility in men. Hydrogen peroxide has an adverse effect on male reproductive system due to its free radicals. *Spirulina* and phycocyanin are known to have antioxidant properties and can modify stressors.

Materials and methods: In this experimental study, 36 adult male rats were randomly divided into six groups to receive the following: water and normal food, phycocyanin solution (300 mg/kg), *spirulina* (500 mg/kg), hydrogen peroxide solution (0.5%), hydrogen peroxide in drinking water (0.5%) + phycocyanin (300 mg/kg), and hydrogen peroxide in drinking water (0.5%) + *spirulina* (500 mg/kg). Weighing and dissection of testicles were performed for histological study and sperm evaluation.

Results: Hydrogen peroxide had negative effects on testicular tissue, leading to significant decrease in sperm count, sperm motility, and sperm morphology compared with the control group ($P < 0.05$). But, phycocyanin and *spirulina* algae improved the function of testicular tissue, by which improvement in sperm motility, morphology, and mortality was observed. In all parameters, the protective effect of phycocyanin on testicular tissue was better than *spirulina*. The group that received phycocyanin + hydrogen peroxide, showed no significant difference in the number of sperm and number of testicular cells when compared with the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Phycocyanin and *spirulina* algae reduce the harmful effects of hydrogen peroxide on reproductive system of rats by improving some factors in testicle structure and semen parameters.

Keywords: hydrogen peroxide, spirulina, phycocyanin, sperm, testis.

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (216): 49-60 (Persian).

Corresponding Author: Farkhondeh Nemati - Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran. (E-mail: Farkhondehnemati@gmail.com) and Maryam Gholamitabar Tabari - Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran. (E-mail: maryam.tabari407@gmail.com)

اثر محافظتی اسپیرولینا و فایکوسیانین بر بافت بیضه و پارامترهای مایع سیمن در موش صحرایی بالغ تحت تیمار با پراکسید هیدروژن

کتایون صداقتی زاده¹

مریم غلامی تبار طبری²

رویا بیضه کلایی³

فاطمه پیروی قادیکلایی³

فرخنده نعمتی³

چکیده

سابقه و هدف: یکی از دلایل مهم ایجاد کننده ناباروری استرس اکسیداتیو است. پراکسید هیدروژن به دلیل داشتن رادیکال آزاد تاثیر نامطلوبی بر دستگاه تولید مثلی مردانه دارد. از آنجاکه اسپیرولینا و فایکوسیانین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند، می توانند استرس اکسیداتیو را تعدیل نمایند.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی 36 سر موش صحرایی نر بالغ به صورت تصادفی به شش گروه شامل گروه آب و غذای معمولی، گروه محلول 300mg/kg فایکوسیانین، گروه 500 mg/kg اسپیرولینا، گروه محلول 0/5 درصد پراکسید هیدروژن، گروه پراکسید هیدروژن در آب آشامیدنی (0/5درصد) و 300mg/kg فایکوسیانین، گروه پراکسید هیدروژن در آب آشامیدنی (0/5درصد) و 500 mg/kg اسپیرولینا تقسیم شدند. توزین و تشریح بیضه ها جهت مطالعه بافت شناسی و ارزیابی اسپرم انجام شد.

یافته ها: تجویز پراکسید هیدروژن دارای اثرات منفی بر بافت بیضه بود به طوری که منجر به کاهش معنی دار ($P<0/05$) تعداد اسپرم ها، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم ها نسبت به گروه کنترل (Cnt) شده و مرگ و میر اسپرم ها را افزایش داد. از طرف دیگر، فایکوسیانین و جلبک اسپیرولینا سبب بهبود عملکرد بافت بیضه شدند به طوری که بهبود وضعیت تحرک اسپرم، مورفولوژی طبیعی و کاهش مرگ و میر اسپرم نسبت به تیمار پراکسید هیدروژن مشاهده شد. در همه پارامترها اثر محافظتی فایکوسیانین روی بافت بیضه بهتر از جلبک اسپیرولینا بود به طوری که در تیمار فایکوسیانین+پراکسید هیدروژن، تعداد اسپرم و تعداد سلول های بیضه فاقد اختلاف معنی دار با گروه کنترل بوده است ($P<0/05$).

استنتاج: فایکوسیانین و جلبک اسپیرولینا با بهبود بعضی فاکتورها در ساختار بیضه و پارامترهای مایع سیمن اثرات مخرب پراکسید هیدروژن بر دستگاه تولید مثل موش صحرایی را کاهش می دهند.

واژه های کلیدی: پراکسید هیدروژن، اسپیرولینا، فایکوسیانین، اسپرم، بیضه

مقدمه

حدود 50 درصد ناباروری در زوجین مربوط به فاکتورهای مردانه است (1). علاوه بر علل شایع ناباروری مردان مثل واریکوسل، کریپتورکیدیسم، عفونت، انسداد مجاری، فیبروز کیستیک، تروما و تومورها، استرس

E-mail: Farkhondehnemati@gmail.com

E-mail: maryam.tabari407@gmail.com

مؤلف مسئول: فرخنده نعمتی - قانمشهر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قانمشهر، دانشکده علوم پایه

و **مریم غلامی تبار طبری** - ساری: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری

1. دانشجوی دکتری سلولی تکوینی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قانمشهر، قانمشهر، ایران

2. دانشیار، مرکز تحقیقات باروری سالم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران

3. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قانمشهر، قانمشهر، ایران

تاریخ دریافت: 1401/6/20 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/6/26 تاریخ تصویب: 1401/8/22

اکسیداتیو به عنوان یک علت مهم در ناباروری شناخته شده است (2). استرس اکسیداتیو وقتی اتفاق می افتد که بین فعالیت رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدان ها در بدن تعادل وجود نداشته باشد (3). بدن انسان به هر دو نوع گونه اکسیدان (رادیکال های آزاد) و آنتی اکسیدان برای متابولیسم نرمال، انتقالات سیگنالی و تنظیم فعالیت های سلولی احتیاج دارد. بنابراین هر سلول شرایطی را برای ایجاد حالت هموستازی بین گونه های اکسیدان و آنتی اکسیدان ایجاد می کند (4). اما بهم خوردن این تعادل زمینه را برای بروز بیماری های زیادی فراهم می کند. رادیکال های آزاد، مولکول یا قطعات مولکولی هستند که یک یا چند الکترون غیر جفت شده دارند (5). رادیکال های آزاد اکسیژن که به گونه های فعال اکسیژن گفته می شود، یکی از مهم ترین عوامل استرس اکسیداتیو محسوب می شوند. پراکسید هیدروژن یا آب اکسیژنه یکی از قوی ترین گونه های فعال اکسیژن است که در بعضی از واکنش های شیمیایی سلول به ویژه درون میتوکندری تولید می شود. از جمله منابع داخلی تولید رادیکال های آزاد، پراکسی زوم ها، نوتروفیل ها، ماکروفاژها، ائوزینوفیل ها و منابع خارجی مانند اشعه، پرتوهای نوری، ترکیبات شیمیایی، دود سیگار و الکل هستند (4). علاوه بر این پراکسید هیدروژن در زندگی روزمره مردم مانند دندان پزشکی، بسته بندی، صنایع شوینده و ضد عفونی کننده کاربردهای زیادی داشته و انسان ها به طور مستمر در معرض این ماده قرار می گیرند (6،7). فسفولیپیدها و کلسترول در سنتز غشای سلولی، ویتامین ها و انواع هورمون های جنسی مانند تستوسترون نقش دارند. هنگامی که این مواد توسط رادیکال های آزاد تولید شده از پراکسید هیدروژن مورد حمله قرار می گیرند، پراکسیدهای آلی تشکیل می شوند و ماهیت بیولوژیکی آن ها تغییر می کند. در نتیجه با شکستن غشای سلولی، افزایش نفوذپذیری و از دست دادن کنترل بر عملکردهای تخصصی سلول، سلول را تحت تأثیر قرار می دهند (8). اسپرم ها نیز به دلیل دارا بودن مقادیر بالای اسید چرب غیر اشباع و میزان کم

آنتی اکسیدانت های سیترولاسمی، مستعد آسیب فراوانند (9). با افزایش استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی در داخل غشای سلولی اسپرم اتفاق می افتد. دئوکسی ریبونوکلیک اسید (DNA) در هسته و میتوکندری تکه تکه شده و آپوپتوز رخ خواهد داد (1). بین میزان آسیب DNA اسپرم و تشکیل جنین، بلاستوسیت، رشد جنین و بارداری ارتباط معکوس و معنی داری وجود دارد (10). جلبک اسپیرولینا نوعی سیانوباکتر است که در آب های شیرین و قلیایی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می شود و ارزش غذایی بالایی دارد. این جلبک حاوی مقدار قابل توجهی پروتئین (60-70 درصد از وزن خشک)، مقدار زیادی از ویتامین ها مثل B12، اسید آمینه های ضروری مثل گامالینوئیک اسید، مواد معدنی نظیر آهن، منیزیم، منگنز و پتاسیم، کلسیم و روی است (11). نتایج مطالعات پیشین نشان دادند که مصرف روزانه این ماده هیچ تأثیر منفی روی موش های باردار و غیر باردار نداشته است (12،13). این جلبک بر روی کیفیت اسپرم گراز تأثیر مثبتی داشته و به طور معنی داری سبب افزایش کیفیت اسپرم شده است (14). اسپیرولینا بر روی بافت بیضه موش هایی که تحت تأثیر سم آرسنیک بودند نسبت به گروه کنترل نقش حفاظتی داشته است (15) نتیجه یک مطالعه نشان داد که استفاده از این جلبک سبب افزایش حرکت و شکل طبیعی اسپرم مردان در مقایسه با گروه کنترل شده است (16). مطالعات اخیر مزایای حفاظتی اسپیرولینا را به خاطر وجود کاروتن ها و فایکوسیانین موجود در آن دانسته است. فایکوسیانین یک بیلی پروتئین آبدوست است که در سیانوباکترها و برخی از جلبک های قرمز دیده می شود (17). فعالیت بیولوژیکی فایکوسیانین شامل خواص آنتی اکسیدانی، ضد جهشی، ضد ویروسی و ضد توموری است. هم چنین نشان داده شده است که فایکوسیانین سیستم ایمنی را تحریک می کند و فعالیت های محافظت کننده کبدی، ضد پلاکتی و محافظت عصبی از خود نشان می دهد (18). نتایج یک مطالعه نشان داد فایکوسیانین طبیعی استخراج شده از

اسپیرولینا دارای اثرات آنتی اکسیدانی بر روی اریترئیدهای انسانی بودند و توانستند اریترئیدها را از صدمات اکسیدانی محافظت کنند (19). هم چنین فایکوسیانین دارای خاصیت آپوپتوزی روی سلول های سرطانی است (20). این ماده بر توانایی باروری موش های پیر القا شده با دی گلاکتوز موثر بوده و با کاهش رادیکال های آزاد سبب افزایش باروری تخمدان در موش ها شده است (21).

تاکنون گزارشی دال بر زیان بار بودن اسپیرولینا و فایکوسیانین بر روی سیستم تناسلی ارائه نشده است. با توجه به خواص آنتی اکسیدانی اسپیرولینا و فایکوسیانین بر استرس اکسیداتیو، اثرات تجویز خوراکی این دو ماده بر ساختار بیضه و اسپرم در موش های تحت تیمار با پراکسید هیدروژن تا کنون مورد ارزیابی قرار نگرفته است. با توجه به این که فایکوسیانین یکی از مهم ترین ترکیبات موثره موجود در اسپیرولینا می باشد در این مطالعه علاوه بر تاثیر اسپیرولینا، اثر فایکوسیانین به صورت جداگانه نیز بررسی شد تا مشخص شود آیا اثرات مثبت احتمالی اسپیرولینا ناشی از این ترکیب بوده یا سایر ترکیبات موجود در اسپیرولینا در این فرایند موثر بوده اند. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی احتمالی اسپیرولینا و فایکوسیانین بر روی وزن بدن و بیضه، ساختار بافت بیضه و میزان تحرک، قابلیت زنده ماندن و ریخت شناسی اسپرم های اپیدیدیمی در برابر سمیت های تولید مثلی پراکسید هیدروژن در موش های رت نر می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی تعداد 36 سر رت نر بالغ با وزن 180-220 گرم از خانه حیوانات پژوهشکده شمال انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط استاندارد (دمای اتاق 22 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت 50 ± 5 درصد، سیکل نوری 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی) به مدت دو هفته جهت سازگاری با محیط نگهداری شدند. سپس موش ها به طور تصادفی به شش گروه

(کنترل، فایکوسیانین، پراکسید هیدروژن، اسپیرولینا، پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین، پراکسید هیدروژن-اسپیرولینا) تقسیم شدند و به مدت 2 ماه تحت آزمایش قرار گرفتند. مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد علوم پزشکی ساری با کد IR.IAU.SAR.IREC.1400/050 به تصویب رسید و در همه مراحل اجرای مطالعه، قواعد مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی (دستورالعمل کمیسیون اروپا 86/609/EEC و پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد علوم پزشکی ساری) رعایت گردید.

محلول فایکوسیانین و سوسپانسیون اسپیرولینا به حیوانات گاوژ گردید و پراکسید هیدروژن به صورت محلول با غلظت 0/5 درصد در آب آشامیدنی حیوانات اضافه شد. گروه کنترل (Cnt) از آب و غذای معمولی استفاده کردند. گروه فایکوسیانین (Phc) محلول 300mg/kg فایکوسیانین به صورت روزانه دریافت کرد، گروه پراکسید هیدروژن (HPox) محلول 0/5 درصد پراکسید هیدروژن را در آب آشامیدنی دریافت نمود، گروه اسپیرولینا 500 mg/kg (Spir) سوسپانسیون جلبک به صورت روزانه دریافت کردند. گروه پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین (Hp-Pc) محلول 0/5 درصد پراکسید هیدروژن را در آب آشامیدنی و 300mg/kg فایکوسیانین را به صورت گاوژ به مدت 60 روز دریافت داشتند. گروه پراکسید هیدروژن-اسپیرولینا (Hp-Sp)، پراکسید هیدروژن را با غلظت 0/5 درصد در آب آشامیدنی و 500 mg/kg سوسپانسیون جلبک را به صورت روزانه دریافت کردند (22، 23). 24 ساعت پس از آخرین تیمار ابتدا حیوانات با استفاده از کتامین-زیلازین بیهوش و سپس آسان کشی شدند. اپیدیدیم های چپ و راست به منظور بررسی شاخص های اسپرم به محیط T6 حاوی BSA منتقل شده به مدت یک ساعت در انکوباتور 5 درصد CO₂ در دمای 37°C قرار گرفت تا اسپرم ها ظرفیت یابی کنند.

شمارش اسپرم و بررسی تحرک اسپرم‌ها:

تعداد اسپرم، تحرک، و زنده ماندن با استفاده از هموسیتر متر Neubauer مطابق با راهنمای آزمایشگاهی ارزیابی شد. نمونه اسپرم روی شبکه میانی هموسیتر متر پیست شد و در 10 خانه از آن شبکه زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 100 شمارش اسپرم‌های متحرک و غیرمتحرک انجام شد و تعداد اسپرم به میلیون عدد ثبت شد. اسپرم‌ها بر اساس تحرک به سه دسته پیشرونده (P)، غیر پیشرونده (NP) و بی حرکت (IM) تقسیم شدند. سپس، بر اساس تحرک اسپرم، درصد زنده مانده اسپرم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$(Viable\ Sperm\ (N\ and\ NP)) / (200\ Sperm) \times 100$$

در نهایت، برای تجزیه و تحلیل مورفولوژی طبیعی اسپرم، نمونه اسپرم بر روی لام شیشه‌ای پیست شد و روی سطح لام اسمیر کشیده شد. سپس لام اسمیر شده قبل از مشاهده خشک و سپس با ائوزین Y رنگ آمیزی شده، در زیر میکروسکوپ نوری شمرده و طبقه‌بندی شد.

مورفولوژی اسپرم و بررسی اسپرم‌های مرده:

جهت ارزیابی مورفولوژی اسپرم از رنگ آمیزی با ائوزین Y استفاده شد. در این مطالعه اسپرم‌ها به طبیعی و غیرطبیعی تقسیم شدند. اسپرم‌های غیر نرمال شامل: الف) سر نرمال جدا شده از تاژک، ب) سر غیرنرمال جدا شده از تاژک، ج) سر غیرنرمال با تاژک طبیعی، د) سر غیرنرمال با تاژک غیر طبیعی، ه) تاژک دارای نقص‌های دژنراتیو با سر طبیعی و ز) سایر نقص‌های مربوط به تاژک با سر طبیعی تقسیم شدند. تعداد 200 اسپرم برای هر نمونه با درشت نمایی 400 برابر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شد. پس از کالبدگشایی، بیضه موش‌ها توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت 0/001 گرم اندازه‌گیری و نمونه‌های بافتی با رعایت شرایط استریل برداشته و جهت ثبوت به محلول ثبوتی فرمالین 10 درصد منتقل شد.

مطالعه بافتی بیضه:

بعد از تثبیت بافت بیضه در فرمالین به مدت 48 ساعت، نمونه‌ها در سری‌های افزایشی الکل (70 درصد، 80 درصد، 90 درصد و 100 درصد) قرار گرفتند تا آبگیری شوند. سپس نمونه‌ها در دو مرحله با گزیرلول شفاف سازی شدند. بیضه‌ها به صورت عمودی در قالب پارافین مذاب قرار گرفته و قالب‌گیری شدند. و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Letiz German) مقاطعی با ضخامت 5 و فاصله 50 میکرون برش داده شد. نمونه‌ها روی لام فیکس و با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus) مطالعه شد. به منظور مطالعات مورفومتریکی پارامترهای قطر لوله ای، ناحیه لوله‌ای، ارتفاع اپیتلیال، قطر مجرا و ناحیه مجرای محاسبه شد. به این منظور، از میکروسکوپ مجهز به میکرومتر چشمی (10×) و عدسی شی (10×) استفاده شد و فاصله بین دو خط کوچک در میکرومتر چشمی برابر 9/8 میکرون بود. سپس یک برش عرضی بر قطعه فوقانی بیضه و برش عرضی دیگر بر قطعه تحتانی بیضه اعمال شد. به منظور سنجش پارامترهای مورد نظر از 20 مجرای منی ساز استفاده و میانگین‌ها محاسبه شد. جهت شمارش سلول‌ها در هر گروه تعداد 10 برش به صورت تصادفی اندازه‌گیری شد و سلول‌ها شمارش شدند. به این منظور پنج مجرای منی ساز که در مراحل VIII (تولفاز) و VII (آنافاز) چرخه سلولی بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر مجرا، چهار منطقه در زوایای 90، 180، 270 و 360 درجه انتخاب شدند و با یک میکروسکوپ دارای عدسی چشمی که گراتیکول شطرنجی به آن چسبیده بود سلول‌ها شمارش شدند.

نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه شدند. اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 22 محاسبه شد و نتایج با آزمون آماری واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن و بیضه:

مطالعه حاضر نشان داد وزن اولیه بدن موش‌ها و همین‌طور وزن بیضه آن‌ها در گروه‌های شش گانه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. این مسئله نشان می‌دهد گروه‌ها به خوبی کنترل شده بودند. افزایش وزن موش‌ها در گروه کنترل پس از دو ماه 51/7 گرم و در گروه پراکسید هیدروژن 42/2 گرم بوده است. با این‌که افزایش وزن در گروه پراکسید هیدروژن (HPox) نسبت به گروه کنترل کم‌تر بوده است اما این اختلاف معنی‌دار نبود ($P>0/05$). درصد نسبت وزن بیضه به وزن بدن در گروه کنترل 1/31 و در گروه پراکسید هیدروژن 1/26 گرم بوده است. این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>0/05$). در سایر گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌دار بین وزن بدن و درصد نسبت وزن بیضه به بدن مشاهده نشد ($P>0/05$) (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: مقایسه وزن بدن و وزن بیضه موش‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه‌ها	نسبت وزن بین به وزن بدن (g)	وزن بیضه (g)	تغییر وزن (g)	وزن اولیه (g)
Cnt	1/818±0/154	1/65±0/111	51/7±20/2	25/27±1/77
PhC	1/830±0/149	1/66±0/100	49/6±22/2	25/18±20/7
Spir	1/812±0/115	1/64±0/106	50/0±26/8	25/10±19/2
HPox	1/260±0/204	1/52±0/228	42/2±29/3	24/28±25/1
HP-Pc	1/238±0/095	1/53±0/186	44/3±25/3	24/70±22/8
HP-Sp	1/276±0/246	1/53±0/184	44/8±28/0	24/37±21/8

Cnt: کنترل،

PhC: گروه فایکوسیانین،

Spir: اسپیرولینا،

HPox: پرواکسید هیدروژن،

HP-Pc: پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین،

HP-Sp: پرواکسید هیدروژن اسپیرولینا.

ارزیابی خصوصیات اسپرم‌های اپیدیدیمی:

نتایج مربوط به ارزیابی‌های اسپرمی نشان داد که پراکسید هیدروژن باعث کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) تعداد اسپرم‌ها، تحرک اسپرم‌ها و مورفولوژی اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل (Cnt) شده و مرگ و میر اسپرم‌ها را افزایش داده است. در واقع درصد اسپرم مرده، اسپرم بی‌حرکت و اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی در

گروه پراکسید هیدروژن (HPox) نسبت به گروه کنترل (Cnt) افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) داشته است. تجویز فایکوسیانین و سوسپانسیون اسپیرولینا در گروه پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین (Hp-Pc) و پراکسید هیدروژن-اسپیرولینا (Hp-Sp) با آنکه تعداد اسپرم و تحرک اسپرم را بهبود بخشید و مرگ و میر اسپرم را نسبت به گروه پراکسید هیدروژن (HPox) کاهش داد، اما اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد (جدول شماره 2). اما این دو گروه یعنی گروه Hp-Pc و Hp-Sp از نظر فاکتور مورفولوژی اسپرم‌ها، با گروه پراکسید هیدروژن (HPox)، اختلاف معنی‌دار داشته است ($P<0/05$). با تجویز فایکوسیانین و اسپیرولینا، در دو گروه Hp-Sp و Hp-Pc، وضعیت مورفولوژی بهبود یافت و به سطح گروه کنترل نزدیک شد.

جدول شماره 2: اثرات اسپیرولینا و فیکوسیانین بر تعداد سلول‌های بیضه در موش‌های نر در معرض پراکسید هیدروژن.

گروه‌ها	تعداد اسپرماتید	تعداد اسپرماتید اولیه و نرگ	تعداد سلول‌های ژرمینال	تعداد سلول‌های لیدینگ
Cnt	165/8±10/03 a	48/75±3/14 a	9/03±0/344 a	8/23±0/638 a
PhC	165/0±6/55 a	49/20±3/78 a	8/95±0/423 a	7/96±0/861 a
Spir	163/1±10/31 a	48/95±4/28 a	8/87±0/543 a	8/07±0/734 a
HPox	**122/4±26/04b	*40/47±10/32b	***5/92±1/450b	**6/16±1/129b
HP-Pc	*137/6±23/75ab	43/75±11/21ab	**6/87±1/353ab	**6/62±1/189ab
HP-Sp	**131/4±26/06b	*40/67±7/63b	***6/80±1/521b	**6/40±1/308b

* سطح معنی‌داری ($P<0/05$)** سطح معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($P<0/01$)*** سطح معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($P<0/001$)حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار است ($P<0/05$).

Cnt: کنترل،

PhC: گروه فایکوسیانین،

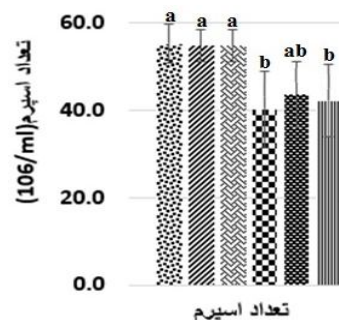
Spir: اسپیرولینا،

HPox: پرواکسید هیدروژن،

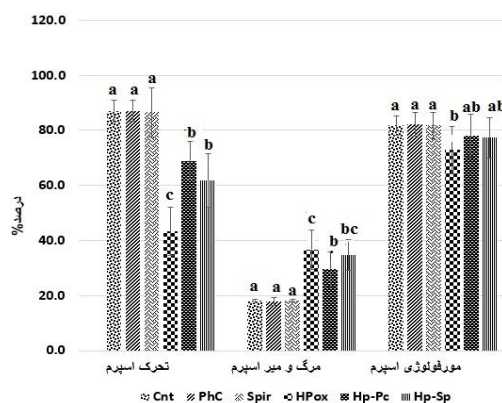
HP-Pc: پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین،

HP-Sp: پرواکسید هیدروژن اسپیرولینا.

در واقع در گروه‌هایی که در کنار تیمار پراکسید هیدروژن، فایکوسیانین و اسپیرولینا دریافت کردند مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها نسبت به گروهی که فقط پراکسید هیدروژن دریافت کردند کم‌تر بوده و این اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بوده است (نمودار شماره 1 و 2).



نمودار شماره 1: تعداد اسپرم ها در گروه های مختلف آزمایشی
حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0/05$)
Cnt: گروه کنترل،
PhC: گروه فایکوسیانین،
Spir: گروه اسپرولینا،
HPox: گروه پرواکسید هیدروژن،
Hp-Pc: گروه پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین،
Hp-Sp: پ گروه پرواکسید هیدروژن اسپرولینا.



نمودار شماره 2: مقایسه درصد اسپرم های مرده، متحرک و دارای مورفولوژی طبیعی در گروه های مختلف
حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0/05$)
Cnt: کنترل،
PhC: گروه فایکوسیانین،
Spir: اسپرولینا،
HPox: پرواکسید هیدروژن،
Hp-Pc: پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین،
Hp-Sp: پرواکسید هیدروژن اسپرولینا.

شمارش سلول ها در بیضه:

نتایج مربوط به شمارش سلول ها نشان داد که میانگین سلول های ژرمینال، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرماتید و سلول های لیدینگ در همه گروه های دریافت کننده پراکسید هیدروژن اختلاف معنی داری

($P < 0/05$) با گروه کنترل (Cnt) داشتند. گروه پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین (Hp-Pc) در تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان نداد ($P > 0/05$). بدین معنی که فایکوسیانین وضعیت اسپرماتوسیت های اولیه و ثانویه را بهبود بخشید (جدول شماره 2).

ارزیابی مورفومتریک لوله های اسپرم ساز:

در ارزیابی های مورفومتریک، ارتفاع اپیتلیال در گروه دریافت کننده پراکسید هیدروژن (HPox) مقایسه با گروه کنترل (Cnt) کاهش معنی دار ($P < 0/05$) داشته است. اما در سایر صفات شامل: لوله اسپرم ساز، ناحیه لوله ای، قطر و ناحیه مجرا، اختلاف معنی داری ایجاد نشد. تجویز فایکوسیانین در کنار تیمار با پراکسید هیدروژن باعث افزایش ارتفاع اپیتلیال شد. در واقع در گروه پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین (Hp-Pc) ارتفاع اپیتلیال اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشت ($P > 0/05$). اما تجویز اسپرولینا در گروه پراکسید هیدروژن-اسپرولینا (Hp-Sp) با آنکه ارتفاع اپیتلیال را در موش های تیمار شده با پراکسید هیدروژن افزایش داد، اما این اختلاف نسبت به گروه HPox معنی دار نبود ($P > 0/05$) (جدول شماره 3) (تصویر شماره 1).

جدول شماره 3: اثرات اسپرولینا و فیکوسیانین بر پارامترهای لوله ای و مجرای موش های نر در معرض پراکسید هیدروژن

گروه ها	ناحیه مجرا (μm)	ارتفاع اپیتلیال (μm)	ناحیه لوله ای (μm)	قطر لوله ای (μm)
Cnt	12837±1865a	125/8±9/24 a	71/5±6/16 a	53468±6904 a
PhC	12690±1831a	125/6±8/94 a	71/0±6/26 a	53733±7323 a
Spir	12707±1819 a	125/2±9/28 a	71/2±9/52 a	52870±5824 a
HPox	14835±3234 a	134/5±15/63 a	59/2±10/65b	48953±11544 a
Hp-Pc	13885±2675 a	130/3±13/59 a	62/2±9/95ab	50624±10273 a
Hp-Sp	13996±2780 a	131/3±13/47 a	62/5±7/48 b	49150±7951 a

*سطح معنی داری نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$).

Cnt: کنترل،

PhC: گروه فایکوسیانین،

Spir: اسپرولینا،

HPox: پرواکسید هیدروژن،

Hp-Pc: پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین،

Hp-Sp: پرواکسید هیدروژن اسپرولینا.

حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها در هر پارامتر است.

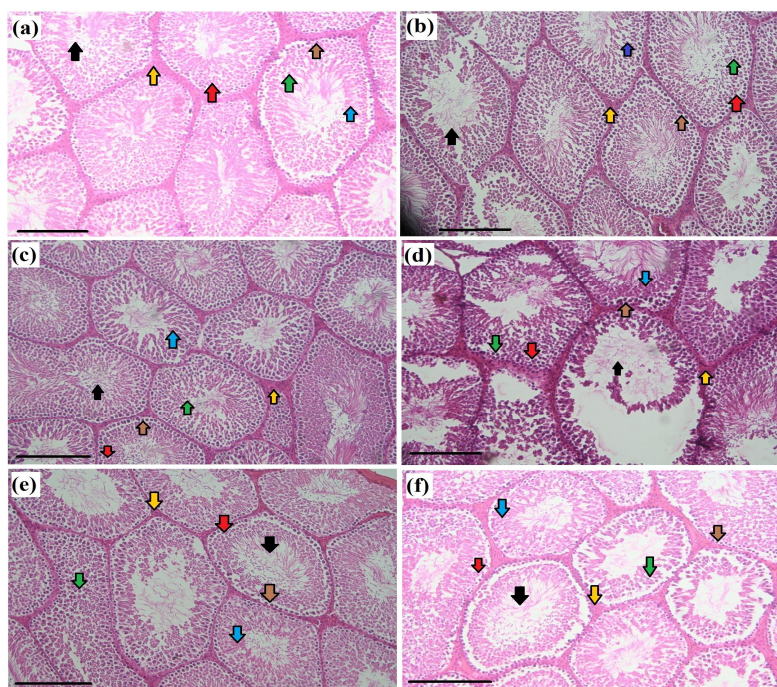
ریخت شناسی بافت بیضه:

در مطالعه بافت شناسی، در گروه کنترل (Cnt) اسپرماتوژنز نرمال و فعال در لوله‌های سمینیفیر همراه با اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ دیده شد. در این لوله‌ها اپیتلیوم ضخامت زیاد داشته و انواع سلول‌های زایا، شامل اسپرماتوگون، اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه،

اسپرماتیدهای گرد جوان، اسپرماتیدهای بالغ دراز یا اسپرماتوزوئید و سلول‌های سرتولی مشاهده شدند. در بیضه موش‌های تیمار شده با پراکسید هیدروژن (HPox) تا حدودی آتروفی لوله‌های اسپرم ساز و ادم بافتی دیده شد. در گروه Hp-Pc و Hp-Sp آسیب بافتی کم‌تری مشاهده شد (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 1: برخی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه‌های تیمار با پراکسید هیدروژن. A: اسپرم طبیعی، B: اسپرم با سر دوشاخه، C: دم گره خورده، D: سر کج. رنگ آمیزی اتونیزین Y، بزرگنمایی 400×



تصویر شماره 2: میکروگراف تهیه شده از مقاطع بافت بیضه و لوله‌های منی‌ساز بعد از رنگ آمیزی با روش هماتوکیلین-اتونیزین. گروه کنترل (A)، گروه فایکوسیانین (B)، گروه اسپیرولینا (C)، گروه پراکسید هیدروژن (D)، گروه پراکسید هیدروژن-فایکوسیانین (E)، گروه پراکسید هیدروژن-اسپیرولینا (F). در گروه A و B روند اسپرماتوژنز و سازمان‌بندی لوله‌های اسپرم ساز طبیعی است. سلول‌های لیدینگ به وضوح مشخص هستند و اپیتلیوم زایا سالم و طبیعی است. در گروه D لایه زایا تخریب شده و مسیر اسپرماتوژنز مختل شده است. در گروه E و F لوله‌های اسپرم ساز تا حدی بهبود یافته و مسیر اسپرماتوژنز طبیعی است. فلش سیاه: اسپرم، فلش قرمز: اسپرماتوسیت اولیه، فلش زرد: اسپرماتوگون، فلش آبی: اسپرماتید، فلش سبز: اسپرماتید گرد، فلش قهوه‌ای: سلول لیدینگ. طول نوار مقیاس 100 میکرومتری باشد.

بحث

در این مطالعه تجویز فایکوسیانین و جلبک اسپیرولینا در موش‌هایی که تحت اثر پراکسید هیدروژن قرار گرفته‌اند، موجب بهبود بعضی فاکتورهای سلامت اسپرم و بیضه شد. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های مطالعات پیشین که نشان داد پراکسید هیدروژن سبب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم و دژنراسیون و نکروز لوله‌های بیضه می‌شود، همسو بوده است (24، 25). علت این تخریب، پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی اسپرم است که به نوبه خود این فرایند بر سیالیت نفوذپذیری غشا اثر می‌گذارد. با کاهش ATP میتوکنندری، کلسیم داخل سلولی افزایش یافته و پروتئازها فعال می‌شوند. علاوه بر این، پراکسیداسیون، باعث هیپرپلازیاسیون غشای میتوکنندری می‌شود که به نوبه خود Bax و Bad و تخلیه سیتوکروم C از میتوکنندری و فعال شدن آبشار کاسپاز را القا می‌کند که در نهایت منجر به آپوپتوز می‌شود (24، 26). هرچند، در مطالعه کنونی آپوپتوز بررسی نشده است و نیاز به مطالعه کامل‌تری در آینده دارد.

در مطالعات پیشین، بررسی بافتی بیضه موش‌های تحت تیمار با پراکسید هیدروژن نشان دادند که رادیکال‌های آزاد باعث مهار اسپرماتوژنز و نکروز لوله‌ها (25) و همچنین کاهش تعداد سلول‌های لیدینگ می‌شوند که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (24، 25). هم‌چنین شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه موش‌های تحت تیمار با پراکسید هیدروژن کاهش معنی‌داری را در تعداد سلول‌ها (سلول ژرمینال، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید گرد) نشان داد که با نتایج مطالعه پیشین همسو است (8). در این مطالعه اثر پراکسید هیدروژن بر قطر لوله‌ای، ناحیه لوله‌ای، قطر و ناحیه مجرا با آن که نسبت به گروه کنترل کاهش داشته، اما این اختلاف معنی‌دار نبود در حالی که پراکسید هیدروژن بر ارتفاع اپیتلیال نسبت به گروه کنترل اثر تخریبی داشته و این اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

در مطالعه حاضر تجویز اسپیرولینا در گروه Hp-Sp باعث بهبود وضعیت تحرک اسپرم، مورفولوژی طبیعی و کاهش مرگ و میر اسپرم شده است و با گروه HPox که فقط پراکسید هیدروژن دریافت داشتند اختلاف معنی‌دار داشته است. به عبارت دیگر، اسپیرولینا در تیمارهای مواجه شده با پراکسید هیدروژن نقش حفاظتی را ایفا کرده است. در مطالعه کیستانوا و همکاران (2009) اسپیرولینا بر روی تحرک و زنده ماندن اسپرم گرازها موثر بوده است (14). مطالعه قبلی نشان داد که تیمار اسپیرولینا در رت‌های تحت استرس اکسیداتیو منجر به کاهش تاثیرات مربوط به استرس اکسیداتیو در بیضه‌ها شده است به‌طوری که محصولات پراکسیداسیون لیپیدی، تغییرات بافت شناسی بیضه و عدم نرمال بودن اسپرم‌ها کاهش داشته است (22). از طرف دیگر، در مطالعه کنونی تیمار اسپیرولینا تاثیری در تعداد سلول‌های بیضه و پارامترهای لوله‌ای و مجرائی موش‌های مواجه شده با پراکسید هیدروژن نداشته است که علت آن می‌تواند ناشی از عدم تاثیر معنی‌دار پراکسید هیدروژن بر این پارامترها باشد. به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد که اسپیرولینا بیشتر نقش حفاظتی داشته و تنها در زمان مواجه با پراکسید هیدروژن که منجر به آسیب شده است نقش حفاظتی خود را نشان می‌دهد.

تجویز فایکوسیانین باعث کاهش مرگ اسپرم‌ها شده و گروه موش‌های تیمار شده با فایکوسیانین (Hp-PC) با گروهی که فقط پراکسید هیدروژن دریافت داشته‌اند (HPox) اختلاف معنی‌دار داشته است. علاوه بر این، نتایج مطالعه کنونی نشان داد که نقش حفاظتی فیکوسیانین نسبت به اسپیرولینا مشهودتر بوده است به طوری که در تیمار فیکوسیانین+پراکسید هیدروژن، تعداد اسپرم و تعداد سلول‌های بیضه فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بوده است و این عدم اختلاف به معنی بهبود پارامترهای سمن در گروه‌های تیمار شده می‌باشد. فیکوسیانین یک پپتید پروتئین متشکل از دو زیر واحد پروتئین‌های α و β است که به کروموژن

خاموش کردن اکسیژن منفرد، مهار رادیکال‌های آزاد و شکستن زنجیره در طول پراکسیداسیون لیپیدی رخ می‌دهد (31). ویتامین E موجود در اسپرولینا از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند و با مهار تشکیل رادیکال‌های آزاد، سطح GSH و اسید اسکوربیک را در بافت آسیب دیده حفظ می‌کند. علاوه بر این، تجویز ویتامین E، کلیه و بیضه را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (32). ویتامین C با کاهش اتصال کووالانسی واسطه‌های فعال و حذف متابولیت‌های رادیکال آزاد، سمیت شیمیایی را کاهش می‌دهد (33). سلنیوم موجود در اسپرولینا آنزیم حاوی سلنیوم GPx، پروتئین‌ها یا ترکیباتی مانند سلنودی گلو تاتیون و سلنوسیستین شناخته شده را القا می‌کند (34). با وجود این، نتایج مطالعه کنونی نشان داد که تاثیرات حفاظتی فیکوسیانین بیش‌تر از جلبک اسپرولینا بوده است که نشان دهنده نقش کلیدی این ترکیب در جلبک اسپرولینا در مقابله با تاثیرات مخرب پراکسید هیدروژن است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکترای زیست‌شناسی تکوینی با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1400/050 است. بدین وسیله از زحمات دکتر علی حسام زاده و کارکنان محترم انستیتو پاستور که در انجام این پروژه همکاری کردند قدردانی می‌شود.

فیکوسیانوبیلین (تتراپیرول با زنجیره باز با ساختار شیمیایی مشابه بلیوردین) متصل می‌شود (27). فیکوسیانین به میزان زیادی در جلبک اسپرولینا یافت می‌شود و به عنوان ترکیبی شناخته می‌شود که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب و ویژگی‌های رادیکال‌زدایی می‌باشد (21). علت استفاده از تیمار فیکوسیانین در مطالعه کنونی، تمایز تاثیرات مثبت احتمالی ناشی از فیکوسیانین (به عنوان مهم‌ترین ترکیب موجود در اسپرولینا) با سایر ترکیبات موجود در جلبک اسپرولینا بوده است. علاوه بر فیکوسیانین، اسپرولینا یک منبع غذایی با ارزش اضافی از برخی مواد مغذی درشت و ریز مغذی از جمله پروتئین با کیفیت بالا، آهن، اسیدهای چرب گاما لینولینیک، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها در نظر گرفته می‌شود (28). نقش محافظتی اسپرولینا را می‌توان به وجود اجزای آنتی‌اکسیدانی قوی مانند b-کاروتن، ویتامین C، E، سلنیوم و رنگدانه پلی‌پتیدی درخشان فیکوسیانین نسبت داد (29). گزارش شده است که بتاکاروتن اسپرولینا ممکن است آسیب سلولی، به ویژه آسیب به مولکول‌های DNA را کاهش دهد، بنابراین در ترمیم روند بازسازی سلول‌های آسیب دیده نقش دارد (30). بتاکاروتن اسپرولینا ممکن است رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط پراکسید هیدروژن را از بین ببرد و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهد. پیشنهاد شده است که مکانیسم آنتی‌اکسیدانی بتاکاروتن از طریق

References

1. Takeshima T, Usui K, Mori K, Asai T, Yasuda K, Kuroda S, et al. Oxidative stress and male infertility. *Reprod Med Biol* 2021; 20(1): 41-52.
2. Elshaari F, Fatum A, Sheriff D. Spermatozoa-A Unique Representation Of Oxygenantioxidant Paradox 2010; 49(1): 48-53.
3. Sies H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants* 2020; 9(9): 852.
4. Seyedi ZS. Oxidative Stress and Human Disease: a Review. *Iran Biology Magazine* 2022; 5(10): 134-141.
5. Delfani N PM, Matin Homaee H. The effects of aerobic exercise and Tribulus terrestris hydroalcoholic extract on oxidative stress markers of lung tissue in H2O2-toxicated male rats. *RJMS* 2021; 28(3): 68-79.
6. Jahed Khaniki G, Safaei P, Barik Gugjlu R, Mohajer A. Determination of peroxide value

- of edible oils used in sandwich and falafel shops in Tehran. Iranian Journal of Health and Environment 2018; 10(4): 501-510.
7. Zang N, Qian X. Influence of organic acid on thermal hazard of hydrogen peroxide. Procedia Eng 2012; 45: 526-532.
 8. Mahood HE. Protective Effect of Sodium Selenite on the Reproductive System of White Male Rats Exposure to Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide. Ann Romanian Soc Cell Biol 2021; 25(4): 5406-5412.
 9. Azad F, Nejati V, Jalali S, Najafi GH, Rahmani F. Protective effect of royal jelly on testicular tissue and sperm characteristics in adult rats treated with nicotine. J Babol Univ Med Sci 2018; 20(3): 50-58 (Persian).
 10. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. Hum Reprod 2010; 25(7): 1594-1608.
 11. Sorrenti V, Castagna DA, Fortinguerra S, Buriani A, Scapagnini G, Willcox DC. Spirulina microalgae and brain health: A scoping review of experimental and clinical evidence. Mar Drugs 2021; 19(6): 293.
 12. Kapoor R, Mehta U. Effect of supplementation of blue green alga (Spirulina) on outcome of pregnancy in rats. Plant Foods Hum Nutr 1993; 43(1): 29-35.
 13. Chamorro G, Salazar S, Favila-Castillo L, Steele C, Salazar M. Reproductive and peri- and postnatal evaluation of Spirulina maxima in mice. J Appl Phycol 1997; 9(2): 107-112.
 14. Kistanova E, Marchev Y, Nedeva R, Kacheva D, Shumkov K, Georgiev B, et al. Effect of the Spirulina platensis included in the main diet on the boar sperm quality. Biotechnol Anim Husb 2009; 25(5-6-1): 547-557.
 15. Bashandy SA, El Awdan SA, Ebaid H, Alhazza IM. Antioxidant potential of Spirulina platensis mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 7174351.
 16. Modarresi R, Aminsharifi A, Foroughinia F. Impact of Spirulina Supplementation on Semen Parameters in Patients with Idiopathic Male Infertility: A Pilot Randomized Trial. Urol J 2019; 16(1): 78-82.
 17. Omar AE, Al-Khalaifah HS, Osman A, Gouda A, Shalaby SI, Roushdy EM, et al. Modulating the Growth, Antioxidant Activity, and Immunoexpression of Proinflammatory Cytokines and Apoptotic Proteins in Broiler Chickens by Adding Dietary Spirulina platensis Phycocyanin. Antioxidants 2022; 11(5): 991.
 18. Park WS, Kim H-J, Li M, Lim DH, Kim J, Kwak S-S, et al. Two classes of pigments, carotenoids and c-phycocyanin, in spirulina powder and their antioxidant activities. Molecules 2018; 23(8): 2065.
 19. Pleonsil P, Soogarun S, Suwanwong Y. Anti-oxidant activity of holo-and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. Int J Biol Macromol 2013; 60: 393-398.
 20. Thangam R, Suresh V, Princy WA, Rajkumar M, Senthilkumar N, Gunasekaran P, et al. C-Phycocyanin from Oscillatoria tenuis exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. Food Chem 2013; 140(1-2): 262-272.
 21. Li Y-J, Han Z, Ge L, Zhou C-J, Zhao Y-F, Wang D-H, et al. C-phycocyanin protects against low fertility by inhibiting reactive oxygen species in aging mice. Oncotarget 2016; 7(14): 17393-17409.
 22. El-Desoky GE, Bashandy SA, Alhazza IM, Al-Othman ZA, Aboul-Soud MA, Yusuf K.

- Improvement of mercuric chloride-induced testis injuries and sperm quality deteriorations by *Spirulina platensis* in rats. *PloS One* 2013; 8(3): e59177.
23. TawfeeK K. Effect of *Nigella sativa* oil treatment on the sex organs and sperm charactors in rats exposed to hydrogen peroxide. *Mesop J Agric* 2006; 34(1): 2-8.
 24. Abdulla JM, Al-Okaily BN. Histomorphometric and Histopathological Alterations of Rat Testis Following Exposure to Hydrogen Peroxide: Protective Role of Resveratrol Supplement. *Iraqi J Vet Med* 2022; 46(1): 17-23.
 25. Al-Muswie RT, Majid A, Al-Rekabi EA, Al-Fartosi KG. Prophylactic Role of Curcuma Longa and Zingiber Officinale on Histological Changes of Testis and Kidney of Male Rats Treated with Hydrogen Peroxide. *Ann Romanian Soc Cell Biol* 2021; 25(4): 3883-3891.
 26. Kopalli SR, Cha K-M, Cho JY, Kim S-K, Koppula S. Cordycepin mitigates spermatogenic and redox related expression in H₂O₂-exposed Leydig cells and regulates testicular oxidative apoptotic signalling in aged rats. *Pharm Biol* 2022; 60(1): 404-416.
 27. Fernández-Rojas B, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Pedraza-Chaverri J. C-phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food Funct* 2014; 5(3): 480-490.
 28. Metwally RA, Abdelhameed RE, Soliman SA, Al-Badwy AH. Potential use of beneficial fungal microorganisms and C-phycocyanin extract for enhancing seed germination, seedling growth and biochemical traits of *Solanum lycopersicum* L. *BMC Microbiol* 2022; 22(1): 1-17.
 29. Naeini F, Zarezadeh M, Mohiti S, Tutunchi H, Ebrahimi Mamaghani M, Ostadrahimi A. Spirulina supplementation as an adjuvant therapy in enhancement of antioxidant capacity: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Int J Clin Pract* 2021; 75(10): e14618.
 30. Anvar A, Nowruzi B. Bioactive properties of spirulina: A review. *Microbial Bioactives* 2021; 4(1): 134-142.
 31. Rosas VT, Monserrat JM, Bessonart M, Magnone L, Romano LA, Tesser MB. Comparison of β -carotene and Spirulina (*Arthrospira platensis*) in mullet (*Mugil liza*) diets and effects on antioxidant performance and fillet colouration. *J Appl Psychol* 2019; 31(4): 2391-2399.
 32. Ma González H, Almirall I, Alpízar J, de Oca RM, Cerdà V. Determination of Vitamin E in Spirulina Platensis extracts and photoprotective creams by multi-syringe Chromatography (MSC) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Anal Lett* 2020; 53(18): 2949-2959.
 33. Han P, Li J, Zhong H, Xie J, Zhang P, Lu Q, et al. Anti-oxidation properties and therapeutic potentials of spirulina. *Algal Res* 2021; 55: 102240.
 34. Zhou N, Long H, Wang C, Zhu Z, Yu L, Yang W, et al. Characterization of selenium-containing polysaccharide from *Spirulina platensis* and its protective role against Cd-induced toxicity. *Int J Biol Macromol* 2020; 164: 2465-2476.