

## مقاله پژوهشی

## اثر محافظتی جلبک اسپیرولینا (آرترواسپیرا پلاتنسیس) بر لقاح آزمایشگاهی و رشد جنین در موش‌های ماده دریافت‌کننده سیکلوفسفامید

گلچین موسوی تومتری<sup>۱</sup>، شاپور حسن زاده<sup>۱\*</sup>، حسن ملکی نژاد<sup>۲</sup>، غلامرضا نجفی<sup>۱</sup>

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۱۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۴

## چکیده

**زمینه و هدف:** سیکلوفسفامید که به‌طور رایج به‌عنوان داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد، باعث آسیب به بافت تخمدان و ناباروری می‌شود. این مطالعه باهدف ارزیابی اثرات محافظتی داروی جلبک اسپیرولینا بر روی لقاح آزمایشگاهی و رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید طراحی شد.

**مواد و روش‌ها:** ۴۰ موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ به ۸ گروه تقسیم شدند. گروه اول به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. گروه‌های دوم تا چهارم، اسپیرولینا را به ترتیب به میزان ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. گروه پنجم سیکلوفسفامید را به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تک‌دوز و داخل صفاقی دریافت نمود. گروه‌های ششم تا هشتم سیکلوفسفامید را همراه با اسپیرولینا با سه دوز ذکر شده دریافت کردند. پس از ۲۸ روز، لقاح آزمایشگاهی و رشد جنین‌ها در تمامی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** در گروه‌های دریافت‌کننده اسپیرولینا با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم همراه با سیکلوفسفامید در مقایسه با گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند، تعداد اووسیت‌ها، درصد لقاح، جنین‌های دوسلولی، بلاستوسیست‌ها و جنین‌های هچ شده افزایش یافته که این افزایش در میزان درصد لقاح و جنین‌های دوسلولی معنی‌داری بوده ( $P < 0/05$ ) ولی اسپیرولینا در دوز ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، قادر به جبران آسیب‌های ناشی از سیکلوفسفامید نبود. **نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این مطالعه، اسپیرولینا دارای اثر محافظتی در برابر سمیت ناشی از سیکلوفسفامید بر لقاح و تولید جنین‌های دوسلولی در محیط آزمایشگاهی است.

**کلمات کلیدی:** اسپیرولینا، سیکلوفسفامید، لقاح آزمایشگاهی، موش سفید کوچک آزمایشگاهی

## مقدمه

فولیکولوژنز قبل از سن ۴۰ سالگی شناخته می‌شود (۱ و ۲). شیمی‌درمانی با القای آسیب حاد فولیکولی، منجر به کاهش در تعداد فولیکول‌ها و همچنین آسیب شدید در کیفیت آن‌ها می‌شود به‌طوری‌که به‌راحتی دچار آترزی می‌شوند (۳).

در بین داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی، عوامل آلکیل‌کننده از سمی‌ترین داروهای ضد سرطان برای غدد جنسی می‌باشند (۴ و ۵) و در بین مواد آلکیل‌کننده، سیکلوفسفامید -سمی‌ترین دارو برای تخمدان است (۴) و باعث تخلیه فولیکولی تخمدان و سرانجام باعث نقص تخمدان می‌شود (۶-۹). در نتیجه سیکلوفسفامید باعث کاهش باروری و به دنبال آن ناباروری می‌شود (۱۰-۱۳). در واقع سیکلوفسفامید با راه‌اندازی جریان آپوپتوز و تخریب DNA منجر به مرگ سلولی شده (۱۴) و در

روش‌های درمانی سرطان از جمله شیمی‌درمانی، می‌توانند مشکلات مخرب زیادی در بدن ایجاد کنند و برخی اثرات جانبی آن‌ها باعث می‌شود بیمار دچار نقایص جبران‌ناپذیر در بقیه طول عمر خود گردد. یکی از عوارض استفاده طولانی‌مدت از داروهای با سمیت سلولی که در برنامه درمان سرطان‌ها اتفاق می‌افتد، ناباروری است که به‌عنوان پیامد ثانویه متعاقب نقص زودرس تخمدان (Premature Ovarian failure (POF است. POF به‌عنوان یک نقص تخمدانی اولیه تعریف می‌شود که با عدم قاعدگی و یا کاهش زودرس فولیکول‌های تخمدان یا توقف

\*نویسنده مسئول: شاپور حسن زاده، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
Email: s.hasanzadeh@urmia.ac.ir  
https://orcid.org/0000-0003-4147-0534



این روند سلول‌های با سرعت تقسیم بالا مانند لنفوسیت‌ها، سلول‌های مشتق از مغز استخوان و سلول‌های جنسی که DNA آن‌ها با سرعت زیادی همانندسازی می‌کنند بیشتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۴). سلول‌های گرانولوزا نقش کلیدی در تنظیم فیزیولوژی تخمدان شامل تخمک‌گذاری و تحلیل جسم زرد بازی می‌کنند، بنابراین می‌توانند نقش اساسی در لقاح و باروری داشته باشند (۱۵). آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا مکانیسم اصلی در فرآیند آترزی فولیکول‌های تخمدانی است (۱۶ و ۱۷). در هر حال سیکلوفسفامید باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی می‌شود (۱۸). استرس اکسیداتیو بر لقای سمیت سیکلوفسفامید بر روی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال دلالت دارد (۱۹). به نظر می‌رسد فولیکول‌های آنترال به استرس اکسیداتیو ناشی از آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا بسیار حساس‌اند (۱۹).

سمیت تخمدان‌های تحت تأثیر داروهای شیمی‌درمانی، تقریباً همیشه برگشت‌ناپذیر است در نتیجه حفاظت ذخایر فولیکولی آن و جلوگیری از ناباروری ناشی از به‌کارگیری چنین موادی، می‌تواند در بهبود روند زندگی فردی که دچار مشکل سرطان شده مؤثر باشد. استرس اکسیداتیو به علت عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بروز می‌کند (۲۰). به‌منظور کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از داروهای شیمی‌درمانی، می‌توان از عناصر آنتی‌اکسیدانی استفاده کرد. مطالعات زیادی بر روی اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدان‌ها در تخمدان در برابر مواد شیمی‌درمانی انجام شده است. از جمله این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توان ویتامین E (alpha-Tocopherol) و اسید اسکوربیک را نام برد که باعث محافظت تخمدان در برابر ترکیبات فعال اکسیژن می‌گردند و سطح رادیکال‌های آزاد تولیدشده در طول دوره استفاده از داروی سیکلوفسفامید را کاهش می‌دهند (۲۱ و ۲۲).

اسپیرولینا یک ریز جلبک سبز-آبی است که حاوی رشته‌های مارپیچی است. در بسیاری از مطالعات *in vivo* و *in vitro* خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی آن به اثبات رسیده است (۲۳ و ۲۴). جلبک سبز آبی اسپیرولینا (اسپیرولینا پلاتنسیس) به علت میزان پروتئین بالا و ارزش غذایی فراوان، به‌عنوان غذای انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این جلبک غنی از ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب ضروری و رنگ‌دانه‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل کارنوتینوئید است (۲۵). از جمله این ویتامین‌ها می‌توان به سیانوکوبالامین (Cyanocobalamin)، ریپوفلاوین

(Riboflavin)، پیروکسیدین (Pyridoxine)، آلفاتوکوفرول (ویتامین ای)، ویتامین آ و ث و از رنگ‌دانه‌های مفید آن می‌توان به زآگزانتین (Zeaxanthin)، دایاتوزانتین (Diatoxanthin)، میکسوزانتوفیل (Myxoxanthophyl)، اوسیلزانتین (Oscillaxanthin) اشاره کرد (۲۶). به‌ویژه اسپیرولینا یک منبع غنی رنگ‌دانه از فیکوسیانین (Phycocyanin) که یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است، بوده (۲۷ و ۲۸) و خاصیت از بین بردگی رادیکال‌های آزاد (رادیکال‌های هیدروکسیل و پروکسیل) را دارد (۲۹). مطالعات نشان داده‌اند که اسپیرولینا در شرایط اکسیداتیو مختلف که باعث آسیب بافتی می‌شوند، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (۳۰-۳۲). نتایج تحقیقی که بر روی اثرات محافظتی اسپیرولینا در برابر سمیت ناشی از میکوتوکسین انجام گرفته است نشان داد که اسپیرولینا استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط میکوتوکسین را با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش گلو‌تاتیون، به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد (۳۳). همچنین اسپیرولینا با حذف رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدی، استرس اکسیداتیو ناشی از دلتامترین را که باعث بروز سمیت در بافت کبد و کلیه می‌شود، کاهش می‌دهد (۳۴).

از آنجاکه تاکنون اثر داروی گیاهی اسپیرولینا پلاتنسیس که یک داروی گیاهی با منشأ جلبکی است، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید بر روی رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی مورد بررسی قرار نگرفته است، در این مطالعه، اثر محافظتی اسپیرولینا بر بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های تحت درمان با سیکلوفسفامید مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات آزمایشگاهی

برای انجام این مطالعه تجربی ۴۰ موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ ۸ هفته‌ای با وزن متوسط ۲۰ گرم در نظر گرفته شد. حیوانات در شرایط استاندارد، دوره نوری نرمال (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) و درجه حرارت کنترل‌شده  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰٪ نگهداری شدند. همه موش‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. موش‌ها در ۸ گروه ۵ تایی تقسیم‌بندی شدند.

و زیلازین ( $0/2\text{mg/kg}$ )، به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان کشتی شدند. سپس اوبدکت جدا شده و در دیش‌های استریل حاوی محیط کشت HTF ترکیب شده با ۴ میلی‌گرم BSA قرار داده شدند و تخمک‌گیری به روش شکافتن (Dissecting) از ناحیه آمپول لوله رحمی (اوبدکت) در زیر استریومیکروسکوپ (اولیمپوس، ژاپن) صورت گرفت. تخمک‌های به‌دست‌آمده پس از شست‌وشو، در داخل قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت لقاح در زیر روغن معدنی (Mineral oil, sigma) حاوی محیط HTF محتوی ۴ میلی‌گرم BSA گذاشته شدند. لازم به ذکر است که محیط‌های کشت موردنیاز برای لقاح آزمایشگاهی روز قبل از لقاح تهیه و سپس به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور با ترکیب گازی  $\text{CO}_2$  ۵٪ و دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شدند.

برای لقاح اووسیت‌ها، اسپرم‌های جمع‌آوری شده از دم اپیدیدیم موش‌های نر بالغ و سالم که برای ظرفیت‌یابی به مدت یک ساعت در انکوباتور با ترکیب گازی  $\text{CO}_2$  ۵٪ و دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شده بودند، به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر، به محیط کشت اضافه شدند و پس‌از آن به مدت ۴-۶ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  و ترکیب گازی  $\text{CO}_2$  ۵٪ انکوبه شدند. پس‌از این مدت، تعداد زیگوت‌ها با مشاهده دو پیش‌هسته نر و ماده در هر گروه بررسی گردیده و به‌صورت درصد لقاح در هر گروه بیان گردید (۳۶). ارزیابی روند رشد جنین‌ها (دوسلولی، بلاستوسیست‌ها و جنین‌های هچ شده) همچنین جنین‌های متوقف‌شده در روزهای ۴ و ۵ بعد از انکوباسیون در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۷).

### آنالیز آماری

نتایج این مطالعه با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۱ و آزمون Benferoni مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. یافته‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقدار  $P < 0/05$  برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

### نتایج

در این مطالعه مشخص شد که تعداد اووسیت‌ها در گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان می‌دهد ( $P < 0/05$ ). همچنین در گروه‌های تحت درمان با اسپیرولینا در هر سه گروه نسبت به گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت می‌کردند، افزایش در تعداد اووسیت‌ها وجود داشت اما فقط در گروه

گروه اول: این گروه به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. گروه دوم: حیوانات این گروه روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسپیرولینا به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. گروه سوم: حیوانات این گروه روزانه ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسپیرولینا به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. گروه چهارم: حیوانات این گروه روزانه ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت خوراکی اسپیرولینا به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. گروه پنجم: این گروه سیکلوفسفامید را به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تک دوز و داخل صفاقی دریافت کردند (۳۵).

گروه ششم: این گروه سیکلوفسفامید را به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تک دوز و داخل صفاقی و روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسپیرولینا به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز و به‌صورت هم‌زمان دریافت کردند.

گروه هفتم: این گروه سیکلوفسفامید را به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تک دوز و داخل صفاقی و روزانه ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسپیرولینا به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز و به‌صورت هم‌زمان دریافت کردند.

گروه هشتم: این گروه سیکلوفسفامید را به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تک دوز و داخل صفاقی و روزانه ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اسپیرولینا به‌صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز و به‌صورت هم‌زمان دریافت کردند.

### آماده کردن موش‌ها برای لقاح آزمایشگاهی (تخمک‌گیری)

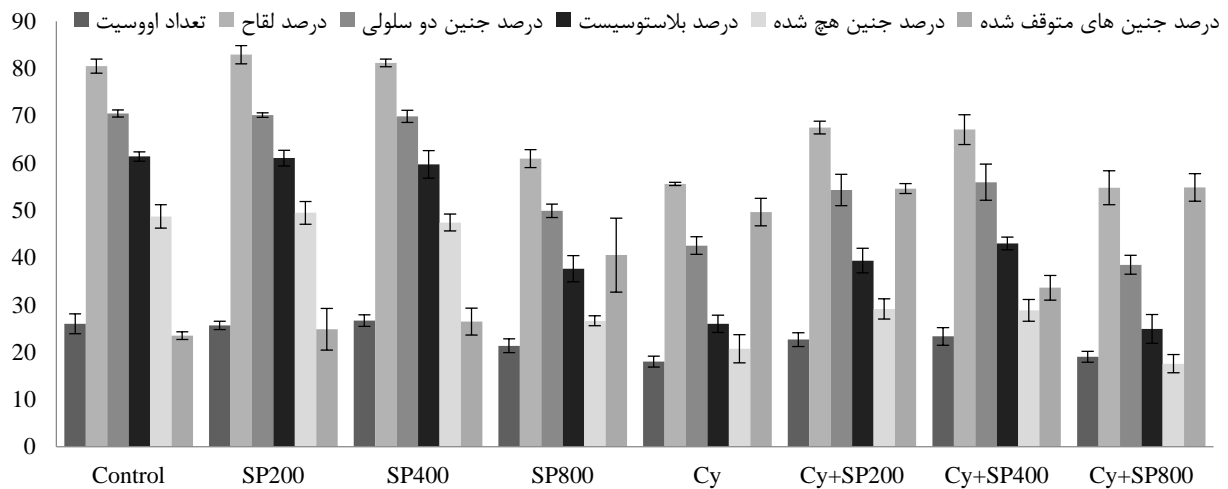
در این مطالعه برای به دست آوردن اووسیت به‌منظور بررسی درصد لقاح و کیفیت جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی نیاز به تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های ماده بود که به این صورت انجام گرفت:

پس از پایان دوره درمان ابتدا به موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ، ۱۰ واحد بین‌المللی (IU) هورمون گنادوتروپین مادیان آبستن (PMSG = Pregnant mare serum gonadotropin) (شرکت فولیگون - هلند) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، هورمون گنادوتروپین جفت انسان (HCG = Human chorionic gonadotropin) (شرکت سیگما) به میزان ۱۰ واحد بین‌المللی (IU) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. موش‌ها ۱۰ الی ۱۲ ساعت بعد از تزریق HCG (صبح روز بعد)، پس از بی‌هوشی با کتامین ( $0/5\text{mg/kg}$ )

**جدول ۱- میانگین تعداد اووسیت، درصد لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی، درصد بلاستوسیست‌ها و درصد جنین‌های هج شده و جنین‌های متوقف‌شده**

گروه‌ها	تعداد اووسیت	درصد لقاح	درصد جنین‌های دوسلولی	درصد بلاستوسیست‌ها	درصد جنین‌های هج شده	درصد جنین‌های متوقف‌شده
کنترل	26±2/08	80/53±1/48	70/5±0/75	61/39±0/99	48/72±2/44	23/74±0/81
اسپیرولینا ۲۰۰	25/66±0/88	82/93±1/91 <sup>b</sup>	70/14±0/47 <sup>b</sup>	61/05±1/68 <sup>b</sup>	49/48±2/40 <sup>b</sup>	24/85±4/41 <sup>b</sup>
اسپیرولینا ۴۰۰	26/66±1/20 <sup>b</sup>	81/17±0/81 <sup>b</sup>	69/88±1/31 <sup>b</sup>	59/73±2/92 <sup>b</sup>	47/42±1/78 <sup>b</sup>	26/46±2/84 <sup>b</sup>
اسپیرولینا ۸۰۰	21/33±1/45	60/93±1/90 <sup>c</sup>	49/91±1/44 <sup>c</sup>	37/67±2/77 <sup>c</sup>	26/62±1/04 <sup>c</sup>	40/55±7/83
سیکلوفسامید	18±1/15 <sup>a</sup>	55/60±0/36 <sup>a</sup>	42/54±1/86 <sup>a</sup>	26±1/80 <sup>a</sup>	20/74±2/98 <sup>a</sup>	49/66±2/92 <sup>a</sup>
سیکلوفسامید+اسپیرولینا ۲۰۰	22/66±1/45	67/52±1/33 <sup>d,e</sup>	54/34±3/31 <sup>d,e</sup>	39/37±2/60 <sup>d</sup>	29/14±2/12 <sup>d</sup>	54/59±1/04 <sup>d</sup>
سیکلوفسامید+اسپیرولینا ۴۰۰	23/33±1/85	67/09±3/13 <sup>d,e</sup>	55/95±3/84 <sup>d,e</sup>	43/01±1/36 <sup>d,e</sup>	28/84±2/27 <sup>d</sup>	33/63±2/62
سیکلوفسامید+اسپیرولینا ۸۰۰	19±1/15	54/77±3/59 <sup>d</sup>	38/49±1/97 <sup>d</sup>	24/92±3/07 <sup>d</sup>	17/56±1/95 <sup>d</sup>	54/84±2/89 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، <sup>b</sup> نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه سیکلوفسامید، <sup>c</sup> نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، <sup>d</sup> نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، <sup>e</sup> نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه سیکلوفسامید



**نمودار ۱- مقایسه تعداد اووسیت، درصد لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی، درصد بلاستوسیست‌ها، درصد جنین‌های هج شده و درصد جنین‌های متوقف‌شده در گروه‌های مختلف آزمایشی (SP: اسپیرولینا، Cy: سیکلوفسامید)**

اووسیت‌های هر سه گروه دریافت‌کننده اسپیرولینا و سیکلوفسامید در مقایسه با گروهی که فقط سیکلوفسامید دریافت می‌کردند افزایش یافته ولی اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۱) (نمودار ۱ و شکل ۱).

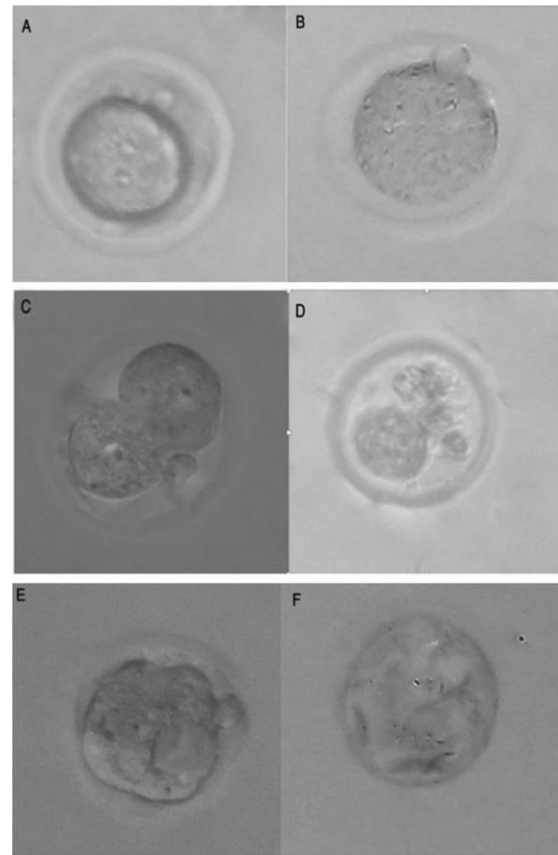
در این مطالعه مشخص گردید که درصد لقاح گروه سیکلوفسامید نسبت به گروه کنترل کاهش یافته و این اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0/05$ ). همچنین درصد لقاح گروه‌هایی که فقط اسپیرولینا دریافت می‌نمودند در مقایسه با گروهی که

اسپیرولینا با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین یافته‌ها نشان دادند که در گروه‌های تحت درمان با اسپیرولینا در هر سه دوز نسبت به گروه کنترل کاهش در تعداد اووسیت‌ها وجود داشته ولی این اختلاف معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). در مقایسه تعداد اووسیت‌های گروه کنترل با گروه‌هایی که سیکلوفسامید با اسپیرولینا دریافت می‌کردند کاهش در تعداد اووسیت در هر سه گروه مشاهده شد ولی اختلاف معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). یافته‌ها همچنین نشان دادند که تعداد

۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با سیکلوفسفامید در مقایسه با گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت می کرد، افزایش داشته و این افزایش معنی دار است ( $P < 0/05$ ) ولی در دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم کاهش نشان داد (جدول ۱) (نمودار ۱).

این مطالعه نشان داد که درصد جنین های دوسلولی به دست آمده در گروه سیکلوفسفامید کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشتند ( $P < 0/05$ ). درصد جنین های دوسلولی در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا در مقایسه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید نشان داد که در هر سه گروه افزایش نسبت به گروه سیکلوفسفامید وجود داشت و این افزایش فقط در گروه های اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین مقایسه درصد جنین های دوسلولی در گروه های اسپیرولینا با گروه کنترل کاهش نشان داد اما این کاهش فقط در گروه دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار ( $P < 0/05$ ) است. همچنین نتایج نشان داد در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا به همراه سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل درصد جنین ها در هر سه گروه کاهش معنی داری یافته است ( $P < 0/05$ ). درصد جنین های دوسلولی در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه هایی که فقط سیکلوفسفامید دریافت می کردند افزایش نشان داده و این افزایش معنی دار است ولی در دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم کاهش نشان داد (جدول ۱) (نمودار ۱ و شکل ۱).

درصد بلاستوسیست های گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین گروه هایی که دوزهای مختلف اسپیرولینا دریافت کرده بودند نسبت به گروه سیکلوفسفامید افزایش درصد بلاستوسیست را نشان دادند که این افزایش در گروه ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار ( $P < 0/05$ ) بود. درصد بلاستوسیست در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا نسبت به گروه کنترل کاهش یافته اما فقط در گروه اسپیرولینا با دوز ۸۰۰ این کاهش معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). درصد بلاستوسیست در گروه هایی که همراه سیکلوفسفامید، اسپیرولینا دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری در هر سه گروه نشان داد ( $P < 0/05$ ). درصد بلاستوسیست ها در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با



شکل ۱- یک اووسیت بارور شده (A) با یک پرونوکلئوس نر و یک پرونوکلئوس ماده و همچنین یک اووسیت بارور نشده (B) پنج ساعت بعد از لقاح. یک جنین در مرحله دوسلولی سالم، ۲۴ ساعت بعد از کشت جنین ها (C) و یک جنین دوسلولی لیز و فراگمنته شده ۲۴ ساعت بعد از کشت جنین ها (D). یک جنین در مرحله مورولای متراکم شده سه الی چهار روز بعد از کشت جنین ها در محیط HTF (E) و یک بلاستوسیست سه الی چهار روز بعد از کشت جنین ها در محیط HTF (F) دیده می شود.

سیکلوفسفامید دریافت می کردند افزایش یافته ولی فقط در گروه اسپیرولینا با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم، اختلاف معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین نتایج نشان داد که درصد لقاح در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم نسبت به گروه کنترل افزایش یافته ولی در گروه دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم لقاح نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که این کاهش معنی دار است ( $P < 0/05$ ). مقایسه درصد لقاح در گروه های دریافت کننده سیکلوفسفامید همراه با اسپیرولینا نسبت به گروه کنترل نشان داد که در هر سه گروه کاهش معنی داری وجود دارد ( $P < 0/05$ ). درصد لقاح در گروه های دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و



## بحث و نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان دادند که تجویز داروی سیکلوفسفامید اثرات منفی در نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی داشته به طوری که باعث کاهش معنی دار در تعداد اووسیت‌ها، درصد لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی، درصد بلاستوسیت‌ها و درصد جنین‌های هیچ شده و افزایش معنی دار در درصد جنین‌های متوقف شده، می‌شود. همچنین یافته‌ها نشان دادند، به کارگیری جلبک اسپیرولینا هنگام مصرف سیکلوفسفامید به عنوان داروی محافظ برای کاهش اثرات منفی سیکلوفسفامید وابسته به دوز بوده به طوری که با استفاده از داروی جلبک اسپیرولینا در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم همراه با داروی سیکلوفسفامید می‌تواند اثرات منفی سیکلوفسفامید را کاهش داده و درصد لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی، درصد بلاستوسیت و درصد جنین‌های هیچ شده را افزایش دهد ولی به کارگیری داروی جلبک اسپیرولینا با دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اثرات منفی در نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی را به دنبال داشت.

درمان‌های سرطان از قبیل شیمی‌درمانی اگرچه برای بقای بیمار ضروری هستند اما اغلب دارای اثرات جانبی زینباری بر بدن از جمله روی سیستم تولیدمثلی می‌باشند. ناباروری یکی از عواقب قابل توجه شیمی‌درمانی بر روی سیستم تولیدمثلی است به ویژه در بیماران جوانی که درمان خود را قبل از اینکه فرصت فرزند دار شدن داشته باشند، شروع کرده‌اند. در نتیجه از آنجاکه حفظ باروری یک بحث بسیار مهم برای نجات‌یافتگان سرطان است، ارائه روشی برای حفظ عملکرد تخمدان و باروری در آینده در بیمارانی که داروی شیمی‌درمانی دریافت می‌کنند یک امر ضروری است.

در بین داروهای شیمی که دارای اثرات سمی بر روی تخمدان می‌باشند، می‌توان به سیکلوفسفامید، بوسولفان و داکاربازین اشاره کرد. سیکلوفسفامید به واسطه آلکیلاسیون DNA باعث ایجاد پیوندهای عرضی و در نتیجه شکستگی آن شده، در نتیجه باعث مهار همانندسازی و اختلال در چرخه سلولی و آپوپتوز سلولی می‌گردد (۳۸).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که سیکلوفسفامید موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داخل سلولی می‌گردد و استرس اکسیداتیو ایجاد شده ناشی از آن، اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی را در پی خواهد داشت (۳۹). افزایش میزان آپوپتوز

سیکلوفسفامید در مقایسه با گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت می‌کردند افزایش یافته و این افزایش در دوز ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار است ولی در دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم کاهش نشان داد (جدول ۱) (نمودار ۱ و شکل ۱).

در این مطالعه مشخص شد که درصد جنین‌های هیچ شده در گروه سیکلوفسفامید کاهش یافته و اختلاف معنی داری ( $P < 0/05$ ) را با گروه کنترل نشان می‌دهد. درصد جنین‌های هیچ شده در گروه‌های دریافت کننده اسپیرولینا نسبت به گروه سیکلوفسفامید افزایش داشته و این افزایش در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار است ( $P < 0/05$ ). در گروه‌های دریافت کننده سیکلوفسفامید و اسپیرولینا در مقایسه با گروه کنترل درصد جنین‌های هیچ شده کاهش معنی داری ( $P < 0/05$ ) را نشان دادند. درصد جنین‌های هیچ شده در گروه‌های دریافت کننده اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم با سیکلوفسفامید در مقایسه با گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت می‌کردند افزایش نشان داده ولی این افزایش معنی دار نیست ولی در دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم کاهش نشان داد که این اختلاف معنی دار نبود.

درصد جنین‌های متوقف شده در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار ( $P < 0/05$ ) نشان داد. مقایسه درصد جنین‌های متوقف شده در گروه‌های مختلف اسپیرولینا کاهش را در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید نشان داد که این کاهش در گروه‌های اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار بود ( $P < 0/05$ ). همچنین مقایسه درصد جنین‌های متوقف شده در گروه‌های مختلف اسپیرولینا در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد ولی در هیچ یک از گروه‌ها اختلاف معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ). گروه‌های دریافت کننده اسپیرولینا به همراه سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل درصد جنین‌های متوقف شده افزایش یافته که در گروه‌های اسپیرولینا با دوز ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار است ( $P < 0/05$ ). همچنین مقایسه درصد جنین‌های متوقف شده در گروه‌های دریافت کننده اسپیرولینا و سیکلوفسفامید در مقایسه با گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت می‌کرد، در گروه‌های ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم افزایش نشان داد ولی اختلاف معنی دار نبود و در گروه ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم کاهش نشان داد (جدول ۱) (نمودار ۱).

گردیده است که عصاره اسپیرولینا سرطان حفره دهان ( buccal carcinoma) را در مدل‌های حیوانی و همچنین سرطان سلول‌های سنگفرشی حفره دهان ( buccal squamous cell carcinoma) را مهار می‌کند (۴۸). همچنین اثر محافظتی جلبک اسپیرولینا در برابر سمیت کلیوی ناشی از تزریق سیکلوفسفامید به علت خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی آن تأیید شده است (۴۹). درمان با اسپیرولینا آسیب سلولی اسپریماتوگونی ناشی از مصرف سیکلوفسفامید را کاهش می‌دهد که نشان‌دهنده اثر محافظتی اسپیرولینا در سلول‌های جنسی است (۵۰). به‌علاوه بررسی‌های Yener و همکاران نشان داد اسپیرولینا نقش مؤثری در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید در بافت تخمدان موش صحرایی دارد (۵۱).

اسپیرولینا سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به اثبات رسیده است. محققان با القای هایپرکلسترولمی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که افزایش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از هایپرکلسترولمی به‌طور قابل‌توجهی توسط اسپیرولینا مهار می‌شود. آن‌ها بیان کردند که اسپیرولینا قادر است فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون ردوکتاز را در کبد افزایش دهد و از این طریق آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۵۲). همچنین تحقیقات زیادی نشان دادند که اسپیرولینا دارای خواص محافظتی بر روی استرس اکسیداتیو حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی حاصل از سیکلوفسفامید است که همگی با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

در نتیجه‌گیری نهایی از این مطالعه می‌توان اظهار نمود که استفاده اسپیرولینا با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم همراه با سیکلوفسفامید از اثرات مخرب سیکلوفسفامید بر روی تخمدان می‌کاهد و نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی را بهبود می‌بخشد که این می‌تواند با خاصیت از بین بردن رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو توسط اسپیرولینا که یک آنتی‌اکسیدان است، قابل توجیه باشد.

از نتایج این مطالعه چنین برمی‌آید که به‌کارگیری جلبک اسپیرولینا همراه با سیکلوفسفامید می‌تواند اثرات جانبی منفی و تخریبی داروی سیکلوفسفامید را بر روی جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی کاهش دهد. با این حال نیاز است که در مطالعات آینده اثرات محافظتی این جلبک بر روی تخمدان در برابر سیکلوفسفامید به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گیرد.

در سلول‌های زایا را می‌توان به افزایش سطوح ROS متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید نسبت داد که این فرآیند با ایجاد اختلال در غشاءهای داخلی و خارجی میتوکندری‌ها موجب نشت پروتئین سیتوکروم c، فعال‌سازی کاسپازها و در نهایت ایجاد آپوپتوز می‌شود (۴۰). مطالعات نشان داده‌اند که تجمع زیاد ROS دریافت تخمدان باعث کاهش کمیت و کیفیت اووسیت می‌شود و همچنین این افزایش تأثیر منفی بر روی بلوغ اووسیت، لقاح و رشد جنین می‌گذارد. همچنین مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تعداد اووسیت‌های به‌دست‌آمده از لقاح آزمایشگاهی در دریافت‌کنندگان سیکلوفسفامید کاهش می‌یابد (۴۲-۴۱) که با نتایج مطالعه حاضر بر روی اثر سیکلوفسفامید بر روی تعداد اووسیت‌ها همخوانی دارد. گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که تزریق سیکلوفسفامید حتی در اووسیت‌هایی که ۶ هفته بعد از تزریق به دست آمدند، کاهش معنی‌داری در میزان لقاح و تشکیل جنین داشته است. همچنین مطالعات بر روی موش نشان داده‌اند که سیکلوفسفامید باعث کاهش میزان جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیت می‌شود (۴۳) که با نتایج این مطالعه بر روی اثر سیکلوفسفامید بر روی درصد لقاح، جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیت همخوانی دارد. تصور می‌شود تولید ROS در توقف رشد جنین و مرگ سلولی دخالت داشته باشد (۴۴). یافته‌های مطالعه ما نشان دادند سیکلوفسفامید باعث افزایش درصد جنین‌های متوقف‌شده می‌شود که می‌توان نتیجه گرفت سیکلوفسفامید با تولید ROS مانع رشد جنین‌ها می‌شود. از آنجاکه اثر سمی سیکلوفسفامید بر فعالیت تولیدمثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو مشخص شده است و با توجه به این‌که ROS باعث اختلال در عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود، بنابراین به‌منظور کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از به‌کارگیری سیکلوفسفامید می‌توان از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی که به‌طور بالقوه تخریب ناشی از ROS را کاهش می‌دهند، استفاده نمود. Das و همکاران نشان دادند که اسید اسکوربیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدان نقش محافظتی در برابر اثرات سمی سیکلوفسفامید بر تخمدان موش رت دارد (۴۵).

جلبک اسپیرولینا، در جوامع مختلف به علت محتوای مغذی و قابلیت هضم استفاده‌های گسترده غذایی دارد. ترکیب شیمیایی این جلبک نشان می‌دهد که حاوی اسید فنولیک، توکوفرول، ویتامین C، بتاکاروتن و فیکوسیانین است که همگی مبین ویژگی آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا می‌باشند (۴۶-۴۷). مشخص



بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است. از آن‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری تخصصی با شماره ۴۹۹-۸۵۳۰-۶ بوده که با مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه و کمک‌های اعضای محترم آزمایشگاه های

### References

- Santoro N. Mechanisms of premature ovarian failure. *AnnEndocrinol*.2003;64(2):87-92.
- Timmreck LS, Reindollar RH. Contemporary issues in primaryamenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am*.2003;30(2):287-302.
- Familiari G, Caggiati A, Nottola S, Ermini M, Di Benedetto MR, Motta P. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Hum Reprod*.1993;8(12):2080-7.
- Bedavi M A, Rizk B RMB. Fertility preservation advances and controversies. JAYPEE BROTHERS Medical Publishers. 1<sup>st</sup> ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (p) Ltd, 2004. 182p.
- Blumenfeld Z, Eckman A.Preservation of Fertility and Ovarian Function and Minimization of Chemotherapy-Induced Gonadotoxicity in Young Women by GnRH-a.J *Natl Cancer Inst*.2005 (34): 40-43.
- Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*. 2001;7(6): 535-543.
- Gucer F, Balkanli-Kaplan P, Doganay L, Yüce MA, Demiralay E, Sayin NC, et al. Effect of paclitaxel on primordial follicular reserve in mice. *Fertil Steril*. 2001;76(3): 628-629
- De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet*. 2010;376(9744):911-921.
- Anchan RM, Ginsburg ES. Fertility concerns and preservation in younger women with breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;74(3):175-192.
- Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, et al. Fertility of female survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2009;27(16):2677-2685.
- Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med* 2005;353(1):64-73.
- Kumar R, Biggart JD, McEvoy J, McGeown MG. Cyclophosphamide and reproductive function. *Lancet* 1972; 299(7762):1212-1214.
- Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FIR. Cyclophosphamideinduced ovarian failure. *N Engl J Med* 1973; 289(22):1159-1162.
- Wolverton S. Comprehensive dermatologic drug therapy. 3<sup>rd</sup> ed Saunders Company.2001. P. 180-96.
- Amsterdam A, Selvaraj N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocrinol Rev* 1997;18(3):435-61.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124(3): 43-101.
- Cannon JD, Cherian-Shaw M, LovekampSwan T, Chaffin CL. Granulosa cell expression of G1/S phase cyclins and cyclin-dependent kinases in PMSG-induced follicle growth. *Mol Cell Endocrinol*.2007;264(1-2): 6-15.
- Dirven H, Van Ommen B, Van Bladeren PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res* 1994;54(23):6215-20.
- Patrick J, Devine Sally, Perreault D, Luderer U. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biol Reprod*. 2012; 86(2): 27.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C: The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(10):1634-1650.
- Aten RF, Kolodecik TR, Behrman HR. Ovarian vitamin E accumulation: Evidence for a role of lipoproteins. *Endocrinology* 1994;135(2):533-9.
- Gülşen Gürgen S, Erdoğan D, Elmas Ç, Take Kaplanoğlu G, Öze Ç. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α-tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovariumr. *Nutrition*, 2013;29(5), 777-784.
- Belay A. The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J Am Nutraceut Assoc*.2002; 5(2)27-49.
- Yan-Jiao Li, Zhe Han, Lei Ge, Cheng-Jie Zhou, Yue-Fang Zhao, Dong-Hui Wang, et al. C-phycocyanin protects against low fertility by inhibiting reactive oxygen species in aging mice. *Oncotarget*. 2016;7(14): 17393-17409.
- Premkumar K, Pachiappan A, Abraham SK, Santhiya ST, Gopinath PM, Ramesh A. Effect of Spirulina fusiformis on cyclophosphamide and mitomycin-C induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Fitoterapia* 2001;72(8):906-911.
- Babadzhanov AS, Abdusamatova N, Yusupova FM, Faizullaeva N, Mezhlumyan LG, Malikova MK.



- Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* 2004; 40(3):276-279.
27. Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J Appl Phycol*.1993;5(2): 235-241.
28. Khan Z, Bhadoria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;6(5):373-379.
29. Stocker R, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activities of bile pigments. biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol*.1990;186(31):301-309.
30. Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair PP, Varghese C, Somanathan T, Amma BP, et al. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr Cancer*.1995; 24(2): 197-202.
31. Miranda MS, Cintra RG, Barros SB, Mancini Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res*.1998; 31(8):1075-1079.
32. Upasani CD, Khera A, Balaraman R. Effect of lead with vitamin E, C, or *Spirulina* on malondialdehyde, conjugated dienes and hydroperoxides in rats. *Indian J Exp Biol*.2001; 39(1): 70-74.
33. Hassan AM, Abdel-Aziem SH, Abdel-Wahhab MA. Modulation of DNA damage and alteration of gene expression during aflatoxicosis via dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira*) and Whey protein concentrate. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 79(1):294-300
34. Abdel-Daim MM, Abuzead SMM, Halawa SM. Protective Role of *Spirulina platensis* against Acute Deltamethrin-Induced Toxicity in Rats. *PLoS ONE* 2013; 8(9):e72991.
35. Kalich-Philosoph L, Roness L, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin SH, et al. Cyclophosphamide Triggers Follicle Activation and "Burnout"; AS101 Prevents Follicle Loss and Preserves Fertility. *Sci Trans Med*.2013;5(185): 185-163.
36. Ebadi Manas G, Hasanzadeh Sh, Najafi Gh, Parivar K, Yaghmaei, P. The effects of pyridaben pesticide on the DNA integrity of sperms and early in vitro embryonic development in mice. *Iran J Reprod Med*. 2013; 11(8), 605-610.
37. Jalali AS, Najafi G, Hosseinchi M, Sedighnia A. Royal jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanazolol-treated mice. *Iran J Reprod Med* 2015; 13(1): 15-22.
38. Crook TR, Souhami RL, McLean AE. Cytotoxicity, DNA cross linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer Res*. 1986; 46(10):5029-5034.
39. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. *Free Radic. Res*. 2002b; 36(11):1209-1218.
40. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*.1997; 138(5): 2081-2088.
41. Koike M, Kumasako Y, Otsu E, Arake Y, Utsunomiya T. The influence of the anti-cancer drug cyclophosphamide on fertilization and embryo growth in a mouse model. *Fertil Steril*. 2012; 98(3):117-118
42. Berekati Z, Gourabi H, Valojerdi MR, Yazdi PE. Previous maternal chemotherapy by cyclophosphamide (Cp) causes numerical chromosome abnormalities in preimplantation mouse embryos. *Reprod Toxicol*. 2008;26 (3-4):278-281.
43. Chun EK, Jee BC, Kim JU, Kim SH, Moon SY. Effect of Imatinib Coadministration on in Vitro Oocyte Acquisition and Subsequent Embryo Development in Cyclophosphamide-Treated Mice. *Reprod Sci*. 2014; 21(7): 906-914.
44. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev*.2000; 56(4): 520-526.
45. Das UN. Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monit* 2006;12(5):79-84.
46. Prahalthan C, Selvakumar E and Varalakshmi P, Lipoic acid modulates adriamycin induced testicular toxicity. *Reprod. Toxicol*.2006; 21(1): 54-59.
47. Mazo VK, Gmoshinskii IV, Zilova IS. Microalgae *Spirulina* in human nutrition. *Vopr Pitan*. 2004;73(1):45-53.
48. Romay C, González R, Ledón N, Ramirez D, Rimbau V. C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, AntiInflammatory and Neuroprotective Effects. *Curr. Protein Pept. Sci*. 2003; 4(3): 207-216.
49. Sinanoglu O, Yener AN, Ekici S, Midi A, Aksungar FB. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. *Urology*. 2012;80(6):1392.e1-6.
50. Chamorro-Cevallos G, Gardun o-Siciliano L, Barron BL, Madrigal-Bujaidar E, CruzVega DE and Pages N, Chemoprotective effect of spirulina (*Arthrospira*) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):567-74.
51. Yener NA, Sinanoglu O, Iiter E, Celik A, Sezgin G, Midi A, et al. Effects of *Spirulina* on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in rats: biochemical and histomorphometric evaluation of the ovary. *Biochem Res Int* 2013; 2013(1): 1-6.
52. Kim MY, Cheong SH, Lee JH, Kim MJ, Sok DE, Kim MR. *Spirulina* improves antioxidant status by reducing oxidative stress in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Med Food* 2010; 13(2):420-426.



## Original Article

## Protective Effects of Spirulina (*Arthrospira Platensis*) on In Vitro Fertilization (IVF) and Embryo Development in Female Mice Treated with Cyclophosphamide

Mousavi Tometri G<sup>1</sup>, Hasanzadeh SH<sup>1\*</sup>, Malekinejad H<sup>2</sup>, Najafi GH<sup>1</sup>

1. Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2. Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Received: 05 Sep 2017

Accepted: 02 Mar 2018

### Abstract

**Background & objective:** Cyclophosphamide is an extensively used chemotherapeutic agent against wide varieties of neoplastic ailments, which has been known to cause ovarian damages and infertility in mammals. The purpose of this study is to investigate the protective effects of Spirulina platensis on in vitro fertilization (IVF) and embryo development in adult mice exposed to Cyclophosphamide.

**Material & methods:** 40 adult female mice were divided into 8 groups each comprised 5 animals. The first group was considered as control. The groups 2, 3 and 4 were exposed to Spirulina at rates of 200, 400 and 800 mg/kg respectively through oral route, daily for 28 days. The 5<sup>th</sup> group receive cyclophosphamide (150 mg/kg, ip) in a single-dose. Groups 6, 7 and 8 received cyclophosphamide and Spirulina together with aforementioned doses. In vitro fertilization and embryo development were assessed in all groups at the end of experiment.

**Results:** The groups which received Spirulina at rates of 200, 400 mg/kg beside cyclophosphamide in comparison to group which received merely cyclophosphamide, the number of oocytes, percentages of fertilization, two-cell embryos, blastocysts and hatched embryos were reduced significantly ( $p < 0.05$ ). In fertilization, two-cell embryo, but at dose of 800 mg/kg was not able to reduce damages brought by cyclophosphamide.

**Conclusion:** According to the results of this study, spirulina encourages protective effects on cyclophosphamide induced reprotoxicity on In Vitro Fertilization approach.

**Keywords:** Spirulina, cyclophosphamide, in vitro fertilization, mouse

\*Corresponding Author: Shapour Hasanzadeh, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Email: s.hasanzadeh@urmia.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0003-4147-0534>