مطالعه هیستومورفومتریک تاثیر ال-کارنیتین بر آسیب بیضه ناشی از مصرف اتانول در رت

آقایی،م.[۱]، احمدپناهی،ج.[۲*]، محمدی،ح.[۳]، یوسفی،م.[۴]، نعیمی،س.[۵]

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۸

خلاصه

در این مطالعه اثر ال-کارنیتین بر کاهش آسیب ناشی از الکل در بیضه رت‌های بالغ بررسی شد. الکل منجر به آسیب اکسیداتیو می‌شود و ال-کارنیتین به عنوان یک آنتی اکسیدان از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند. در این مطالعه در ۲۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار توسط اتانول ۳۰٪ با دوز ۳ gr/kg آسیب ایجاد شده و جهت درمان آسیب از ال-کارنیتین با دوز ۱۰۰ mg/kg استفاده گردید. در پایان از رت‌ها خونگیری و غلظت تستوسترون اندازه‌گیری شد. بعد از آسان‌کشی رت‌ها، بیضه‌ها خارج، وزن‌کشی و در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ به مدت ۷۲ ساعت فیکس گردید. متعاقب عمل‌آوری با شیوه‌های استاندارد بافت‌شناسی و قالب‌گیری توسط پارافین، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی H&E مورد مطالعه هیستومورفومتری قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد که اتانول باعث کاهش معنی‌دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامترهای هیستومورفومتریک بیضه می‌شود. درحالیکه درمان با ال-کارنیتین منجر به افزایش معنی‌دار وزن بیضه، قطر لوله‌های منی‌ساز، ضخامت اپیتلیوم، غلظت تستوسترون سرم و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ال-کارنیتین خوراکی با دوز ۱۰۰ mg/kg می‌تواند تا حدودی از آسیب‌های ایجاد شده توسط اتانول جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: هیستومورفومتری، بیضه، اتانول، ال-کارنیتین.

---

۱. دانش آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان،ایران.
۲. گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳. گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۵-۴. گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
*نویسنده مسئول: j_panahi@semnan.ac.ir

مقدمه

در دنیای امروز، ناباروری از عوامل مهم ایجاد نگرانی در زوجین و یکی از مشکلات عدیده پزشکی می باشد. این مسئله ناامید کننده و ویرانگر بوده که در تکامل شخصیت مردانه یا زنانه وتضمین هویت آنان مؤثر است. درمان ناباروری در مردان به دلیل اینکه علت آن فقط در ۴۰٪ موارد قابل تشخیص است مشکل‌تر از زنان بوده و بویژه در کشورهای در حال توسعه، با توجه به هزینه بالای درمان امکان انجام آن کمتر است (Rosemond و همکاران، ۲۰۰۶؛ Bhasin و همکاران، ۱۹۹۴؛ Bayasgalan و همکاران، ۲۰۰۴). عواملی نظیر آلاینده های زیست محیطی، عادات مدرن زندگی اجتماعی مانند سیگار کشیدن، مصرف الکل و همچنین مصرف برخی داروها از جمله عوامل اپی ژنتیکی شناخته شده هستند که بصورت بالقوه باعث ایجاد ناباروری در مردان می شود (Sharpe و همکاران، ۱۹۹۳).

آثار مخرب مصرف الکل از دیرباز مورد توجه بوده است. اتانول به سرعت از طریق گوارش جذب و به سهولت از غشای بیولوژیک عبور می‌کند. بیش از ۹۰٪ الکل مصرف شده در کبد اکسید شده و مابقی آن از طریق ریه ها و ادرار دفع می‌گردد (Katzung و همکاران، ۲۰۱۲). در این راستا مطالعات نشان داده است که مصرف الکل در سیستم تولید مثلی ایجاد نارسایی کرده و موجب مرگ سلول‌های جنسی و کاهش تعداد اسپرم و مورفولوژی ناقص اسپرم، پاره شدن غشاء میتوکندری، و تغییرات ساختاری دستگاه گلژی در غدد ضمیمه جنسی و کاهش معنی‌دار سطح سرمی تستوسترون می‌شود (پارسایی و همکاران، ۱۳۹۳). مطالعاتی که بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ انجام گرفته است نشان می‌دهد که مصرف حاد و مزمن الکل منجر به سرکوب شدید تستوسترون به همراه کاهش سطح LH و FSH شد (Emanuele MA و Emanuele N، ۲۰۰۱).

قطر نامنظم لوله‌های منی‌ساز و تعداد بالای سلول‌های مرده در لومن لوله‌های منی‌ساز افراد الکلی موردتوجه قرار گرفته است. متراکم شدن کروماتین اسپرم پروسه پیچیده‌ای است که ارتباط مستقیمی با توانایی اسپرم در بارور کردن اووسیت دارد (Evenson و همکاران، ۱۹۹۹). مطالعات نشان می‌دهد که مصرف اتانول موجب اختلال در عملکرد RNA پیامبر و DNA گشته (Bielawski و همکاران، ۲۰۰۲) و باعث اختلال در تکثیر سلول‌های جنسی در موش های نر بالغ می‌شود (El-Sokkary، ۲۰۰۱)

همچنین مصرف حاد و مزمن الکل باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (Vernet و همکاران، ۲۰۰۱). الکل با پراکسیداسیون لیپیدها و تولید رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب اکسیداتیو می شود (El-Sokkary و همکاران، ۱۹۹۹). آسیب‌های دستگاه تولید مثل متعاقب مصرف الکل به طور گسترده ثابت شده و در بالغین منجر به آپوپتوز سلول‌های زایا و کاهش فعالیت ترشحی سلول‌های سرتولی در بیضه ها می‌شود (Onu و همکاران، ۲۰۱۴).

ال-کارنیتین که آنتی اکسیدانی طبیعی و فاکتوری ضروری در به کارگیری اسیدهای چرب دارای زنجیره بلند برای تولید انرژی است. این ماده فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی از جمله ویژگی‌های ضدالتهابی، ضد آپوپتوزی، حفاظت کننده قلب و حفاظت کننده معده را نشان داده است. به علاوه، با فراهم کردن انرژی برای اسپرماتوزوا، در متابولیسم اسپرم نقشی مهم ایفا می‌کند و در بلوغ، تحرک و فرایند اسپرماتوژنیک موثر است (Dokmeci و همکاران، ۲۰۰۷). اثرات ضد آپوپتوزی ال-کارنیتین نیز در بیضه‌هایی که در معرض پرتودهی قرار گرفته بودند گزارش شده است (Kanter و همکاران، ۲۰۱۰).

ال-کارنیتین یک آمین چهارتایی محلول در آب است که از ترکیب اسیدهای آمینه ضروری متیونین و لیزین در کبد، کلیه و مغز پستانداران سنتز می‌شود. ال-کارنیتینی که در بافت‌های انسان وجود دارد عمدتاً از منبع برون‌زا است، کارنیتین اگزوژن از منابع غذایی شامل گوشت قرمز، طیور، ماهی و محصولات لبنی تأمین می‌شود. (Lenzi و همکاران، ۲۰۰۴). مکانیسم عمل ال-کارنیتین شامل اثر بر روی اسیدهای چرب با زنجیره طولانی و تبدیل آنها به ذرات کوچکتر است. بدین وسیله ال-کارنیتین موجب انتقال این مواد به غشاء میتوکندری سلول شده و این ارگانل با سوزاندن چربی‌ها به عنوان منبع انرژی موجب تسریع در متابولیسم این مولکول‌ها می‌شود (Izgut و همکاران، ۲۰۰۳).

دستگاه تولید مثل جنس نر، بافت اپیدیدیم، سمینال پلاسما و اسپرماتوزوآ بالاترین غلظت ال-کارنیتین در بدن را دارا هستند (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۴). غلظت کارنیتین در اپیدیدیم انسان ۲۰۰۰ برابر غلظت آن در خون است (Sigman و همکاران، ۲۰۰۶). به نظر می‌رسد این غلظت‌های بالا تحت کنترل آندروژن است. تحقیقات نشان می‌دهد رابطه مثبتی بین ال-کارنیتین آزاد با تعداد و تحرک اسپرم متحرک وجود دارد (Stradaioli و همکاران، ۲۰۰۴). ال-کارنیتین با تأمین انرژی مورد نیاز اسپرم، تأثیر مثبت بر روند تحرک و بلوغ اسپرم، نقش اساسی در

متابولیسم اسپرم ایفا می‌کند (Kanter و همکاران، ۲۰۱۰). به علاوه در تنظیم متابولیسم و عملکرد سلول‌های سرتولی نیز نقش دارد و می‌تواند از طریق تحریک برداشت گلوکز توسط سلول‌های سرتولی بر روی بلوغ اسپرم بیضه تأثیر بگذارد (Zhou و همکاران، ۲۰۰۷). درون سلول‌های اسپرم، ال-کارنیتین، اسیدهای چرب متوسط و طویل را به درون میتوکندری منتقل می‌کند و این اسیدهای چرب در آنجا متحمل بتا اکسیداسیون می‌شوند که منجر به تولید انرژی متابولیک مورد نیاز برای سلول‌های اسپرم می‌شود (Alharthi و همکاران، ۲۰۱۹).

بسیاری از مردان نابارور، دچار اختلالات قابل اصلاح توسط درمان دارویی هستند. برخی درمان‌های خوراکی، باعث بهبود پارامترهای تعداد و تحرک اسپرم می‌شوند. تجویز ال-کارنیتین در بهبود پارامترهای اسپرم مؤثر شناخته شده است (Sinclair و همکاران، ۲۰۰۰). مشخص شده است که ال-کارنیتین می‌تواند باعث افزایش معنی‌داری در شاخص اسپرمیوژنز گردد (محمدی و همکاران، ۱۴۰۰). در سال‌های اخیر از ال-کارنیتین و مشتقات آن (استیل ال-کارنیتین، پروپیونیل ال-کارنیتین و ...) به منظور درمان ناباروری در مردان استفاده شده است. به علاوه چندین مطالعه به بررسی تأثیر ال-کارنیتین بر روی انسان (Lenzi و همکاران، ۲۰۰۴) و حیوان (Stradaioli و همکاران، ۲۰۰۴) پرداخته‌اند و کاهش سطح کارنیتین در مایع منی در مردان نابارور در بسیاری از مطالعات قبلی به اثبات رسیده است (Sigman و همکاران، ۲۰۰۶).

با توجه به شواهد ذکر شده و اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی ال-کارنیتین از یک سو و فقدان مطالعه تاثیر آن در بهبودی اثرات مخرب الکل از سوی دیگر، این پژوهش با تجویز اتانول به رت‌های بالغ و ایجاد آسیب در بیضه‌های آن‌ها، میزان این آسیب‌ها از نظر بافت‌شناسی و هیستومورفومتری مورد بررسی و همزمان با تجویز ال-کارنیتین، اثرات مهاری و درمانی این مکمل در بهبودی این ضایعات مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

این طرح در دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان و در فصل بهار انجام گرفت. برای انجام مطالعه از ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. رت‌ها در محیط با درجه حرارت ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۱۰±۵۰ درصد و سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده، غذا به صورت پلیت مخصوص و آب بدون محدودیت در اختیار آنها قرار گرفت.

جهت القاء آسیب اکسیداتیو از اتانول مطلق شرکت سیمین تاک با غلظت ۳۰٪ و به میزان ۳ gr/kg بصورت خوراکی و جهت پیشگیری و بهبود آسیب اکسیداتیو از ال-کارنیتین ۱۰۰۰ با دوز ۱۰۰ mg/kg به صورت خوراکی استفاده شد. تمام پروتکل‌ها منطبق با کمیته اخلاق در حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان انجام شد. رت‌ها پس از وزن کشی، به طور تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی به‌ترتیب زیر تقسیم شدند و به مدت دو هفته برای سازگاری، در محیط نگهداری شدند.

گروه۱: به عنوان کنترل منفی به مدت ۳۰ روز به میزان ۳ gr/kg نرمال سالین به صورت خوراکی داده شد.

گروه۲: به عنوان کنترل مثبت (اتانول) در نظر گرفته شد که برای ایجاد آسیب بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول به میزان ۳ gr/kg بصورت خوراکی، روزانه یک بار و به مدت ۳۰ روز استفاده می‌شود.

گروه۳: از ال-کارنیتین با دوز ۱۰۰ mg/kg به صورت خوراکی، روزانه یک بار و به مدت ۳۰ روز استفاده شد.

گروه۴: به عنوان گروه درمان به مدت ۳۰ روز همزمان از محلول ۳۰٪ اتانول روزانه به میزان 3 gr/kg و از ال-کارنیتین با دوز 100 m g/kg بصورت خوراکی استفاده گردید.

در پایان دوره، رت‌ها توسط کتامین- زایلازین بیهوش و به‌منظور سنجش تستوسترون از آنها خونگیری بعمل آمد. سپس بیضه‌ها خارج و با استفاده از ترازوی دقیق آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن‌گیری و حجم آنها محاسبه گردید. جهت محاسبه حجم بیضه از فرمول $V=(d^2\times\pi/4)L\times K$ استفاده شد که Vحجم بیضه، d قطر کوچک، L قطر بزرگ، π=۳/۱۴ و k=۰/۹ (ضریب ثابت) می‌باشد. قبل از برگشت از بیهوشی، رت‌ها به‌طریقه جابه‌جایی نخاع آسان‌کشی شدند و نمونه خون های اخذ شده به آزمایشگاه منتقل و با روش CLIA[1] غلظت تستوسترون سرم سنجیده شد. نمونه‌های بیضه نیز به بافر فرمالین ۱۰٪ منتقل و پس از ۷۲ ساعت در دستگاه آماده سازی بافت قرار گرفته و متعاقب قالب‌گیری توسط پارافین، از هر نمونه چند برش متوالی به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. مقاطع حاصل توسط هماتوکسیلین و ائوزین رنگ-آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

جهت اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم آن‌ها از میکروسکوپ نوری دوربین‌دار با بزرگنمایی X ۱۰۰ و نرم افزار AxioVision استفاده شد. از هر لام به طور

[1] Chemiluminescence Immunoassay

تصادفی ۱۰ شان انتخاب و لوله‌های گرد یا نسبتا گرد مورد بررسی و میانگین دو قطر عمود بر هم به عنوان قطر لوله‌های سمینیفروس براساس میکرومتر محاسبه گردید. جهت شمارش سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ نیز از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ استفاده شد و از هر لام ۱۰ لوله منی‌ساز گرد یا نسبتا گرد به طور تصادفی انتخاب و شمارش سلولی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS انجام و برای مقایسه نتایج از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way (ANOVA) و آزمون تقریبی Tukey استفاده گردید. اختلاف آماری ($p<۰/۰۵$) به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

وزن بیضه‌ها

میانگین وزن بیضه‌ها در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دارداشته و در مقایسه با گروه دریافت کننده ال-کارنیتین و گروه کنترل منفی کاهش معنی‌دار داشته است. میانگین وزن بیضه‌ها در گروه دریافت کننده ال-کارنیتین نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری نداشته اگرچه بیشتر بوده است. (جدول ۱).

حجم بیضه

با توجه به جدول ۱ تفاوت معنی‌داری بین هیچ‌کدام از گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت اگرچه میانگین حجم بیضه در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش داشت. (جدول ۱).

سنجش تستوسترون

میانگین غلظت تستوسترون در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار و در مقایسه با گروه دریافت کننده ال-کارنیتین کاهش معنی‌دار را نشان داده است و نسبت به گروه کنترل منفی تغییر معنی‌داری را نشان نداده است اگرچه کمتر بوده است. همچنین میانگین غلظت تستوسترون در گروه دریافت کننده ال-کارنیتین در مقایسه با گروه کنترل منفی اگرچه بیشتر بود اما این اختلاف معنی‌دار نبود. (جدول ۱).

قطر لوله‌های منی‌ساز

با توجه به جدول ۱ میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه کنترل مثبت در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه ال-کارنیتین و اتانول نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار و نسبت به گروه کنترل منفی و گروه دریافت کننده ال-کارنیتین کاهش معنی‌دار داشته است. همچنین میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز بین دو گروه کنترل منفی و گروه دریافت کننده ال-کارنیتین تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اگرچه در گروه کنترل منفی کم‌تر است. (جدول ۱)

قطر اپیتلیوم زایا

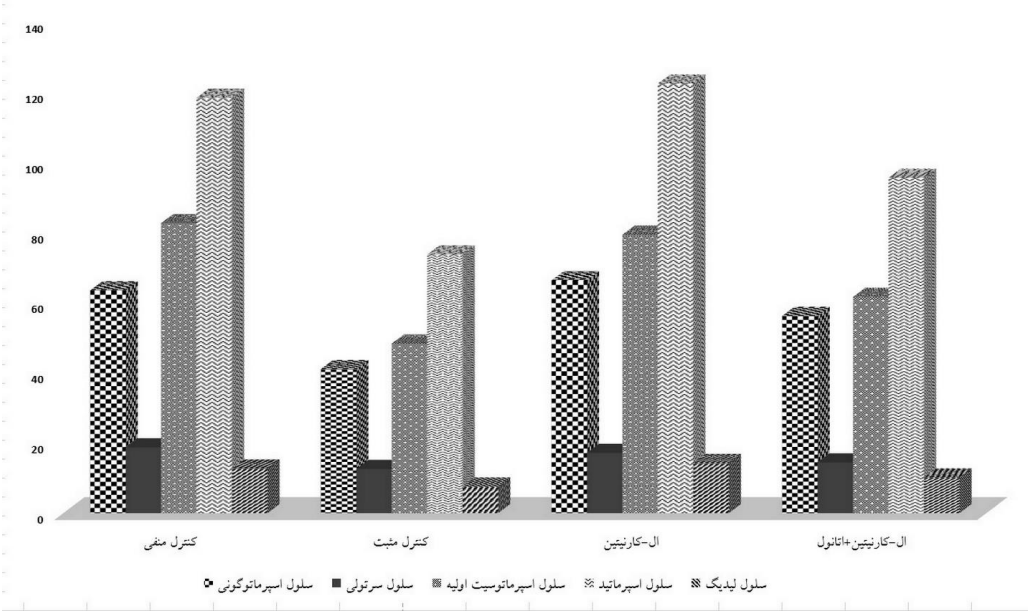
میانگین قطر اپیتلیوم زایا در گروه دریافت کننده ال-کارنیتین، در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار و در گروه کنترل مثبت، در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار دارد. میانگین قطر اپیتلیوم زایا در گروه کنترل منفی در مقایسه با گروه ال-کارنیتین و اتانول و گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار و در مقایسه با گروه دریافت کننده ال-کارنیتین کاهش معنی‌دار را نشان می‌دهد. بعلاوه میانگین قطر اپیتلیوم زایا در گروه ال-کارنیتین و اتانول نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار داشته است. (جدول ۱).

	وزن بیضه	حجم بیضه	غلظت تستوسترون	قطر لوله‌های منی‌ساز	قطر اپیتلیوم زایا
کنترل منفی	^{a}۲/۵۳۷ ± ۰/۱۱	^{a}۱/۰۱۲ ± ۰/۰۴	^{ac}۲/۳۷ ± ۰/۳۲	^{a}۳۰۹/۶ ± ۹/۹۶	^{a}۹۹/۵۲ ± ۶/۷۲
کنترل مثبت	^{b}۱/۷۸۸ ± ۰/۱۸	^{a}۰/۹۸۶ ± ۰/۰۳	^{b}۱/۵۴ ± ۰/۱۱	^{b}۲۶۵/۳۲ ± ۱۳/۰۴	^{b}۶۸/۴۳ ± ۳/۲۶
ال-کارنیتین	^{a}۲/۵۶۳ ± ۰/۰۴	^{a}۱/۰۳ ± ۰/۰۵	^{a}۲/۵۴ ± ۰/۱۲	^{a}۳۱۶/۳۳ ± ۹/۱۹	^{c}۱۰۴/۹۶ ± ۵/۰۷
ال-کارنیتین+اتانول	^{c}۲/۱۷۱ ± ۰/۲۴	^{a}۰/۹۹۲ ± ۰/۰۲	^{c}۲/۱۳ ± ۰/۰۷	^{c}۲۹۲/۲۱ ± ۶/۳۸	^{d}۸۷/۴۸ ± ۳/۶۶

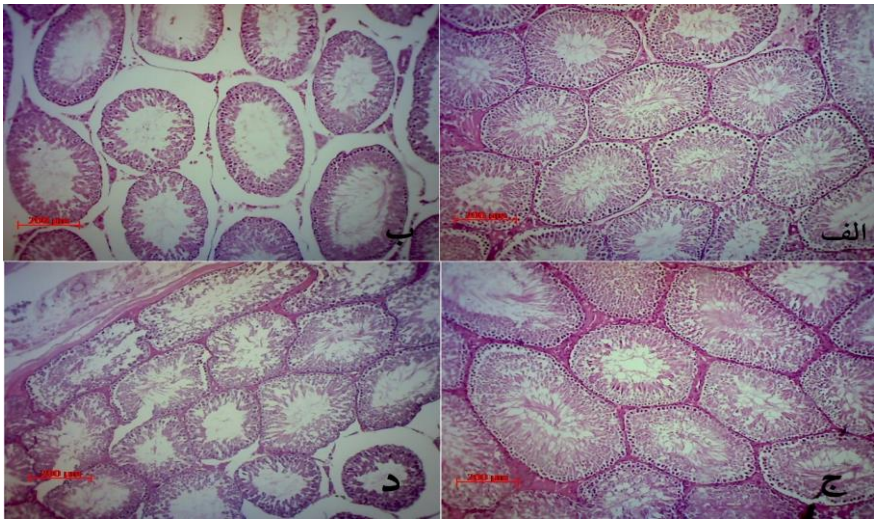
جدول ۱. میانگین ± SD وزن بیضه، حجم بیضه، غلظت تستوسترون، قطر لوله‌های منی‌ساز و قطر اپیتلیوم زایا.
حروف نامشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است.

سلول‌های اسپرماتوگونی

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل مثبت در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه دریافت کننده ال-کارنیتین کاهش معنی‌دار داشته است. همچنین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل منفی نسبت به گروه دریافت کننده ال-کارنیتین تغییر معنی‌داری نداشته، اگرچه کمتر بوده است. (نمودار ۱ و جدول ۲).



نمودار ۱: میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ.



تصویر ۱. فوتومیکروگراف بافت بیضه در گروه‌های مورد مطالعه

الف) گروه کنترل منفی که نشان‌دهنده ساختار طبیعی بافت بیضه است. **ب)** گروه کنترل مثبت که نشان‌دهنده افزایش فضای بینابینی، آتروفی اپیتلیوم زایگر و کاهش قطر مجاری منی‌ساز است. **ج)** گروه دریافت کننده ال-کارنیتین که شباهت زیادی با گروه کنترل منفی دارد. **د)** گروه ال-کارنیتین و اتانول که تا حدودی از آسیب ایجاد شده توسط اتانول جلوگیری کرده است و فضای بینابینی نسبت به گروه کنترل مثبت کمتر و قطر اپیتلیوم زایا افزایش یافته است.

سلول‌های سرتولی

با توجه به نمودار ۱ میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش داشته ولی این افزایش معنی‌دار نبود. همچنین میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه دریافت کننده ال-کارنیتین در مقایسه با گروه کنترل مثبت و گروه ال-کارنیتین و اتانول، افزایش معنی‌دار داشت ولی نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری را نشان نداشت اگرچه کمتر بود. (نمودار ۱ و جدول ۲).

سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه کنترل مثبت در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار داشت. این تعداد در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه دریافت کننده ال-کارنیتین کاهش معنی‌دار را نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده ال-کارنیتین نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری نداشت. (نمودار ۱ و جدول ۲).

سلول‌های اسپرماتید

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید درگروه کنترل مثبت در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار داشت. تعداد این سلول‌ها در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌دار و نسبت به گروه کنترل منفی و گروه دریافت کننده ال-کارنیتین کاهش معنی‌دار داشت. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه دریافت کننده ال-کارنیتین در مقایسه با گروه کنترل منفی اگرچه بیشتر بود ولی این افزایش معنی‌دار نبود. (نمودار ۱ و جدول ۲).

سلول‌های لیدیگ

با توجه به نمودار ۱ میانگین تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه کنترل مثبت در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار داشته است. میانگین تعداد این سلول‌ها در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه دریافت کننده ال-کارنیتین و گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌داری را نشان داد. این تعداد در گروه کنترل منفی در مقایسه با گروه دریافت کننده ال-کارنیتین، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد اگرچه کمتر بود. همچنین میانگین تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه ال-کارنیتین و اتانول در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی‌داری را نشان داد. (نمودار ۱ و جدول ۲).

	سلول اسپرماتوگونی	سلول سرتولی	سلول اسپرماتوسیت اولیه	سلول اسپرماتید	سلول لیدیگ
کنترل منفی	^{a}۶۳/۴۲ ± ۴/۵۷	^{a}۱۸/۷۱ ± ۱/۳۸	^{a}۸۲/۵۷ ± ۲/۸۷	^{a}۱۱۸/۲۹ ± ۶/۹۸	^{a}۱۲/۷۱ ± ۱/۶۰
کنترل مثبت	^{b}۴۱/۰۰ ± ۳/۲۶	^{b}۱۲/۵۷ ± ۲/۱۴	^{b}۴۸/۲۸ ± ۱/۹۷	^{b}۷۳/۶۴ ± ۴/۵۹	^{b}۷/۵۷ ± ۱/۵۱
ال-کارنیتین	^{a}۶۶/۲۸ ± ۳/۰۳	^{a}۱۷/۱۴ ± ۱/۲۱	^{a}۷۹/۲۸ ± ۲/۶۹	^{a}۱۲۲/۲۹ ± ۲/۷۵	^{a}۱۴/۲۸ ± ۲/۱۳
ال-کارنیتین+اتانول	^{c}۵۶/۱۴ ± ۲/۷۹	^{b}۱۴/۴۲ ± ۰/۷۸	^{c}۶۱/۵۷ ± ۱/۶۱	^{c}۹۵/۴۷ ± ۴/۴۴	^{c}۱۰/۱۴ ± ۱/۳۴

جدول ۲. میانگین ± SD تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ.
حروف نامشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ است.

بحث

در مطالعه حاضر میانگین وزن بیضه و میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه اتانول در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری را نشان داد درحالیکه از نظر میانگین حجم بیضه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعات کومار در سال ۲۰۱۷ نیز تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg باعث کاهش قابل توجه وزن بیضه‌ها و غلظت تستوسترون شد اما در حجم آن تغییری مشاهده نگردید (Kumar ، ۲۰۱۷). پارسایی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۳ نشان دادند که تجویز اتانول منجر به کاهش معنی‌دار وزن بیضه‌ها می شود (پارسایی و همکاران، ۱۳۹۳). در پژوهش دیگری تاثیر اتانول ۶٪ خوراکی به مدت ۵ هفته بر رت‌های نژاد ویستار بررسی شد و تفاوت معنی‌داری در خصوص وزن بیضه گروه اتانول در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد که علت تفاوت با مطالعه حاضر می تواند در میزان مصرف اتانول باشد (Salonen و Huhtaniemi، ۱۹۹۰). احمدی و شجاع زاده نیز در سال ۱۳۹۴ نشان دادند که تجویز اتانول منجر به کاهش معنی‌دار غلظت تستوسترون می شود (احمدی و شجاع زاده، ۱۳۹۴). به نظر می‌رسد ال-کارنیتین افزایش سطح مالون دی آلدئید و کاهش سطح سوپر اکسید دیسموتاز را سرکوب می‌کند و باعث جلوگیری از کاهش وزن بیضه و آسیب بافتی در بیضه می‌شود (Yuncu و همکاران، ۲۰۱۵).

در مطالعه حاضر تجویز اتانول منجر به کاهش معنی‌دار قطر مجاری منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایگر و همچنین تعداد سلولهای سرتولی و لیدیگ نسبت به گروه کنترل منفی شد. همراستا با این نتایج، Kumar در سال ۲۰۱۷ نیز دریافت که تجویز اتانول منجر به کاهش چشمگیر قطر مجاری منی‌ساز و ارتفاع اپیتلیوم و همچنین ایجاد فضاهای خالی در بافت بینابینی شده و همچنین کاهش قابل توجه قطر هسته سلولهای سرتولی و لیدیگ را در پی دارد (Kumar، ۲۰۱۷). Akang و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که اتانول منجر به کاهش قابل توجه قطر مجاری منی‌ساز می شود (Akang و همکاران، ۲۰۱۵). مطالعه احمدی و شجاع زاده در سال ۱۳۹۴ بیانگر کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های سرتولی و لیدیگ در پی تجویز اتانول می باشد. سلول‌های لیدیگ دچار هیپرتروفی شده و سیتوپلاسم آن‌ها حالت واکوئله به خود می گیرند. بنظر می رسد دژنره و واکوئله شدن سلول‌های لیدیگ به دنبال تجویز الکل منجر به کاهش سطح سرمی تستوسترون و متعاقبا باعث دژنره شدن سلول‌های سرتولی و در نتیجه عدم یکپارچگی اپیتلیوم زایگر می‌شود (احمدی و شجاع زاده، ۱۳۹۴).

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در گروه دریافت کننده اتانول است که این امر احتمالا ناشی از کاهش تستوسترون می‌باشد. مطابق با یافته های این پژوهش، El-Sokkary در سال ۲۰۰۱ و پارسایی و همکاران در سال ۱۳۹۳ نشان دادند که اتانول باعث کاهش قابل توجه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید شده و مهار معنی‌داری را در فعالیت تکثیری اسپرماتوگونی‌های لوله‌های منی‌ساز به همراه دارد(El-Sokkary، ۲۰۰۱ و پارسایی و همکاران، ۱۳۹۳).

تاکنون مکانیسم‌های مختلفی که طی آن الکل موجب اختلالات جنسی و تخریب بافتی شود مطرح شده است. در این میان نظریه استرس اکسیداتیو پذیرفته شده ترین مکانیسم تخریب ناشی از مصرف الکل است. بر این اساس، اکسیدان‌های ناشی از متابولیسم الکل و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد منجر به ایجاد اکسیداسیون بافتی می‌شود. (Emanuele MA و Emanuele N، ۲۰۰۱). ال-کارنیتین یک ماده محلول در آب و از لحاظ ساختاری شبیه به ویتامین‌ها است. این مکمل اسیدهای چرب با زنجیره بلند را از سیتوزول به میتوکندری انتقال می‌دهد و بتااکسیداسیون آنها را در میتوکندری تسهیل می‌نماید که این امر برای تولید انرژی لازم است. ال-کارنیتین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مورد توجه قرار گرفته و از سلول، غشای میتوکندری و DNA در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن محافظت می‌کند (Rezaei و همکاران، ۲۰۱۸). مطالعات متعددی به منظور ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی کارنیتین انجام شده است که نشان دهنده بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین کاهش استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف است. در مطالعاتی نشان داده شده است که استفاده از ال-کارنیتین به دنبال رادیوتراپی، میزان مالون دی آلدهید (MDA) را به طور قابل توجهی کاهش داده و باعث افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز می‌شود (Kanter و همکاران، ۲۰۱۰؛ Virmani و Diedenhofen، ۲۰۱۵).

در مطالعه حاضر، تجویز ال-کارنیتین منجر به افزایش معنی‌دار وزن بیضه در گروه پیشگیری در مقایسه با گروه کنترل مثبت شد و اختلاف معنی‌داری بین ۲ گروه کنترل منفی و ال-کارنیتین مشاهده نشد. همسو با این پژوهش، کیانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ به منظور بررسی اثرات محافظتی ال-کارنیتین بر بیضه نشان دادند که ال-کارنیتین توانسته کاهش وزن بیضه ناشی از سیپروفلوکساسین را جبران کند (کیانی و همکاران، ۱۳۹۶). Khushboo و همکاران در سال ۲۰۱۷ با انجام پژوهشی بر روی رت‌های نر بالغ مشاهده کردند که میانگین وزن بیضه در گروه درمان با ال-کارنیتین نسبت به گروهی که در آنها آسیب با مس ایجاد شده بود، بصورت معنی داری افزایش یافت. همچنین بین میانگین وزن بیضه در گروهی که فقط ال-کارنیتین دریافت کرده بود و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (Khushboo و همکاران، ۲۰۱۷).

سازگار و همکاران در سال ۱۳۹۳ در مطالعه‌ای به منظور بررسی مورفومتریک بافت بیضه به دنبال تجویز ال-کارنیتین در موش‌های صحرایی دیابتیک، ال-کارنیتین با دوز mg/kg ۴۰ به مدت ۱۶ روز تجویز شد و اختلاف معنی‌داری در وزن بیضه بین گروه درمانی و گروه دیابتی شده مشاهده نشد (سازگار و همکاران، ۱۳۹۳) دلیل این مغایرت احتمالاً دوز پایین‌تر و مدت دوره کوتاه‌تر درمان در مطالعه مذکور است. مطابق با مطالعه اخیر، Dehghani و همکاران در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی اثر محافظتی ال-کارنیتین بر بیضه رت‌های نر بالغ که با بوسولفان نابارور شده بودند مشاهده کردند که میانگین حجم بیضه در گروه درمان با ال-کارنیتین در مقایسه با گروه بوسولفان افزایش داشته ولی معنی‌دار نبوده (Dehghani و همکاران، ۲۰۱۳).

در مطالعه حاضر تجویز ال-کارنیتین در گروه درمان منجر به افزایش معنی‌دار میانگین غلظت تستوسترون نسبت به گروه اتانول شد. در مطالعات انجام شده به منظور بررسی اثر ال-کارنیتین بر سطح هورمون تستوسترون نیز مشاهده شده است که تجویز ال-کارنیتین با افزایش معنی‌دار تستوسترون سرم همراه است (میوه‌چی و انیسیان، ۱۳۹۸و El-Damarawi و Salama، ۲۰۱۴).

در مطالعه حاضر تجویز ال-کارنیتین منجر به افزایش میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم آنها درگروه درمان در مقایسه با گروه اتانول شد. Khushboo و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ در خصوص تاثیر ال-کارنیتین بر روی آسیب ایجاد شده با مس، و Dokmeci و همکاران در سال ۲۰۰۷ به منظور بررسی اثر ال-کارنیتین بر آسیب ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن در بیضه نشان دادند که میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه درمان شده با ال-کارنیتین نسبت به گروه آسیب دیده افزایش معنی‌دار داشته است. همچنین در مطالعاتی که به منظور بررسی نقش ال-کارنیتین در جلوگیری از آسیب لوله‌های سمینیفروس ناشی از اشعه گاما و به منظور بررسی اثر محافظتی ال-کارنیتین بر بافت بیضه موش‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین صورت گرفت مشخص شد که ال-کارنیتین منجر به افزایش معنی‌دار ضخامت اپیتلیوم می شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (Topcu-Tarladacalisir و همکاران، ۲۰۰۹ و کیانی و همکاران، ۱۳۹۶).

از طرفی در مطالعه‌ای که به منظور بررسی مورفومتریک بافت بیضه به دنبال تجویز ال-کارنیتین در موش‌های صحرایی دیابتیک، ال-کارنیتین با دوز mg/kg ۴۰ به صورت داخل صفاقی و به مدت ۱۶ روز به رت‌های نژاد ویستار تجویز شد، تغییر معنی‌داری در میانگین ضخامت اپیتلیوم گروه درمانی با گروه دیابتی مشاهده نگردید (سازگار و همکاران، ۱۳۹۳) که مغایر با نتایج به دست آمده در این مطالعه است و احتمالا علت این مغایرت کوتاه‌تر بودن دوره مطالعه و کمتر بودن دوز ال-کارنیتین در مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد.

در مطالعه حاضر تجویز ال-کارنیتین اگرچه تغییر معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه درمان نسبت به گروه اتانول ایجاد نکرد ولی منجر به تفزایش معنی دار در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ در گروه درمان گردید. Khushboo و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که ال-کارنیتین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی را بطور معنی داری افزایش می دهد (Khushboo و همکاران، ۲۰۱۷). النویحی در سال ۱۳۹۶ در مطالعات خود مشاهده کرد که ال-کارنیتین در درمان آسیب ناشی از سیکلوفسفامید منجر به افزایش معنی دار در میانگین تعداد سلوهای سرتولی و اسپرماتوسیت اولیه می شود (النویحی، ۱۳۹۶).

کریم نژاد در سال ۱۳۹۶ در تاثیر ال-کارنیتین بر ناباروری ایجاد شده با بوسولفان نشان داد که ال-کارنیتین میانگین

تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه را در گروه تحت درمان بطور معنی‌داری افزایش می دهد (کریم نژاد، ۱۳۹۶). کیانی و همکاران نیز در سال ۱۳۹۶ به منظور بررسی اثرات محافظتی این مکمل بر بیضه موش‌های تیمار شده با سیپروفلوکساسین مشاهده کردند که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه درمان با ال-کارنیتین افزایش معنی‌دار را نشان داده است (کیانی و همکاران، ۱۳۹۶). Cabral و همکاران در سال ۲۰۱۴ به منظور بررسی اثر محافظتی کارنیتین بر آسیب بیضه ناشی از Doxorubicin، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول اسپرماتید را در گروه درمان با ال-کارنیتین مشاهده کردند. همچنین در مطالعه‌ای که با هدف بررسی اثر ال-کارنیتین بر تعداد سلول‌های لیدیگ رت‌های مبتلا به واریکوسل تجربی صورت گرفت، مشخص گردید که میانگین تعداد سلوهای لیدیگ در گروه درمان با ال-کارنیتین افزایش معنی‌داری داشته است (Al-Rubiey، ۲۰۱۲).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اتانول منجر به کاهش معنی‌دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامترهای هیستومورفومتریک بیضه می‌شود و پیشگیری با دوز خوراکی ال-کارنیتین تا حدودی از کاهش وزن بیضه، کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم و کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ جلوگیری می‌نماید. بنابراین می‌توان از ال-کارنیتین به عنوان یک مکمل دارویی جهت کاهش اثرات مخرب اتانول استفاده نمود.

Journal of Veterinary Laboratory Research 13 (2021-22) 137-149

Histomorphometric evaluation of the effect of L-Carnitine on testicular injuries caused by ethanol in rats

Aghaii,M.[1], Ahmadpanahi,J.[2*], Mohammadi,H.[3] Yousefi,M.[4] and Naeimi,S.[5].

Received: 30.03.2021 Accepted: 30.09.2021

Abstract

In this study, the effect of L-Carnitine was investigated on reducing the alcohol damage in the testes of adult rats. Alcohol leads to oxidative damage and L-Carnitine protects from oxidative damage as an antioxidant. In this study, in 20 adult male Wistar rats damage were induced by 30% ethanol with a dose of three gr/kg. To prevent injury, L-Carnitine with a dose of 100mg/kg was used. Finally, blood samples were taken from the rats and testosterone concentration was measured. After the rats euthanizing, the testes were removed, weighed and fixed in 10% formalin buffer solution for 72 hours. After processing with standard histological methods and paraffin molding, 5 microns sections were prepared and studied histomorphometrically after H&E staining. Findings of this study revealed that Ethanol significantly reduced testicular weight, serum testosterone concentration, and testicular histomorphometric parameters. Treatment of L-Carnitine resulted in a significant increase in testicular weight, seminiferous tubule diameter, epithelial thickness, serum testosterone concentration and number of Spermatogonia, Primary Spermatocytes, Spermatids and Leydig cell compared to the positive group. Therefore, it can be concluded that oral L-Carnitine at a dose of 100 mg/kg can partially prevent the damage caused by ethanol.

Key words: Histomorphometry, Testis, Ethanol, L-Carnitine.

1- Graduated from veterinary doctorate, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University,Semnan, Iran.
2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
4-5 Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.
* Corresponding author: j_panahi@semnan.ac.ir

منابع

احمدی، ع.، شجاع زاده، ش. (۱۳۹۴). بررسی اثر الکلیسم تجربی بر ساختار بیضه و تأثیر آن بر کیفیت منی در مدل موش سوری بالغ. مجله مطالعات علوم پزشکی، **۲۶(۲)**، ۱۱۲-۱۲۰.

النویحی، ن. (۱۳۹۵). اثر ال-کارنیتین بر تکوین بیضه‌ی زاده‌های موش‌های باردار تحت تیمار با سیکلوفسفامید. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه رازی، کرمانشاه.

پارسایی، ا.، اسفندیاری، آ.، دهقان، ا. (۱۳۹۳). بررسی اثرات خارخاسک بر تغییرات هیستومورفومتریک بیضه در اثر مصرف اتانول در موش‌های صحرایی نر. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، **۱۳(۹)**، ۷۷۴-۷۶۶.

سازگار، ق.، ابراهیمی، و.، سعیدی بروجنی، م.ج.، محمدی، ش.، سلیم نژاد، ر. (۱۳۹۳). بررسی مورفومتریک بافت بیضه به دنبال تجویز ال-کارنیتین در موش صحرایی دیابتیک مدل استرپتوزوتوسین. مجله دیابت و متابولیسم ایران، **۱۴(۱)**، ۹-۱۴.

کریم نژاد، ا. (۱۳۹۶). بررسی اثرات هیستوپاتولوژی تاثیر تجویز همزمان ملاتونین و ال کارنیتین در موش صحرایی نابارور. پایان‌نامه، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین.

کیانی، م.، قارزی، ا.، پرتو، پ. (۱۳۹۶). اثر محافظتی ال-کارنیتین بر هیستوپاتولوژی بیضه موش‌های زیر تیمار با سیپروفلوکساسین. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران، **۲۶(۱۰۲)**، ۱-۱۰.

محمدی، و.، شریفی، س.د.، شرفی، م.، محمدی-سنگ چشمه، ع. (۱۴۰۰). تأثیر مکمل ال-کارنیتین در جیره‌ی جوجه خروس‌های نابالغ بر بافت‌شناسی بیضه،شاخص‌های اسپرماتوژنز و لیپوپروتئین‌های پلاسما در پیک تولید. مجله تحقیقات دامپزشکی، **۷۶(۱)**، ۹۴-۱۰۲.

میوه‌چی، م.، انیسیان، ع. (۱۳۹۸). اثر L – کارنیتین بر سطح هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH در موش‌های صحرایی نر بالغ. فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران، **۱۴(۲)**، ۱-۸.

Akang, E. N., Oremosu, A. A., Osinubi, A. A., Dosumu, O. O., Kusemiju, T. O., Adelakun, S. A., & Umaru, M. L. (2015). Histomorphometric studies of the effects of Telfairia occidentalis on alcohol-induced gonado-toxicity in male rats. Toxicology reports, **2**, 968- 975.

Alharthi WA, Hamza RZ, Elmahdi MM, Abuelzahab HSH, Saleh H. (2019). Selenium and L-Carnitine Ameliorate Reproductive Toxicity Induced by Cadmium in Male Mice. Biological trace element research, **197(2)**, 619-627.

Al-Rubiey, F. K. (2012). Effect of L-carnitine and meloxicam treatment on testicular leydig cell numbers of varicocelized rats. Middle East Fertility Society Journal, **17(1)**, 47–53.

Agarwal, A., Said, T.M. (2004). Carnitine and male infertility. Reprod. Biomed. Online, **4**:376-384.

Bayasgalan, G., Naranbat, D., Radnaabazar, J., Lhagvasuren, T., Rowe, P.J. (2004). **Male infertility**: risk factors in Mongolian men. Asian. J. Androl, **4**, 305-311.

Bhasin, S., Kretser, D.M., Baker, H.W. (1994). Pathophysiology and natural history of **male infertility**. J. Clin. Endocrinol Metab, **79(6)**, 1525-1529.

Bielawski, D. M., Zaher, F. M., Svinarich, D. M., & Abel, E. L. (2002). Paternal alcohol exposure affects sperm cytosine methyltransferase messenger RNA levels. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, **26(3)**, 347-351.
Cabral, R. E. L., Okada, F. K., Stumpp, T., Vendramini, V., & Miraglia, S. M. (2014). Carnitine partially protects the rat testis against the late damage produced by doxorubicin administered during pre-puberty. Andrology, **2(6)**, 931-942.

Dehghani F, Hassanpour A, Poost-Pasand A, Noorafshan A, Karbalay-Doust S. (2013). Protective effects of L-carnitine and homogenized testis tissue on the testis and sperm parameters of busulfaninduced infertile male rats. Iranian Journal of Reproductive medicine, **11(9)**, 693-704.
Dokmeci D, Inan M, Basaran UN, Yalcin O, Aydogdu N, Turan FN, Uz YH. (2007). Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia–reperfusion injury in rats. Cell biochemistry and function, **25(6)**, 611-8.
El-Damarawi, M. A., & Salama, M. E. (2014). Obestatin and L-carnitine as a defensive strategy against fertility disorders induced by obesity in male rats. Tanta Medical Journal, **42(3)**, 103.

El-Sokkary, G. H., Reiter, R. J., Tan, D. X., Kim, S. J., & Cabrera, J. (1999). Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. Alcohol and Alcoholism, **34(6)**, 842-850.
El-Sokkary, G. H. (2001). Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. Neuroendocrinology Letters, **22(2)**, 93-100.
Emanuele, M. A., & Emanuele, N. (2001). Alcohol and the male reproductive system. Alcohol Research & Health, **25(4)**, 282.
Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., ... & Claussen, O. P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Human reproduction, **14(4)**, 1039-1049.
Izgut-Uysal, V.N., Agac, A., and Derin, N. (2003). Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. Gerontology, **49(5)**, 287-292.
Kanter M, Topcu-Tarladacalisir Y, Parlar S. (2010). Antiapoptotic effect of l-carnitine on testicular irradiation in rats. Journal of molecular histology, **41(2-3)**, 121-8.
Katzung, B. G., Masters S. B., Trevor, A. J. (2012). Basic & Clinical Pharmacology (12^{th} ed.). New York: McGraw-Hill.
Khushboo M, Murthy MK, Devi MS, Sanjeev S, Ibrahim KS, Kumar NS, Roy VK, Gurusubramanian G. (2017). Testicular toxicity and sperm quality following copper exposure in Wistar albino rats: ameliorative potentials of L- carnitine. Environmental science and pollution research, **25(2)**, 1837-1862.
Kumar, B. S. (2017). Fertility effect of cycas circinalis and ionidium suffruticosum in alcohol induced sterility of male wistar rats-A histomorphometric study. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, **8(2)**, 825.
Lenzi, A., Sgro, P., Salacone, P., Paoli, D., Gilio, B., Lombardo, F. (2004). A placebo-cotrolled double blind randomized trial of the use combind L- carnitine and L- acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia, Fertility and Sterility, **81(6)**, 1578-1584.

Onu, J. E., Oke, B. O., Ozegbe, P. C., & Oyewale, J. O. (2014). Morphological alteration of seminiferous tubules of testes of Wistar rat offspring exposed to alcohol during pregnancy and/or lactation. International Journal of Biological and Chemical Sciences, **8(1)**, 1-7.

Rezaei, N., Mardanshahi, T., Shafaroudi, M. M., Abedian, S., Mohammadi, H., & Zare, Z. (2018). Effects of L-carnitine on the follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, and testicular tissue oxidative stress levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of evidence-based Integrative Medicine, 23, 2515690X18796053.

Rosemond, A. , Lanotte, P. , Watt, S., Sauget, A.S. , Guerif , F. , Royere, D. (2006). Systematic Screening Tests For Chlamydia Trachomatis , Mycoplasma Hominis and Ureaplasma Urealyticum In Urogenital Specimens Of Infertile Couples. Pathology-Biology, **54(3)**,125-9.

Salonen, I., & Huhtaniemi, I. (1990). Effects of chronic ethanol diet on pituitary-testicular function of the rat. Biology of reproduction, 42(1), 55-62.

Sharpe, R.M. and Skakkebaek, N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?. Lancet, **341(8857)**, 1392–1395.

Sigman, M., Glass, S., Campagnone, J., pryor, J.L. (2006). Carnitine for the treatment of idiopathic Asthenopermia: a randomized, double blind, placebo- controlled trial. Fertility and Sterility, **85(5)** 1409-14.

Sinclair, S. (2000). Male infertility: nutritional and environmental considerations. Alternative Medicine Review: A journal of clinical therapeutic, **5(1)**, 28-38.

Stradaioli, G., Sylla, L., Zelli, R., Chiodi, P., Monaci, M. (2004). Effect of L- carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. Theriogenology. **62(3-4)**, 761-777.

Topcu-Tarladacalisir, Y., Kanter, M., Uzal, M.C. (2009). Role of L-carnitine in the prevention of seminiferous tubules damage induced by gamma radiation: a light and electron microscopic study. Archives of Toxicology, **83(8)**, 735-746.

Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., & Aitken, R. J. (2001). Analysis of a plasma membrane redox system in rat epididymal spermatozoa. Biology of Reproduction, **65(4)**, 1102-13.

Virmani, A., & Diedenhofen, A. (2015). The possible mechanisms involved in the protection strategies against radiation-induced cellular damage by carnitines. International Journal of Clinical Medicine, **6(02)**, 71.

Yüncü, M., Bükücü, N., Bayat, N., Sencar, L., & Tarakçioğlu, M. (2015). The effect of vitamin E and L-carnitine against methotrexate-induced injury in rat testis. Turkish journal of medical sciences, **45(3)**, 517-525.

Zhou, X., Liu, F., Zhai, S. (2007). Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility, Asia Pacific journal of clinical nutrition, **1**, 383-390.