



İyonize Radyasyona Maruz Kalmış Sıçan Ovaryumunda Gelişmekte Olan Foliküllerde Morfolojik Değişiklikler Üzerine L-karnitinin Koruyucu Etkisi

Protective Effect of L-carnitine on Morphological Alterations and Occurrence in Developing Follicles Exposed Ionising Radiation in Rat Ovary

Kanat Güllü¹, Meryem Akpolat¹, Zehra Safi Öz², Bekir Hakan Bakkal³, Mehmet Araslı⁴, Fürüzan Köktürk⁵

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye.

²Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye.

³Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye.

⁴Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye.

⁵Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye.

Özet

Amaç: Radyasyon hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında bir takım değişikliklere sebebiyet verebilir, memeli germ hücreleri de iyonize radyasyona (İR) karşı oldukça duyarlıdır. İyonize radyasyon ovaryum folliküllerindeki dejenerasyonu arttırır. Bu çalışmanın amacı tüm vücudu iyonize radyasyona maruz kalan sıçanların ovaryum folliküllerinde L-karnitin (LK) antiapoptotik ve radyoprotektif etkilerini araştırmaktır.

Materyal-Method: Çalışmamızda 30 adet Wistar albino dişi sıçan 5 ayrı gruba ayrıldı. Radyasyon hasarı için kontrol hariç tüm sıçanlara 8,3 Gy X ışını uygulandı. LK gruplarına ışınlanmadan önce günlük 200mg/kg LK uygulandı. Işınlama sonrası 6.saatte (Rad-1) ve 4. günde (Rad-2) ovaryum dokuları toplandı. Ovaryum dokusundan her 5. kesit alınarak hematoksilen-eozin boyaması yapılarak oosit çekirdeğinin görüldüğü her oosit sayıldı. Folliküller primordiyal, primer, preantral ve antral olacak şekilde sınıflandırıldı. Serumdaki IL-1 α (interlökin-1 alfa), IL-4 (interlökin-4) ve GM-CSF (granülosit monosit koloni stimülan faktör) değerleri flow sitometri ile analiz edildi.

Bulgular: İyonize radyasyon uygulamasının sonrasında 6.saat ve 4. gün ovaryum dokuları alınan gruplarda atretik folliküllerin oranında artış gözlemlendi. Granuloza hücreleri yuvarlak şekilli ve apoptotik hücre görünümünde izlendi. İyonize radyasyona maruz kalan sıçanların ovaryum dokuları incelendiğinde 4.gün İR grubunda atretik folliküllerin sayısı 6. saat İR grubuna göre belirgin bir şekilde artmıştı. LK uygulanan gruplarda İR'nun yarattığı hasarda belirgin bir düzelme gözlemlendi. İR gruplarında serumdaki IL-1 α , IL-4 ve GM-CSF düzeyleri kontrol grubu ve tedavi grubuna göre artmış olarak izlendi.

Sonuç: İyonize radyasyonun akut olarak primordiyal ve primer folliküllerdeki dejenerasyonu arttırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, L-karnitin iyonize radyasyona bağlı gelişen folliküler atrezide koruyucu bir rolü olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: İyonize Radyasyon, Follikülogenezis, Ovaryum, Apoptozis, Sıçan

Abstract

Objective: This study deals with the morphological degenerations of normal and atretic follicles based on artificially induced radiation apoptosis. Ovarian follicular degeneration is accelerated by ionising radiation. The aim of the present study was to assess the radioprotective effects of L-carnitine on ovarian follicles.

Material-Method: Thirty Wistar albino female rats were divided into five groups. Rats with or without pretreatment with 200 mg/kg L-carnitine, were irradiated with 8.3 Gy of X ray. The ovaries were collected at 6 h and 4 d after irradiation. Every fifth section throughout the entire ovary was stained with Hematoxylin and Eosin and follicles with a nucleus present in the oocyte were counted. The follicles were classified as primordial, primary, preantral and antral. The levels of IL-1 α , IL-4 and GM-CSF in serum were determined by flow cytometric analysis.

Results: The ratio (%) of normal to atretic follicles decreased with time after the irradiation in primordial follicles and in primary follicles as well. At 6 h after irradiation, the number of degenerated primordial follicles increased. Granulosa cells became round in shape and apoptotic cells started to appear. When the ovarian tissues of the rats exposed to ionizing radiation were examined, the number of atretic follicles in the 4th day ID group was significantly prominent at 6th hour according to the IR group. A significant improvement in IR damage was observed in LK treated groups. Serum levels of IL-1 α , IL-4 and GM-CSF were increased in the IR groups compared to the control group and the treatment group.

Conclusions: It is concluded that the ionizing radiation acutely induces the degeneration of primordial and primary follicles. These results can provide morphological clues for the identification of the degenerating primordial and primary follicles in normal and irradiated rat ovaries.

Keywords: Ionising Radiation, Folliculogenesis, Ovary, Apoptosis, Rat

Giriş

Günümüzde hemen hemen tüm canlılar iyonize ve iyonize olmayan radyasyona maruz kalmaktadırlar (1). İyonize radyasyonların biyolojik etkileri, dokularda bulunan hücrelerdeki atomların iyonlaşması ve moleküler yapıların bozulmasıyla ortaya çıkar. Radyasyonun biyolojik olarak hem somatik hem de genetik etkisi vardır. Somatik etkiler, radyasyondan etkilenen kişilerde oluşan etkilerdir. Genetik etkiler ise radyasyondan etkilenen kişilerde değil de sonraki nesillerinde ortaya çıkan etkilerdir. (2)

Tüm vücudun veya büyük bir bölümünün yüksek dozlarda radyasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkan etkiler radyasyonun akut etki olarak adlandırılır. Kronik etki ise radyasyon etkileşmelerinin canlı sistemlerde genellikle birkaç yıllık bir kuluçka döneminden sonra ortaya çıkan etkilerdir (2). Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Sık bölünen ve farklılaşmamış olan over ve testisin germinal hücreleri, hematopoetik sistem hücreleri, gastrointestinal sistem epitel hücrelerin duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen ve farklılaşmış hücrelerden; karaciğer, böbrek, kıkırdak, kas, sinir hücrelerinin duyarlılığı daha azdır (3).

Kanser tedavi yöntemlerinden olan radyoterapi, ovaryum follikül havuzundaki primordiyal folliküllerin sayısını azaltıcı ve yok edici etki göstererek ovaryum yaşlanmasını hızlandırıcı bir etken olarak tanımlanmaktadır (4, 5).

Ovaryumdaki folliküllerin kuvvetli derecede yıkıma uğraması ovaryum işlevlerini etkilemekte ve kalıcı ovaryum yetmezliğine neden olmaktadır (6). Bu nedenle radyoterapi sonrasında normal görünen genç bayanlar ilerleyen yıllarda prematüre ovaryum yetmezliği riski taşımaktadırlar. Radyoterapi sonrası görülen infertilite çok sayıda kanser hastasının maruz kaldığı bir durumdur (7).

Radyoterapinin ovaryum işlevleri üzerindeki toksik etkilerinin azaltılması için yeni yöntemler ve alternatif tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Özellikle tedavi sırasında önerilen ve bitkisel gıdalarda bulunan antioksidanlar ve anti-kanserojenler, kanser riskinin ve kanserden sonra gelişen travmanın azaltılmasında son derece etkili olan maddelerdir.

Karnitinler, yağ asitlerinin mitokondride normal oksidasyonu için gereklidirler ve açıl koenzim A (KoA) esterlerinin transesterifikasyonu, atılımı ve dallı zincirli α -ketoasitlerin oksidasyonu ve mitokondriyelerden toksik açıl karnitin esterlerinin kaldırılmasına katkıda bulunurlar. L-karnitin (β -hidroksi- γ -trimetilamonium butirik asit) ise küçük, suda eriyebilen vitamin benzeri bir karnitin türevidir. Birçok çalışmada karnitinlerin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinin olduğu gösterilmiş, bu etkilerini reaktif oksijen metabolitlerini (ROM) süpürerek, hücresel süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSPHx) enzimlerini ve hücresel glutatyonu (GSH) artırarak ortaya çıkardıkları ileri sürülmüştür. Karnitinler membran oluşumu ve bütünlüğü için gereken fosfolipid sentezini artırmakta ve fosfolipidlerin reaçilasyonu tarafından membran tamirinde önemli görev almaktadırlar (3). Karnitinlerin, serbest radikallere karşı membran stabilizasyonu ile hücreleri hasardan koruduğu ve mitokondrial hasarı önlediği, böylece

enerji üretimini artırıp, serbest radikallerin geçişini de azalttığı gösterilmiştir, fakat antioksidan ve serbest radikal süpürücü bu etkisinin mekanizması halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (1).

Bu çalışmanın amacı tüm vücudu iyonize radyasyona maruz kalan sıçanların ovaryum folliküllerinde L-karnitin (LK) antiapoptotik ve radyoprotektif etkilerini araştırmaktır.

Materyal-Method

Çalışmamızda Bülent Ecevit Üniversitesi (BEÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, genç erişkin, 30 adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar aynı grupta olacak şekilde; biri kontrol 4'ü deney grubu olmak üzere toplam 5 grup oluşturuldu. Tüm denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları ($22\pm 10C$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi.

Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla BEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, kontrol grubu hariç diğer gruplardaki her bir deneğin, intraperitoneal (ip) yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı / Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer / Türkiye) ile anestezi yapıldıktan sonra, denekler supin pozisyonunda sabitlenip, gerekli doz hesaplaması yapılarak, Linear akseleratör cihazı ile tek fraksiyonda tüm vücuda toplam 8,3 Gy X ışını uygulandı.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu;

I. Grup (n=6): Işınlama ortamına götürülen ancak ışın uygulanmayan, deney süresince ip. yoldan da plasebo sf uygulanacak olan kontrol grubu.

II. Grup (n=6): Tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan sonra 6. saatte sakrifiye edilecek, ip yoldan da plasebo sf uygulanacak olan radyasyon-1 grubu.

III. Grup (n=6): Tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan sonra 4. günde sakrifiye edilecek, ip yoldan da plasebo sf uygulanacak olan radyasyon-2 grubu.

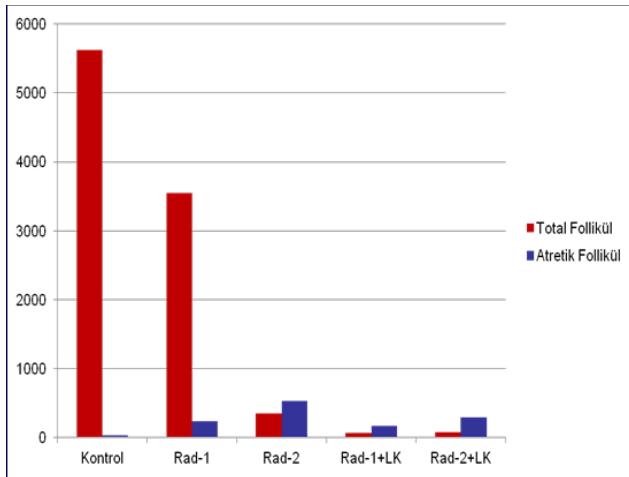
IV. Grup (n=6): Tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan 1 gün önce ve ışınlama günü ip.yoldan 200 mg/kg L-karnitin uygulanacak olan, ışınlamadan sonra 6. saatte sakrifiye edilecek radyasyon-1+L-karnitin grubu.

V. Grup (n=6): Tüm vücut X ışını alan ve ışınlamadan 1 gün önce başlayıp sakrifikasyona kadar ip yoldan günlük 200 mg/kg L-karnitin uygulanacak olan, ışınlamadan sonra 4. günde sakrifiye edilecek radyasyon-2+L-karnitin grubu.

Işınlama sonrası 6. saatte (Rad-1) ve 4. günde (Rad-2) ovaryum dokuları toplandı. Ovaryum dokusundan her 5. kesit alınarak hematoksilen-eozin boyaması yapılarak oosit çekirdeğinin görüldüğü her oosit sayıldı. Folliküller primordiyal, primer, preantral ve antral olacak şekilde sınıflandırıldı. Serumdaki IL-1 α (interlökin-1 alfa), IL-4 (interlökin-4) ve GM-CSF (granülosit monosit koloni stimülan faktör) değerleri flow sitometri ile analiz edildi.

Bulgular

Kontrol grubuna ait ovaryumların histolojik değerlendirilmesinde Tunika albuginea'nın, germinal epitelin altında yoğun bir bağ doku tabakası olarak süreklilik gösterdiği tespit edildi ve bu tabakanın hemen altında yerleşim gösteren gelişimin farklı aşamalarındaki folliküller normal bir görünüme sahip olduğu izlendi (Resim 1a-1b). İyonize radyasyon maruziyetinden 6 saat ve 4 gün sonra alınan ovaryum doku kesitlerinde kontrol grubundan farklı olarak, atretik dejenerasyonların oldukça yaygın olduğunu gözlemledik. Atretik folliküllerde meydana gelen değişiklikleri; genellikle çok sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücreleri, antral boşluktaki apoptotik cisimcikler, granüloza hücreleri ile oosit arasındaki ayrışmalar, granüloza hücrelerindeki sitoplazmik kayıplar, hücrelerde vakuolizasyon, oosit morfolojisinde bozulmalar, oosit çekirdeği dejenerasyonu ve teka tabaka hipertrofisi olarak gözlemledik. Atretik follikül sayısını kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı düzeyde ($p < 0,001$) fark olduğunu tespit ettik (Grafik 1). İyonize radyasyona maruz kalınmadan bir hafta önce başlayan ve ışınlamadan sonraki 4. güne kadar L-karnitin verilen gruptaki deneklerimizin ovaryum dokusu ışık mikroskopu ile incelediğimizde; sadece iyonize radyasyon alan tedavisiz grupta görülen folliküller atrezi ve dejenerasyon oranının, bu gruplarda L-Karnitin tarafından kısmen önlendiğini gözlemledik. LK uygulanan gruplarda İR'nin yarattığı hasarda belirgin bir düzelme gözlemlendi. İR gruplarında serumdaki IL-1 α , IL-4 ve GM-CSF düzeyleri kontrol grubu ve tedavi grubuna göre artmış olarak izlendi (Tablo 1).



Grafik 1. Gruplara göre total follikül sayısı ve atretik follikül sayısı dağılımı (n=6)

Tablo 1. Radyasyona bağlı serum IL-1 α , GM-CSF ve IL-4 düzeylerinde meydana gelen değişiklikler

	Kontrol Ortanca (Min-Maks)	Rad-1 Ortanca (Min-Maks)	Rad-2 Ortanca (Min-Maks)	Rad-1+LK Ortanca (Min-Maks)	Rad-2 + LK Ortanca (Min-Maks)	P
IL-1α	0,975 (0,91-1,10) ^a	1,055 (1,04-1,17) ^b	1,680 (1,61-1,90) ^c	1,155 (1,10-1,25)	1,380 (1,32-1,40)	<0,001
GM-CSF	1,015 (0,99-1,03) ^a	1,070 (1,03-1,15)	1,130 (1,12-1,16) ^c	1,075 (1,02-1,12)	1,095 (0,92-1,13)	0,003
IL-4	1,020 (1,01-1,04) ^d	1,050 (0,94-1,20)	1,150 (1,11-1,15)	1,175 (1,15-1,24)	1,170 (1,10-1,33)	0,001

^aKontrol grubu, Rad-1, Rad-2, Rad-1+LK ve Rad-2+LK grupları ile kıyaslandığında

^bRad-1 grubu, Rad-1+LK grubu ile kıyaslandığında

^cRad-2 grubu, Rad-2+LK grubu ile kıyaslandığında

^dKontrol grubu, Rad-2, Rad-1+LK ve Rad-2+LK grupları ile kıyaslandığında

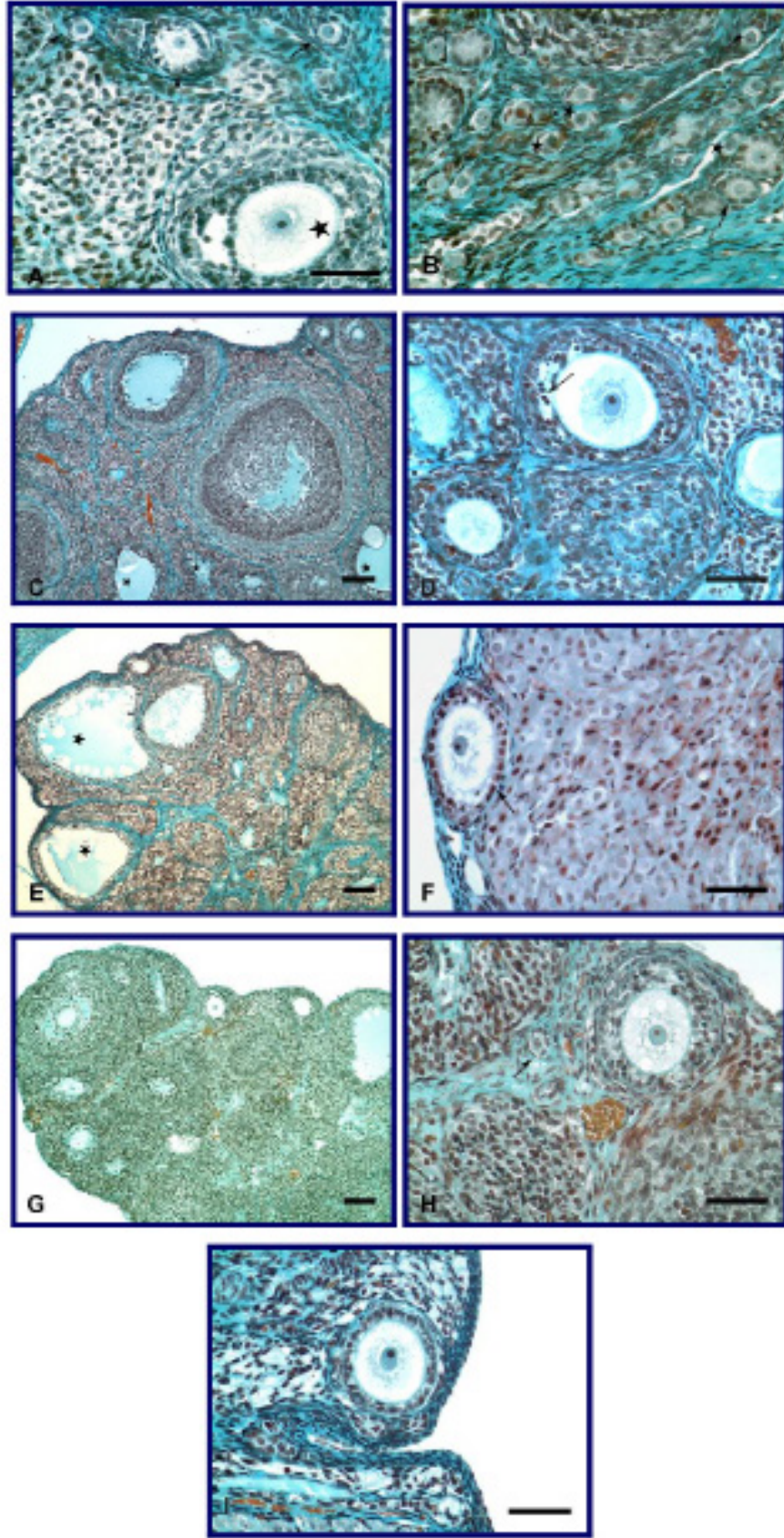
Tartışma ve Sonuç

Radyasyonun, genç erişkinlerde pelvisi kapsayan bir alanda, devam eden üreme fonksiyonları üzerine olumsuz bir etkisinin olduğu iyi bilinir (8). Özellikle yüksek doz radyoterapi, kanserli genç hastaların sağkalımını uzatır ancak ovaryum işlevini etkileyerek ovaryum yetmezliği, adet görmeme, erken menapoz ve infertiliteye yol açabilir (9, 10). Thibaud ve ark. puberteden önce tek doz verilen ≤ 10 Gy tüm vücut ışınlamanın yüksek ovaryum yetersizliğe (%55-80) neden olduğunu, fakat fraksiyonlu tüm vücut ışınlamaların daha yüksek dozlarda bile ovaryumlara karşı daha az toksik etki bıraktığını göstermişlerdir. 25 yaşından sonra yapılan tüm vücut ışınlamalar ovaryumlarda daha fazla toksik etki bırakmaktadır (11).

Bazı vakalarda, radyasyonun belki de kanserin en iyi tedavi edici yöntemi olabileceği düşünülmüştür. Malign hücrelerin yok olmasının yanı sıra normal hücrelerde hasarla sonuçlanan radyoterapi ağır yan etkilere sahiptir. Radyasyonun olumsuz biyolojik etkileri, hücre hasarının oluşması ve zararlı sitotoksik etkilere neden olan oksidatif stres ile birlikte ortaya çıkan H₂O₂, OH⁻ ve O₂·yi kapsayan ROT'nin üretimidir (12, 13).

Radyasyon hasarını engellemek için sistemler üzerinde çeşitli antioksidanlarla birçok çalışma yapılmıştır. Antioksidan savunma sistem seviyeleri ve ROT ürünleri arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkan oksidatif stresin oluşturacağı hasarı engellemek için melatonin, taurin, hipotaurin, glutatyon, vitamin A, C ve E gibi çeşitli antioksidanlar önerilmiştir (12, 14-16). Bunlara ilave olarak, radyasyonun zararlı etkilerinden hücreleri koruduğu birçok çalışmada ispatlanan curcuminin radyoprotektif özelliği ve önemli fitokimyasallardan biri olması onun radyomodifiye bir ajan olarak kabul edilmesini sağlamaktadır (17).

Organizma içerisinde alfa tokoferol, askorbik asit ve L-karnitin güçlü antioksidan özellikteki bileşiklerdir ve özellikle lipid peroksidasyonunu belirgin şekilde inhibe etmektedirler. Potansiyel antioksidan özelliklerinden dolayı bu yapıların oksidatif strese bağlı kronik hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu bilinmektedir (18). Karnitin'in, kalp kasında lipid esterlerinin birikimi ve lipid peroksidasyon ürünü malonyl dialdehid (MDA) yapımını önleyerek ATP sentezini artırdığı düşünülmektedir (19). Ayrıca, radikal oksijen türlerinin (ROS) sentezini hızlandıran Fe²⁺ ile kompleksler oluşturarak lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır (20). L-karnitin antioksidan kapasiteyi artırarak doku bozulmasını azaltabilir. Gençlere



Resim 1. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip ovaryum follikülleri görülmekte (A; yıldız: antral follikül, ok: primordiyal follikül, ok başı: primer follikül. B; yıldız: pimordiyal follikül, ok: primer follikül). Radyasyon-1 grubuna ait sıçan ovaryumunda C; yıldız: atretik folliküller, D; ok: apoptotik granüloza hücreleri izlenmekte. Radyasyon-2 grubunda, E; atretik folliküller (yıldız) ve medulladaki bağ dokusu artışı ile F; primer follikül (ok). Radyasyon-1+L-karnitin uygulanan grupta dejeneratif değişikliklerde belirgin düzeyde azalma dikkati çekmekte (G,H). Radyasyon-2+L-karnitin uygulanan grupta normale yakın primer follikül görüntüsü izlenmekte (I). Masson. Bar: 50µm.

oranla yaşlı ratlardaki lipid peroksidasyonun artması ve antioksidan etkiye sahip olan SOD, glutatyon ve katalaz, C ve E vitaminlerinin azalması ve karnitin ilaveleri ile artış gösterebilmeleri bu görüşü desteklemektedir (21).

Çalışmamızda, iyonize radyasyon modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve oksidatif stres artışı ve hücre hasarı histolojik düzeyde açıkça gösterilmiştir. Bu stresin, follikül hücre ve oosit çekirdeklerinde oluşturduğu hasar histokimyasal olarak belirlenmiş ve hasarın derecesi semikantitatif olarak ortaya konmuştur. Ayrıca antioksidan özelliği bilinen L-karnitin iyonize radyasyon sonucu ortaya çıkan ovaryum hasarını kısmende olsa azaltmış olduğunu gözlemlendi.

Kaynaklar

1. Uzal C, Çaloğlu M. Kanser etyolojisinde iyonizan radyasyonun yeri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fak. Derg.* 2002; 19: 177-182.
2. Daşdağ S. İyonlaştırıcı radyasyonlar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi.* 2010; 237(2): 177-185.
3. Yaren H, Karayılanoğlu T. Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni.* 2005; 4(4): 199-208.
4. Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E, Erhan Y. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 2004; 44: 6-9.
5. Meirow D. Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radiochemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers, *Leuk Lymphoma.* 1999; 33: 65-76.
6. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1998; 27: 927-943.
7. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy, *Blood Rev.* 1995; 9: 93-116.
8. Wallace WB, Kelsey TW, Sklar C, Robison LL, Stovall M, Whitton J, et al. The radiosensitivity of the human oocyte: a revised estimate using data from the CCSS on women who had developed premature ovarian failure following a known dose of radiation to the ovary as part of their treatment of cancer, 2006.
9. Wallace WHB, Thomson AB, and Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Human Reproduction* 2003; 18(1): 117-121.
10. Metindir J, Bozkurt C. Kanser tedavilerinin over fonksiyonlarına etkisi ve fertilitede koruyucu yaklaşımlar. *J Turkish German Gynecol Assoc.* 2005; 6(1): 23-29.
11. Thibaud E, Rodriquez MK, Trivin C, et al. Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22: 989-994.
12. Srinivasan M, Ram Sudheer A, Raveendran Pillai K, Raghu Kumar P, Sudhakaran PR, Menon VP. Modulatory effects of curcumin on γ - radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2007; 24: 98-105.
13. Jagetia GC, Rajanikant GK. Role of curcumin, a Naturally occurring phenolic compound of Turmeric in Accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of γ - radiation. *Journal of Surgical Research.* 2004; 120: 127-138.
14. Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoglu C, et al. Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2009; 42: 621-628.
15. Wilson RL. Free radical repair mechanisms and the interaction of glutathione and vitamin C and E. In: O. F. Nygaard and M. G. Simic (Eds). *Radioprotectors and Anticarcinogens.* New York; Academic Pres. 1983; 1-23.
16. Agarwal A, Allamaneni SSR. Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal.* 2004; 9(3): 187-197.
17. Choudhary D. Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *Journal of Ethnopharmacology.* 1999; 46: 1-7.
18. Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia, *Fertil Steril.* 2005; 84(3): 662-71.
19. Rodrigues B, Xiang H, McNeill JH. Effect of L-carnitine treatment on lipid metabolism and cardiac performance in chronically diabetic rats. *Diabetes.* 1988; 37(10):1358-64.
20. Arduini A, Tyurin V, Tyuruna Y, Arrigoni-Martelli E, Molajoni F, Dottori S, Federici G. Acyl-trafficking in membrane phospholipid fatty acid turnover: the transfer of fatty acid from the acyl-L-carnitine pool to membrane phospholipids in intact human erythrocytes. 1992; 187(1): 353-8.
21. Schnackenberg CG, Wilcox CS. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. 2001; 59(5): 1859-64.