

Research Article**Effect of Carvacrol on Sperm Profile on Varicocele-Induced Testicular Damage in Rats****Elham Ghahraman¹, Akram Eidi^{1*}, Pejman Mortazavi², Ahmad Asghari²,
Masoumeh Asl Roosta³**

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Veterinary, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Department of Biology, Zanzan Branch, Islamic Azad University, Zanzan, Iran

*Corresponding author: akram_eidi@yahoo.com

Received: 23 November 2024

Accepted: 23 February 2025

DOI:

Abstract

Carvacrol is a phenolic monoterpene found in the essential oils of numerous aromatic herbs and spices from the Lamiaceae family. This compound possesses a range of pharmaceutical properties, including antioxidant, anti-apoptotic, anti-cancer, and anti-microbial effects. In our study, we explored the protective effects of carvacrol against infertility induced by varicocele in rats. The animals were randomly divided into nine groups: control, sham-operated, carvacrol alone at doses of 10, 20, 40 mg/kg body weight per day, varicocele-induced control, and varicocele-induced rats receiving carvacrol treatment. After a 30-day treatment period, the animals were euthanized for analysis. Blood and sperm sampling were collected, with blood drawn from the heart for serum isolation. We then measured serum levels of testosterone, LH and FSH. Additionally, sperm count, morphology, viability, and motility were assessed. Our findings indicated that the induction of varicocele significantly reduced sperm count, viability, and motility when compared to the control group. Furthermore, rats with varicocele exhibited a notable increase in sperm abnormalities. The infertile control group showed a significant decrease in serum testosterone levels, alongside increased levels LH and FSH. Notably, carvacrol administration at doses of 20 and 40 mg/kg body weight led to substantial improvements in hormonal levels and sperm quality parameters, effectively countering the negative effects associated with varicocele. In conclusion, carvacrol demonstrates the potential to protect rat testes from oxidative stress related to varicocele, attributed to its antioxidant and free radical scavenging properties.

Keywords: Carvacrol, Oxidative stress, Varicocele, Rats.



اثر کارواکروئل بر پارامترهای اسپرم بر آسیب بیضه القا شده توسط واریکوسل در موش‌های

صحرائی نر

الهام قهرمان^۱، اکرم عیدی^{۱*}، پژمان مرتضوی^۲، احمد اصغری^۲، معصومه اصل روستا^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

*مسئول مکاتبات: akram_eidi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

DOI:

چکیده

کارواکروئل مونوترپن فنلی است که در اسانس گیاهان معطر و ادویه‌های مختلف متعلق به خانواده نعنائیان یافت می‌شود. کارواکروئل دارای خواص دارویی مختلفی مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدآپوپتوز، ضدسرطان و ضد میکروبی است. در تحقیق حاضر اثر محافظتی کارواکروئل بر آسیب بیضه ناشی از واریکوسل در موش صحرائی بررسی گردید. حیوانات به طور تصادفی به ۹ گروه تقسیم شدند: کنترل، شم، تجربی سالم با تیمار کارواکروئل در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، کنترل واریکوسل، تجربی واریکوسل با القا واریکوسل و تیمار کارواکروئل در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن. بعد از ۳۰ روز تیمار، حیوانات بیهوش گردیده و نمونه گیری خون و اسپرم صورت گرفت. نمونه‌گیری خون از قلب انجام شد و سرم جدا گردید. سطح سرمی تستوسترون، LH و FSH بررسی شد. تعداد، موفولوژی، زنده مانی و تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که القا واریکوسل منجر به کاهش معنی‌دار تعداد، زنده مانی و تحرک اسپرم در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. علاوه بر این موش‌های با القا واریکوسل افزایش معنی‌دار در ناهنجاری‌های اسپرم نشان دادند. نتایج نشان داد که سطح سرمی تستوسترون در گروه کنترل واریکوسل به طور معنی‌داری کاهش و سطوح LH و FSH افزایش یافت. پیشرفت واریکوسل منجر به کاهش قابل توجه تعداد، زنده مانی و تحرک اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد. تیمار کارواکروئل در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن منجر به بهبود معنی‌دار در پارامترهای هورمونی و اسپرم شد و اثرات نامطلوب القای واریکوسل را کاهش داد. در نتیجه کارواکروئل توانست از بیضه موش در برابر اثرات استرس اکسیداتیو واریکوسل به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد محافظت کند.

کلمات کلیدی: کارواکروئل، استرس اکسیداتیو، واریکوسل، موش صحرائی.

مقدمه

دربرمی‌گیرد که ۱۹ تا ۴۱ درصد این افراد نابارور می‌شوند (۱۷، ۳۳). عوامل مختلفی از جمله هیپرترمی، آسیب‌های ناشی از افزایش جریان خون بیضه‌ای، رفلکس متابولیت-های کلیوی و آدرنال، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز در

واریکوسل یکی از دلایل ناباروری در مردان است. واریکوسل به وضعیتی اطلاق می‌شود که طی آن اتساع و پیچش غیرطبیعی شبکه وریدی پامپینیفرم طناب اسپرماتیک رخ می‌دهد. این اختلال ۲۵-۱۵ درصد جمعیت مردان را

و بر روی عملکرد جنسی مردان نیز موثر است. کارواکرو ل باعث افزایش میزان FSH و LH در موش‌های دیابتی شده می‌شود (۳۹). هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار کارواکرو ل بر پارامترهای اسپرم و همچنین سطح گنادوتروپین‌ها و تستوسترون در موش‌های صحرایی تحت القای واریکوسل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی می‌باشد و مطابق با استانداردهای بین‌المللی و دارای کد اخلاق به شماره IR.IAU.SRB.REC.1402.175 می‌باشد. ۴۵ سر موش آزمایشگاهی نر صحرایی بالغ نژاد ویستار در یک محیط کنترل شده، در دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت $50 \pm$ درصد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. حیوانات در ۹ گروه که هر گروه شامل ۶ سر موش بودند بصورت تصادفی تقسیم شدند. حیوانات با تزریق کانامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلانین (۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم) بصورت درون صفاقی تحت بیهوشی قرار گرفتند. القاء مدل واریکوسل به روش Turner انجام گردید که برگرفته از پدیده فندق‌شکن (Nutcracker Phenomenon) است (۳۳). حیوانات در حالت سوپاین قرار گرفتند و یک برش در خط وسط بصورت عمودی در شکم در حدود ۴-۳ سانتیمتر ایجاد شد. پس از باز کردن، احشای شکمی به آرامی با یک گاز خیس به طرف راست بدن انتقال یافتند. ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن مشخص شد سپس اطراف ورید کلیوی چپ از بافت همبند و چربی باز گردید. یک سرسوزن به قطر ۰/۸۵ میلی‌متر به موازات ورید کلیوی قرار داده شد و به وسیله نخ سلیک ۴ صفر روی ورید کلیوی چپ گره زده شد به طوریکه محل گره بعد از محل ورود اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد. بعد از اینکه گره ایجاد شد، سر سوزن خارج گردیده تا ورید به حالت اولیه خود برگردد. با این کار، قطر ورید کلیوی تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد و باعث می‌شود که فشار داخل وریدی افزایش یابد و به ورید اسپرماتیک چپ انتقال یابد و

پاتوژنز این اختلال نقش دارند (۳۰). در بیماری واریکوسل، فاکتورهای عملکردی و ساختاری بیضه دچار اختلال و تغییر می‌شوند. تعداد اسپرم در نمونه مایع منی افراد نابارور مبتلا به واریکوسل کاهش می‌یابد (۲۱). از سوی دیگر واریکوسل بر سلول‌های سرتولی اثر می‌گذارد و سبب واکنش شدن و آزاد شدن زودرس (پیش از بلوغ کامل) اسپرم می‌شود که اینگونه باعث افزایش حضور اسپرم نابالغ در انزال و کاهش کیفیت نمونه مایع منی فرد مبتلا به واریکوسل می‌شود. تحرک اسپرم نیز در بسیاری از مردان نابارور مبتلا به واریکوسل به تنهایی یا همراه با سایر پارامترهای اسپرمی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۳۰). در مردان مبتلا به واریکوسل بین استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدان‌ها عدم تعادل مشاهده می‌شود. استرس اکسیداتیو از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌تواند سبب آسیب پروتئین، لیپید، قند و اسیدهای نوکلئیک شود که در نهایت منجر به آسیب اسپرم و ناباروری می‌گردد (۲۴). در مجرای تولیدمثلی مردانه مقادیر فیزیولوژیک گونه‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در عملکرد اسپرم، تنظیم ظرفیت‌یابی و واکنش اسپرماتوزا با اووسیت دارد (۳۵). افزایش رادیکال‌های آزاد با اثر گذاشتن بر پارامترهای اسپرم باروری اسپرم را کاهش می‌دهند (۳۶). مداخلات درمانی مانند واریکوسلکتومی بطور معمول برای مردان دارای واریکوسل انجام می‌شود. اگرچه جراحی واریکوسلکتومی پارامترهای اسپرمی و هورمونی را بهبود می‌بخشد، یافتن روش‌هایی که عوارض کمتری نسبت به جراحی داشته باشد، حائز اهمیت است. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند پارامترهای اسپرمی را بهبود بخشد (۲۷). کارواکرو ل (۲-متیل-۵-(۱-متیل‌اتیل‌فنول) از خانواده فنول‌ها و ترکیبات آروماتیک می‌باشد (۲۰). کارواکرو ل می‌تواند رادیکال‌های آزاد مثل رادیکال پروکسیل، رادیکال-های سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و نیتریک اکساید را خنثی کند (۲۲). کارواکرو ل فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به عامل هیدروکسیل حلقه‌های آروماتیک مربوط می‌شود (۵). این ترکیب فنولی بر عملکرد سیستم تولیدمثلی مردان موثر واقع می‌شود (۴۲). تیمار کارواکرو ل در موش‌های صحرایی دیابتی موجب افزایش سطح تستوسترون گردیده

واریکوسل ایجاد گردد. احشای شکمی به آرامی به محل خود باز گردانده شدند و محل برش شکمی بوسیله نخ ۴ صفر سیلک بخیه زده شد و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به محل بخیه زده شد. پس از اطمینان از القا واریکوسل (شکل‌های ۱ و ۲)، حیوانات بصورت تصادفی در گروه-های مورد مطالعه زیر قرار گرفتند: ۱- گروه کنترل سالم (حیوانات هیچ گونه درمان و مداخله ای دریافت نکردند). ۲- گروه شم (حیوانات در این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفتند ولی القای واریکوسل در آنها صورت نگرفت و در طی دوره مطالعه روغن آفتابگردان دریافت کردند). ۳-۵- گروه‌های تجربی سالم (موش‌های سالم با کارواکرول در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار شدند). ۶- گروه کنترل واریکوسل (القای واریکوسل در این گروه صورت گرفت). ۷-۹- گروه‌های تجربی واریکوسل (حیواناتی که القای واریکوسل در آن انجام شد و کارواکرول در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار شدند). کارواکرول به مدت ۳۰ روز و بصورت گاواژ تیمار گردید. دوز کارواکرول بر اساس مطالعه Güvenç و همکارانش در سال ۲۰۱۹ بود (۲). حلال کارواکرول روغن آفتابگردان بود. تیمار روز بعد از جراحی القا واریکوسل انجام گردید. پس از پایان دوره ۳۰ روزه حیوانات بیهوش شدند (۷) و برای جمع‌آوری نمونه‌های اسپرم، ابی دیدیم چپ در شرایط استریل جدا شد و درون فالكون حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول T6 + حاوی ۱۰ درصد BSA ۱۵ درصد که از قبل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ابی دیدیم به قطعاتی تقسیم شد. با مشاهده محلول همگن اطمینان از استخراج اسپرم‌ها حاصل شد. برای تخلیه کامل اسپرم‌ها درون محلول، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصل بر روی لام گذاشته شد (۴۳). برای بررسی تعداد اسپرم از لام هموسیتومتر استفاده شد. دو شیار عمود بر هم وجود دارد که داخل لام قابل مشاهده است. یک منطقه H شکل بوسیله شکاف‌ها ایجاد می‌شود و از طریق فشرده‌سازی فاصله ۰/۱ میلی‌متر ایجاد می‌شود. هم چنین دو صفحه در لام یافت می‌شود. در بالا و پایین لام شبکه‌های قابل مشاهده وجود دارد. لام

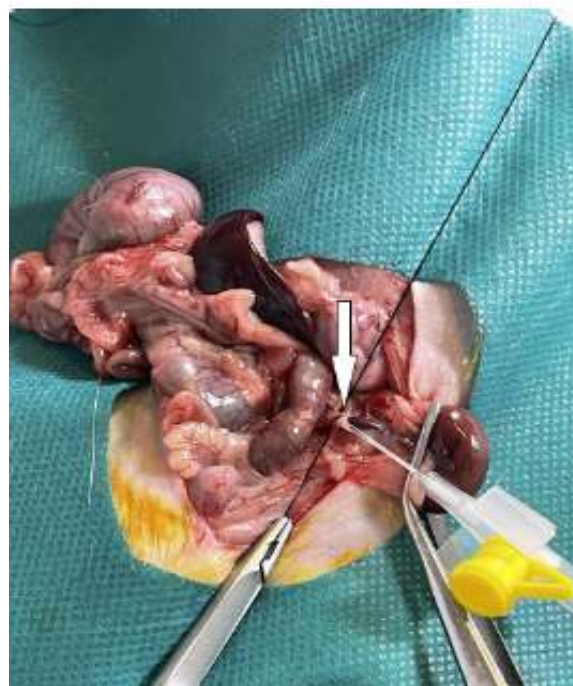
از ۹ مربع بزرگ تشکیل شده و این مربع‌ها با اندازه‌شان مشخص می‌شوند. علاوه بر این، مرکز این لام متشکل از ۲۵ مربع است. هر یک از این مربع‌های میانی علاوه بر این، شامل ۱۶ مربع کوچک است. در نتیجه تعداد کل این مربع‌های کوچک به ۴۰۰ می‌رسد. حجم هر مربع بزرگ از حاصل ضرب سطح صفحه در عمق شیار بعد از لامل گذاری ۰/۱ mm³ است. محلولی حاوی ۵ میکرولیتر فرمالین (شامل NaHCO₃ ۵ درصد و ۰/۲۵ درصد تریپان بلو) با ۹۵ میکرولیتر محلول اسپرم مخلوط شد. این مخلوط، در لام بارگذاری شد. ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای (متوسط) از لام هماسیتومتر با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد شمارش قرار گرفت (۴۳). برای بررسی میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها، از خاصیت نفوذپذیری غشای سلول‌ها به رنگ حیاتی اتوزین استفاده شد. رنگ اتوزین سلول‌های مرده را رنگ می‌کند، اما در غشای سلول‌های زنده قبل از فیکس شدن (ثابت شدن) نفوذ نمی‌کند. بنابراین سلول‌های زنده رنگ نشده باقی می‌ماند و به رنگ سفید خواهند بود و اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی تیره دیده می‌شوند. نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت و ۲۰۰ اسپرم در یک زمان شمارش گردید. به این صورت که اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی تا قرمز در می‌آیند و اسپرم‌های زنده بدون رنگ می‌مانند (۱۳). جهت بررسی تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی لامی که از قبل گرم شده بود گذاشته شد. ۱۰ میدان میکروسکوپی با استفاده از یک میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. سه نوع حرکت رو به جلو (progressive motility)، تحرک آهسته‌به‌جلو (non-progressive motility) و بدون تحرک (immotile) مورد بررسی قرار گرفت. درصد تحرک اسپرم با کمک میکروسکوپ کنتراست فاز معکوس ثبت گردید (۲۷). برای بررسی مورفولوژی اسپرم یک قطره از سوسپانسیون اسپرم بر روی لام گذاشته شد و در هوا خشک شد. اسلاید با الکل ۹۵ درصد تثبیت شد و سپس طبق پروتکل رنگ-آمیزی Sperm Blue انجام گرفت. ۳۰۰ اسپرم در هر حیوان

از نظر شکل با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی ثبت شد (۴۳). تست‌سترون با استفاده از کیت تست ایمونواسی آنزیمی ELISA (شرکت USA Mybiosource) و هورمون‌های LH و FSH (شرکت Finetest, China) مورد سنجش قرار گرفتند. با استفاده از دستگاه الایزا میزان جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. حساسیت سنجش ۰/۰۵ نانوگرم/میلی‌لیتر بود. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شدند. به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف و جهت مقایسه آماری داده‌های کمی، روش ANOVA دوطرفه انجام شد و از تست تعقیبی Tukey استفاده گردید. $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تیمار حیوانات سالم با کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری در تعداد، زنده‌مانی، حرکت پیش رونده، حرکت درجا، مورفولوژی اسپرم و همچنین در اسپرم‌های بدون حرکت در مقایسه با حیوانات گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. نتایج این بررسی

گویای آن است که پارامترهای ذکر شده در حیوانات گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری ایجاد کرد ($p < ۰/۰۰۱$). از طرفی، این پارامترها در حیوانات گروه تجربی واریکوسل تیمار شده با کارواکرول در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل افزایش معنی‌داری داشته است ($p < ۰/۰۰۱$) (نمودارهای ۱ تا ۶). تیمار حیوانات سالم با کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری بر سطح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. از طرفی، سطح هورمون تستوسترون در گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با کنترل سالم کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < ۰/۰۰۱$). تیمار کارواکرول در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش سطح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل گردید (نمودارهای ۷ تا ۹).

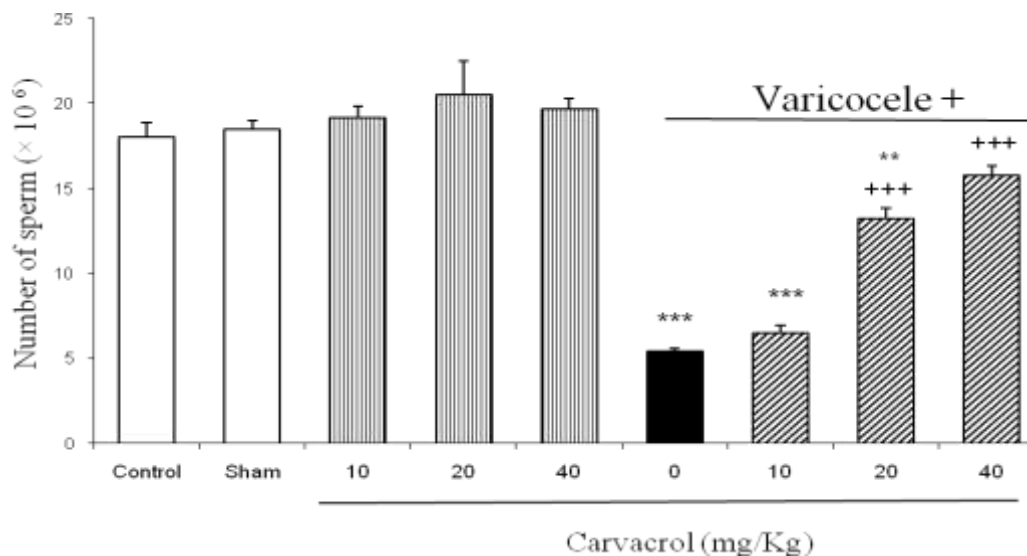


شکل ۱- اتساع و پیچ خوردگی شبکه وریدی طناب اسپرماتیک در گروه کنترل واریکوسلی شده با فلش نشان داده شده است.

Fig. 1. Dilation and tortuosity of the venous network of the spermatic cord in the varicocele control group is indicated by arrows.

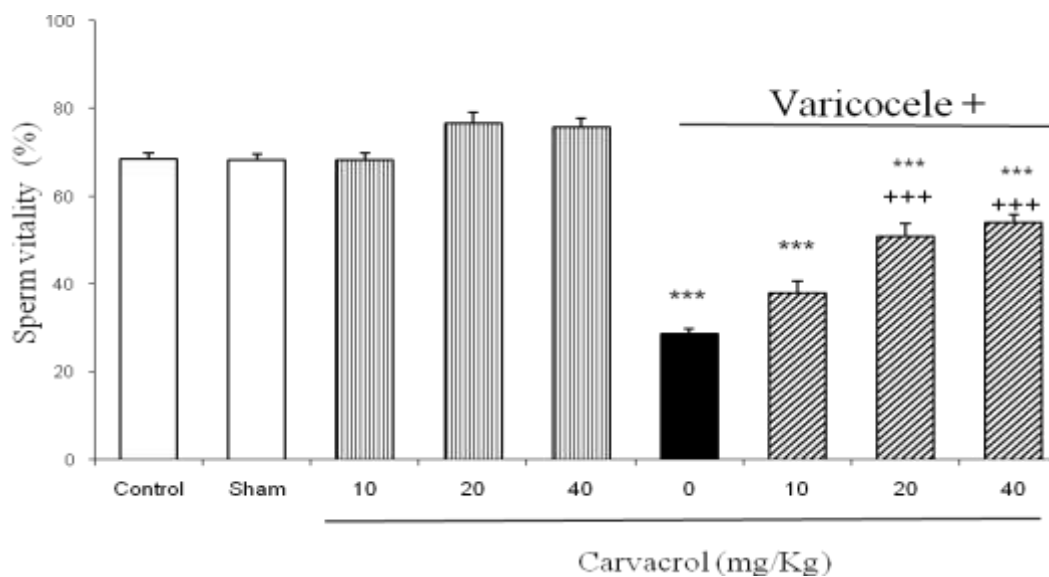


شکل ۲- آسیب بیضه سمت چپ در گروه کنترل واریکوسلی شده با فلش نشان داده شده است.
Fig. 2. Left testicular injury in the varicocele control group is indicated by the arrow.



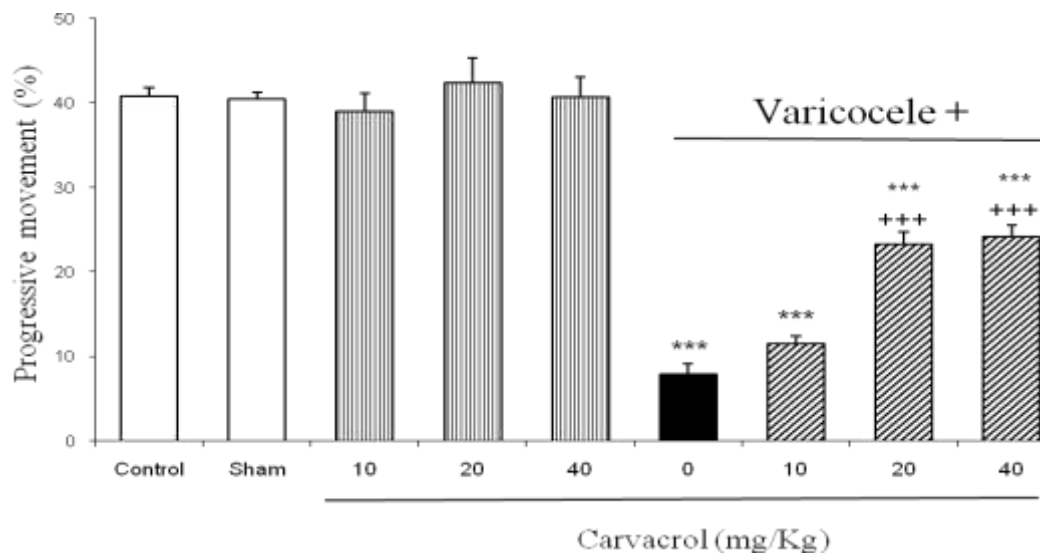
نمودار ۱- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر تعداد اسپرم در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $+++p < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm count in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. $***p < 0.001$, $**p < 0.01$ indicates difference from healthy control group. $+++p < 0.001$ indicates difference from varicocele control group.



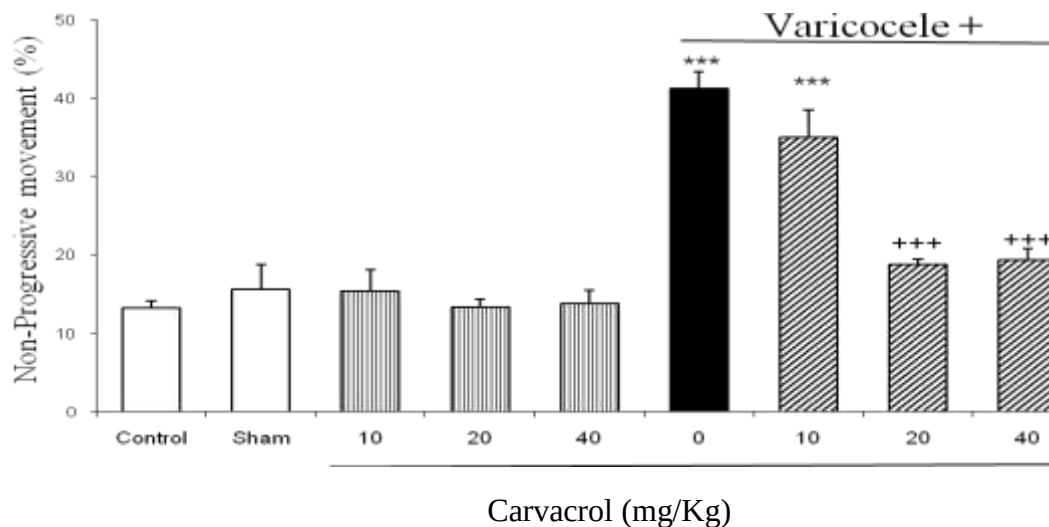
نمودار ۲- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر زنده مانی اسپرم در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $*** p < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $+++ p < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 4. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm viability in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. $*** p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. $+++ p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



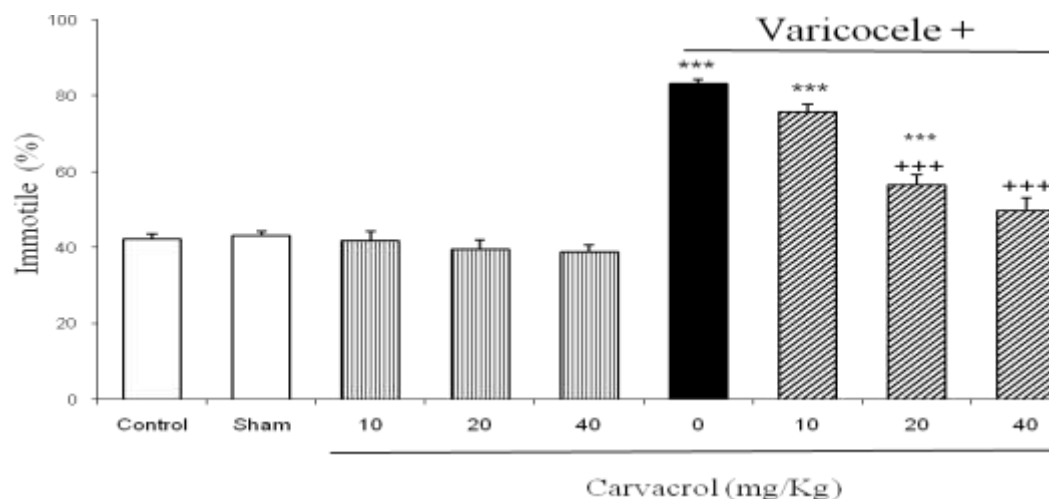
نمودار ۳- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر حرکت پیش‌رونده اسپرم در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $*** p < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $+++ p < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm motility in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. $*** p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. $+++ p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



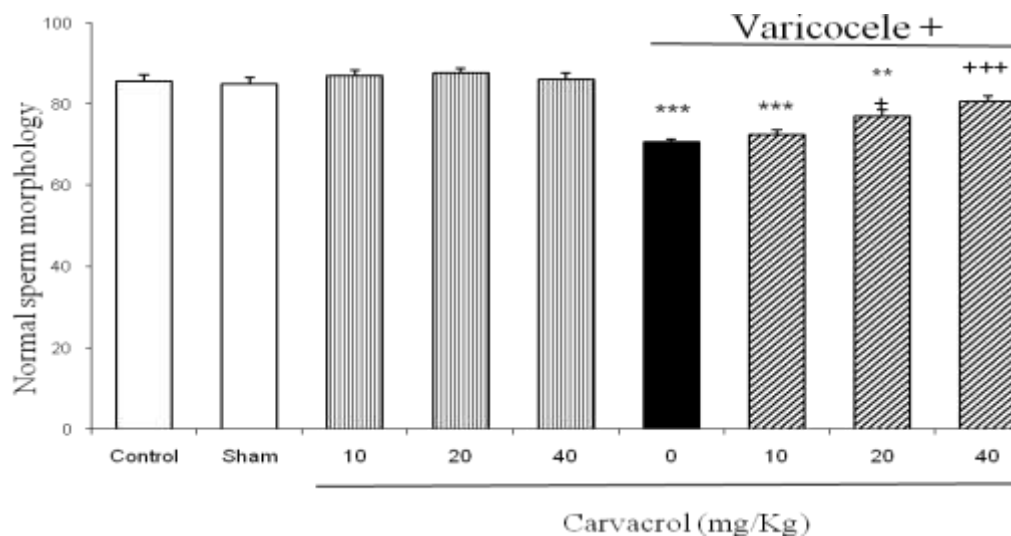
نمودار ۴- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر حرکت غیرپیش‌رونده در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 6. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on non-progressive movement in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



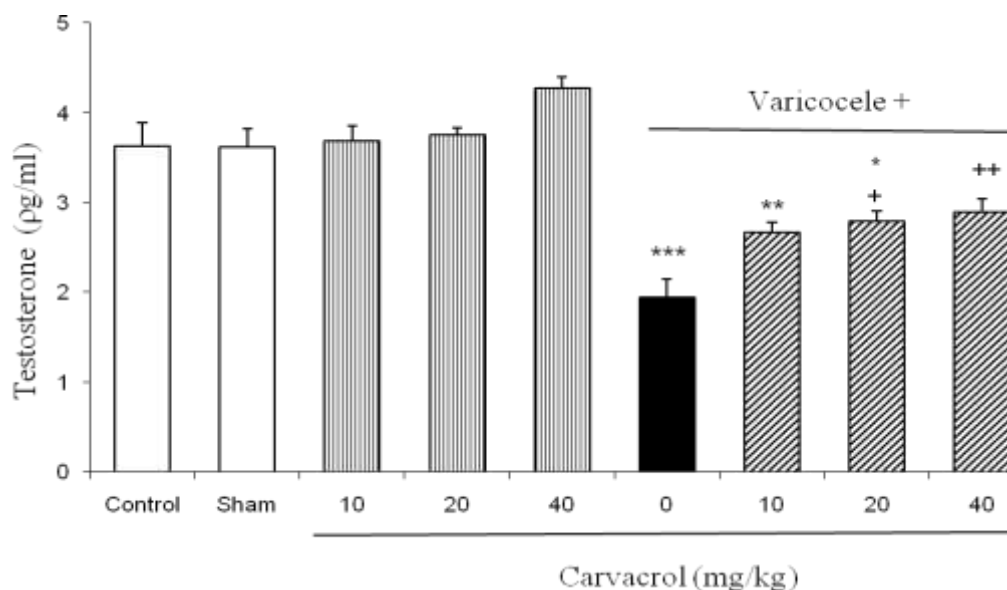
نمودار ۵- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر تعداد اسپرم‌های بدون حرکت در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

Fig. 7. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on the number of non-motile sperm in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



نمودار ۶- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن بر مورفولوژی اسپرم‌ها در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < 0/001$ ، ***، $p < 0/01$ ، ** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $p < 0/001$ ، +++, $p < 0/05$ اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

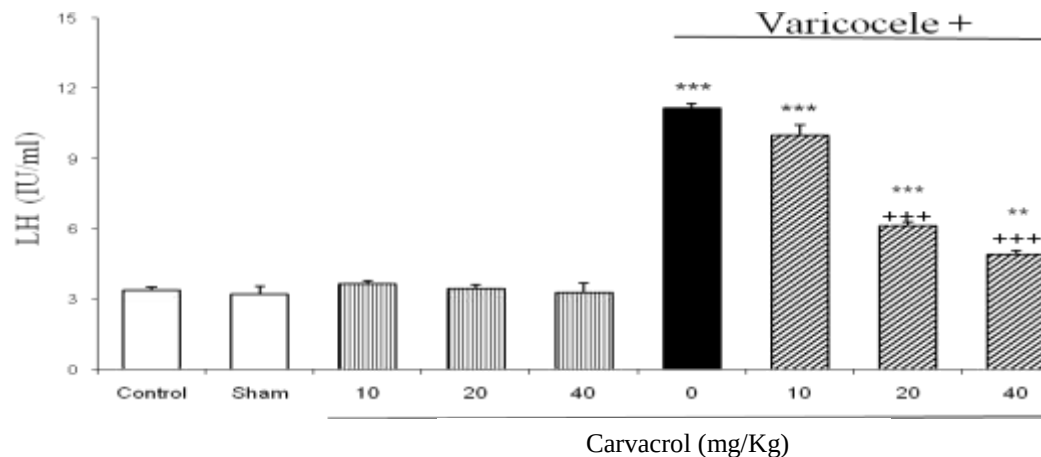
Fig. 8. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on sperm morphology in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** p < 0.001, ** p < 0.01 indicates difference from the healthy control group. +++ p < 0.001, + p < 0.05 indicates difference from the varicocele control group.



نمودار ۷- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن بر سطح سرمی تستوسترون در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. $p < ۰/۰۰۱$ ، *** $p < ۰/۰۱$ ، ** $p < ۰/۰۵$ ، * $p < ۰/۰۱$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. ++ $p < ۰/۰۵$ + p اختلاف از گروه کنترل واریکوسل را نشان می‌دهد.

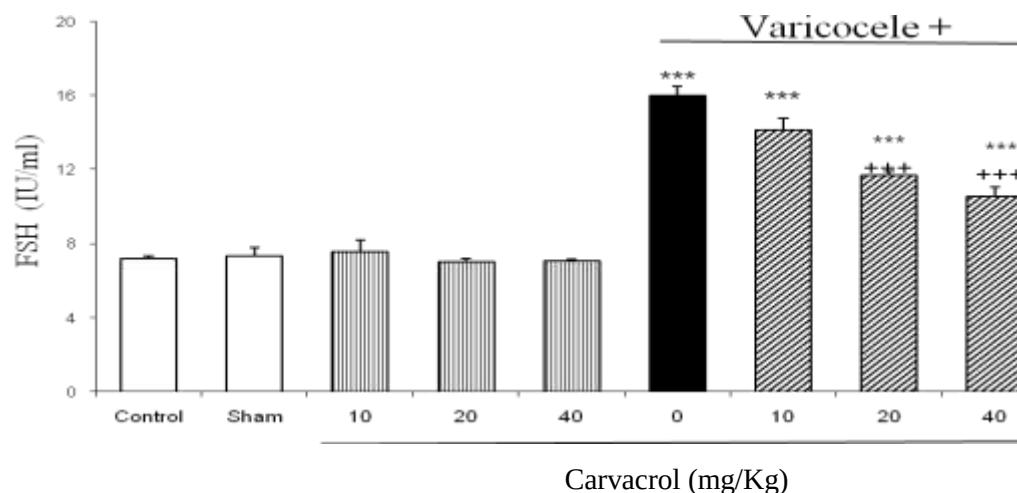
Fig. 9. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on serum testosterone levels in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$

SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ indicate difference from healthy control group. ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$ indicate difference from varicocele control group.



نمودار ۸- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر سطح سرمی LH در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای شش سر رت در هر گروه ارائه شده است. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ نشان می‌دهد. ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$ نشان می‌دهد.

Fig. 10. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on serum LH levels in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.



نمودار ۹- بررسی اثر تیمار خوراکی کارواکرول در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن بر سطح سرمی FSH در رت‌های نر سالم و واریکوسلی شده. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۶ سر رت در هر گروه ارائه شده است. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ نشان می‌دهد. ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$ نشان می‌دهد.

Fig. 11. Study of the effect of oral carvacrol treatment at doses of 10, 20 and 40 mg/kg body weight on serum FSH levels in healthy and varicocele-affected male rats. Results are presented as Mean $\pm$ SEM for 6 rats in each group. *** $p < 0.001$ indicates difference from the healthy control group. +++ $p < 0.001$ indicates difference from the varicocele control group.

بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که القای واریکوسل در موش‌های صحرایی منجر به کاهش معنی‌دار در پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی و همچنین حرکت پیش‌رونده اسپرم گردیده و حرکت غیرپیش‌رونده و همچنین بی‌حرکتی اسپرم را نیز به طور معنی‌داری افزایش داده است. تحقیقات، نشان دهنده ارتباط مثبت بین سطوح ROS و تحرک اسپرم‌ها است. این رابطه مستقیم است و در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۲۹). تجزیه و تحلیل تطبیقی کیفیت اسپرم و یکپارچگی DNA در دو گروه متشکل از افراد سالم و بیمار نشان داد که رابطه معکوس معنی‌دار بین کیفیت اسپرم، به ویژه تعداد اسپرم، و یکپارچگی DNA وجود دارد. علاوه بر این، تحرک اسپرم و تولید ROS به صورت معنی‌داری با اختلال DNA مرتبط است. در نتیجه، سطح بالای ROS ممکن است طیف وسیعی از پیامدها را برای اسپرماتوزنز ایجاد کند، به ویژه موجب کاهش اثربخشی درمان برای مردان نابارور با استفاده از فناوری کمکی تولید مثل (Assisted reproductive technology, ART) می‌شود (۹، ۴۳). بنابراین، واریکوسل می‌تواند به کاهش تحرک اسپرم‌ها و در نتیجه کاهش احتمال باروری منجر شود (۳۰). شاخص‌های التهابی دخیل در بیماری واریکوسل سبب افزایش میزان تولید نیتریک اکساید میشوند که تحرک اسپرم را کاهش می‌دهند (۲۵). مطالعه Missassi و همکاران نشان داد که واریکوسل باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود و همچنین نشان داد تعداد اسپرم‌های با شکل غیرطبیعی در گروه واریکوسل بیشتر است (۳۱). طبق مطالعات، درصد حرکت پیش‌رونده اسپرم، زنده‌مانی اسپرم، اسپرم با شکل طبیعی و تعداد اسپرم در گروه واریکوسل کاهش یافته است (۲۷، ۳۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار کارواکرول موجب تغییر معنی‌داری در پارامترهای اسپرم در حیوانات واریکوسلی در مقایسه با حیوانات گروه کنترل واریکوسل شده است به طوری که منجر به افزایش پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی و همچنین حرکت پیش‌رونده اسپرم گردید، از طرفی حرکت

غیر پیش‌رونده و همچنین بی‌حرکتی اسپرم را به طور معنی‌داری کاهش داد. کارواکرول به طور کلی برای مصرف، بی‌خطر شناخته شده و تأیید سازمان غذا و دارو دریافت کرده است. از طرفی، فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع آن از جمله خواص ضد قارچی، ضد باکتری، ضد ویروسی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و همچنین نقش آنتی-اکسیدانی این ماده، آن را به یک کاندید امیدوارکننده برای استفاده بالینی تبدیل کرده است (۳۸، ۴۱). کارواکرول دارای خواص ضد التهابی است و می‌تواند به کاهش التهاب در بافت‌های درگیر در واریکوسل کمک کند. التهاب نیز یکی از عوامل مهم آسیب به عملکرد اسپرم در واریکوسل است (۴۲). این ماده دارای اثرات محافظتی بر روی غشای سلول‌های اسپرم است که می‌تواند به بهبود ریخت‌شناسی و تحرک اسپرم‌ها کمک کند. در مجموع، به نظر می‌رسد ترکیب اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، تنظیم هورمونی و حفاظت از سلول‌های اسپرم، از جمله مکانیسم‌های احتمالی کارواکرول در بهبود پارامترهای اسپرم در واریکوسل باشد (۱۶). هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، طی مطالعه ای که Aksu و همکارانش در سال ۲۰۱۶ به منظور بررسی اثرات سودمند و مفید کارواکرول بر روی سمیت تولیدمثلی ناشی از سیس پلاتین در موش‌های صحرایی نر انجام دادند، به این مهم رسیدند که تیمار خوراکی کارواکرول توانست پارامترهای اسپرمی از جمله حرکت و تعداد اسپرم را افزایش دهد (۲). Arkali و همکارانش گزارش نمودند که تیمار کارواکرول موجب بهبود پارامترهای اسپرم در موش‌های دیابتی گردیده است (۶). Uyar و همکارانش دریافتند که تیمار کارواکرول موجب بهبود پارامترهای اسپرم در موش‌های مسموم شده با بیسفنول برای مدت ۲۸ روز توانست پارامترهای اسپرم را بهبود ببخشد (۴۲). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای واریکوسل موجب کاهش معنی‌دار سطح هورمون تستوسترون گردیده است. واریکوسل از طریق افزایش پروستاگلاندین‌ها، تعداد سلول‌های لیدیگ و میزان هورمون تستوسترون را کاهش می‌دهد. تستوسترون نقش مهمی در

توسعه مجاری اسپرم ایفا می‌کند، زیرا آزاد شدن آن باعث افزایش و تکثیر این مجاری می‌شود (۴۴). از طرفی دیگر، بیماری واریکوسل می‌تواند سطح هورمون تستوسترون را از طریق چندین مکانیسم کاهش دهد از جمله: افزایش دمای بیضه، کاهش جریان خون به بیضه‌ها، افزایش استرس اکسیداتیو، تغییر در متابولیسم هورمونی. در بیماری واریکوسل، وریدهای بزرگ در ناحیه بیضه متسع میشوند که این امر باعث افزایش دمای بیضه نسبت به دمای طبیعی بدن میشود و در نتیجه می‌تواند تولید تستوسترون را مختل کند و سطح آن را کاهش دهد (۱۵). در بیماری واریکوسل، افزایش دما و کاهش جریان خون باعث افزایش استرس اکسیداتیو در بیضه شده و می‌تواند عملکرد سلول‌های لیدیگ را مختل کرده و تولید تستوسترون را کاهش دهد (۱۴). بیماری واریکوسل ممکن است متابولیسم و کلیانس هورمون تستوسترون را تغییر دهد و این امر می‌تواند منجر به کاهش سطح تستوسترون در گردش خون شود (۳۴). همراستا با نتایج حاضر، مشخص شده که سطح هورمون تستوسترون به صورت معنی‌داری در مردان واریکوسلی در مقایسه با مردان بدون این عارضه کاهش یافت و در نتیجه غلظت اسپرم در این افراد به حد پایین خود رسید (۱). نتایج حاضر نشان داد که تیمار کارواکرول سطح هورمون تستوسترون را در حیوانات واریکوسلی شده در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل بصورت معنی‌داری افزایش داد. کارواکرول می‌تواند از طریق مهار استرس اکسیداتیو، افزایش بیان آنزیم‌های استروئیدوژن سطح تستوسترون را در بیماری واریکوسل افزایش دهد. کاهش استرس اکسیداتیو باعث بهبود عملکرد و بازسازی سلول‌های لیدیگ و افزایش تولید تستوسترون می‌شود (۲۳). تیمار کارواکرول به موش‌های دیابتی توانسته سطح تستوسترون را به صورت معنی‌داری افزایش دهد. تیمار کارواکرول با افزایش سطح هورمون تستوسترون و بیان ژن‌های کلیدی در فرآیند اسپرماتوژنز مانند SF-1، LHCGR و FSHR توانایی مقابله با اثرات مضر دیابت بر سلول‌های زایای بیضه را دارد. کارواکرول ممکن است بر روی سطوح هورمون‌های جنسی مؤثر باشد و به بهبود تولید اسپرم کمک کند و احتمالاً اختلالات

ایجادشده در محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی در بیماری واریکوسل را بهبود می‌بخشد. (۳۹). پژوهش حاضر نشان داد که القای واریکوسل توانست سطح هورمون LH را به صورت معنی‌داری افزایش دهد. بیماری واریکوسل می‌تواند سطح هورمون LH را از طریق بازخورد منفی کاهش تستوسترون، آسیب به سلول‌های لیدیگ، اختلال در بازخورد هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی افزایش دهد. کاهش سطح هورمون تستوسترون باعث کاهش بازخورد منفی به هیپوفیز می‌شود. در نتیجه، هیپوفیز ترشح هورمون LH را افزایش داده تا سطح تستوسترون را بالا ببرد (۳). افزایش دما و استرس اکسیداتیو در بیماری واریکوسل می‌تواند باعث آسیب و اختلال عملکرد سلول‌های لیدیگ شود. این آسیب به سلول‌های لیدیگ که تستوسترون را تولید می‌کنند، منجر به کاهش تستوسترون می‌شود. در پاسخ به این کاهش تستوسترون، هیپوفیز ترشح LH را افزایش می‌دهد (۴). مکانیسم‌های اصلی افزایش LH در بیماری واریکوسل شامل بازخورد منفی کاهش تستوسترون، آسیب به سلول‌های لیدیگ و اختلال در مسیر بازخورد هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی است (۱۸). کارواکرول با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از القای واریکوسل را کاهش دهد که خود منجر به بهبود عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و کاهش ترشح LH می‌شود (۱۹). کارواکرول می‌تواند بیان گیرنده-های GnRH در هیپوفیز را کاهش دهد. این امر باعث کاهش پاسخ هیپوفیز به GnRH و در نتیجه کاهش ترشح LH می‌شود (۲۶). کارواکرول ممکن است بیان SOCS را در هیپوفیز افزایش دهد. این افزایش بیان SOCS می‌تواند مانع از انتقال سیگنال‌های محرک ترشح LH شود و ترشح LH را کاهش دهد (۱۲). Shoorei و همکارانش گزارش نمودند تیمار کارواکرول در موش‌های دیابتی توانست غلظت هورمون LH را بالا ببرد. بعلاوه، تجویز کارواکرول منجر به افزایش سطوح mRNA و بیان پروتئین‌های SF-1، LHCGR و همچنین FSHR گردید (۳۹). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای واریکوسل توانست سطح هورمون FSH را به صورت معنی‌داری افزایش دهد.

کاهش التهاب، بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ، افزایش تولید اینهیبین B به کاهش سطح FSH در واریکوسل کمک کند. کارواکرول دارای خواص ضدالتهابی است که می‌تواند التهاب ناشی از واریکوسل را کاهش دهد. التهاب مزمن در بیضه‌ها می‌تواند به آسیب سلول‌های بیضه و اختلال در تولید هورمون‌های مختلف منجر شود. کاهش التهاب می‌تواند به بهبود سلامت سلول‌های بیضه و عملکرد آنها کمک کند، که این امر می‌تواند به کاهش سطح FSH منجر شود (۲۸). با بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی، تولید اینهیبین B نیز ممکن است افزایش یابد. اینهیبین B هورمونی است که بازخورد منفی بر ترشح FSH از هیپوفیز دارد. افزایش سطح اینهیبین B می‌تواند به کاهش ترشح FSH کمک کند. این مکانیسم‌ها نشان می‌دهند که کارواکرول می‌تواند از طریق تأثیرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خود به بهبود سلامت بیضه‌ها و کاهش سطح هورمون FSH در بیماران مبتلا به واریکوسل کمک کند (۱۱).

نتیجه‌گیری

واریکوسل باعث کاهش پارامترهای اسپرم و اختلال در سطح هورمون‌های تستوسترون و گنادوتروپین گردید. تیمار کارواکرول احتمالاً از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی، بهبود عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ و افزایش تولید اینهیبین B باعث بهبود این پارامترها گردید.

منابع

1. Abdel-Meguid TA, Farsi HM, Al-Sayyad A, Tayib A, Mosli HA, Halawani AH. Effects of varicocele on serum testosterone and changes of testosterone after varicocelectomy: a prospective controlled study. *Urology*. 2014;84(5):1081-7.
2. Aksu EH, Kandemir FM, Altun S, Küçükler S, Çomaklı S, Ömür AD. Ameliorative Effect of Carvacrol on Cisplatin-Induced Reproductive Damage in Male Rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2016;30(10):513-520.
3. Alizadeh M, Nasebakht A, Valizadeh R, Mohammadi Fallah M, Taghizadeh Afshari A, Rahimi MM, Daneshyar C. A preliminary evaluation of serum level of testosterone, LH, and FSH in patients with varicocele after

واریکوسل معمولاً با کاهش عملکرد بیضه‌ها همراه است و می‌تواند منجر به تغییراتی در سطح هورمون‌های جنسی از جمله FSH شود. اگرچه موارد کاهش سطح FSH نیز دیده می‌شود، در بسیاری از موارد، واریکوسل می‌تواند منجر به افزایش سطح FSH شود. مکانیسم‌هایی از جمله اختلال در تولید اسپرم، کاهش تولید اینهیبین B، اختلال در عملکرد سلول‌های لیدیگ می‌توانند این افزایش را توضیح دهند. واریکوسل باعث افزایش دما و استرس اکسیداتیو در بیضه‌ها می‌شود که این موارد به تخریب سلول‌های سرتولی منجر می‌شوند. این امر می‌تواند به کاهش تولید اسپرم و در نتیجه کاهش مهار بازخورد منفی به هیپوفیز و هیپوتالاموس شود. در پاسخ، هیپوفیز شروع به ترشح بیشتر FSH می‌کند تا تولید اسپرم را تحریک کند (۱۰). اینهیبین B هورمونی است که توسط سلول‌های سرتولی در بیضه‌ها تولید می‌شود و معمولاً بازخورد منفی بر ترشح FSH از هیپوفیز دارد. در صورت آسیب به سلول‌های سرتولی ناشی از واریکوسل، سطح اینهیبین B کاهش می‌یابد و این کاهش منجر به افزایش ترشح FSH می‌شود (۳۲). اگرچه نقش اصلی سلول‌های لیدیگ تولید تستوسترون است، اختلال در عملکرد این سلول‌ها می‌تواند به تغییر در سطح هورمون‌های دیگر نیز منجر شود. کاهش تولید تستوسترون می‌تواند به اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و افزایش سطح FSH بیانجامد. واریکوسل می‌تواند از طریق کاهش بازخورد منفی به هیپوفیز و افزایش نیاز به تحریک تولید اسپرم، منجر به افزایش سطح FSH در خون شود (۴۰). Camoglio و همکارانش نشان دادند که القای واریکوسل منجر به افزایش سطح هورمون FSH در موش‌های واریکوسلی گردید که پس از انجام جراحی و بهبود واریکوسل سطح این هورمون کاهش معنی‌داری را منجر شد (۸). از طرفی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار کارواکرول موجب کاهش معنی‌داری در سطح هورمون FSH در موش‌های واریکوسل شده در مقایسه با گروه کنترل واریکوسل گردید. خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی کارواکرول می‌تواند نقش مهمی در کاهش سطح هورمون FSH در بیماران مبتلا به واریکوسل داشته باشد. کارواکرول از طریق کاهش استرس اکسیداتیو،

- cisplatin-related ovarian change in a rat model. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2023;62(2):256-63.
13. Erfani Majd N, Sadeghi N, Tavalae M, Tabandeh MR, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of Oxidative Stress in Testis and Sperm of Rat Following Induced Varicocele. *Urol J.* 2019;17;16(3):300-306.
 14. Finelli R, Leisegang K, Kandil H, Agarwal A. Oxidative Stress: A Comprehensive Review of Biochemical, Molecular, and Genetic Aspects in the Pathogenesis and Management of Varicocele. *World J Mens Health.* 2022;40(1):87-103.
 15. Fraczek M, Kamieniczna M, Budzinska M, Kurpisz M. Hyperthermia and sperm quality – a risk factor for male infertility OR contraceptive target. *Postępy Androl Online* 2018; 5(2):48-61.
 16. Gur C, Akarsu SA, Akaras N, Tuncer SC, Kandemir FM. Carvacrol reduces abnormal and dead sperm counts by attenuating sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in the testicular tissues of rats. *Environ Toxicol.* 2023;38(6):1265-1276.
 17. Güvenç M, Cellat M, Gökçek İ, Yavaş İ, Yurdagül Özsoy Ş. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. *Arch Physiol Biochem.* 2019;125(5):396-403.
 18. Han L, Xiang S, Rong B, Liang Y, Zhao S. Verbascoside attenuates experimental varicocele-induced damage to testes and sperm levels through up-regulation of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Pharm Biol.* 2021;59(1):715-22.
 19. Ibrahim DE, Lebda MA, Hashem AE, Elfeky MS. The Antioxidative effect of Carvacrol on Methotrexate induced testicular damage in rats. *Alex J Vet Sci.* 2023; 76(2):6.
 20. Imran M, Aslam M, Alsagaby SA, Saeed F, Ahmad I, Afzaal M, Arshad MU, Abdelgawad MA, El-Ghorab AH, Khames A, Shariati MA, Ahmad A, Hussain M, Imran A, Islam S. Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Sci Nutr.* 2022;10(11):3544-3561.
 21. Janghorban-Laricheh E, Ghazavi-Khorasgani N, Tavalae M, Zohrabi D, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. An association between sperm PLC ζ levels and varicocele? *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(12):1649-1655.
 - varicolectomy as a kidney-related disease. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:1585-1590.
 4. Andò S, Giacchetto C, Colpi G, Beraldi E, Panno ML, Lombardi A, Sposato G. Physiopathologic aspects of Leydig cell function in varicocele patients. *J Androl.* 1984;5(3):163-70.
 5. Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Veeramani C, Pugalendi KV. Protective Effect of Carvacrol on Oxidative Stress and Cellular DNA Damage Induced by UVB Irradiation in Human Peripheral Lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2015;29(11):497-507.
 6. Arkali G, Aksakal M, Kaya ŞÖ. Protective effects of carvacrol against diabetes-induced reproductive damage in male rats: Modulation of Nrf2/HO-1 signalling pathway and inhibition of Nf-kB-mediated testicular apoptosis and inflammation. *Andrologia.* 2021;53(2):e13899.
 7. Asghari A, Akbari G, Galustanian G. Magnesium sulfate protects testis against unilateral varicocele in rat. *Anim Reprod.* 2017; 14:442-451.
 8. Camoglio FS, Zampieri N, Corroppo M, Chironi C, Dipaola G, Giacomello L, Ottolenghi A. Varicocele and retrograde adrenal metabolites flow. An experimental study on rats. *Urol Int.* 2004;73(4):337-42.
 9. Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Minelli A, Mugnai C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. *Reprod Nutr Dev.* 2003; 43(1):91-103.
 10. D'Andrea S, Giordano AV, Carducci S, Sacchetti L, Necozone S, Costanzo M, De Gregorio A, Micillo A, Francavilla F, Francavilla S, Barbonetti A. Embolization of left spermatic vein in non-obstructive azoospermic men with varicocele: role of FSH to predict the appearance of ejaculated spermatozoa after treatment. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(7):785-90.
 11. Dehghan S, Akbarpour B, Kamghar MH. Investigating the effects of shirazi thyme extract on plasma levels of testosterone, Dihydrotestosterone, LH and FSH in adult male wistar Rats: an study. *J Altern Vet Med.* 2016;18(3):517-30.
 12. Dinc K, Ozyurt R, Coban TA, Yazici GN, Suleyman Z, Yavuzer B, Suleyman H. The effect of carvacrol on the proinflammatory cytokines, histology, and fertility outcome of

32. Ozden C, Ozdal OL, Bulut S, Guzel O, Koyuncu HH, Memis A. Effect of varicocelectomy on serum inhibin B levels in infertile patients with varicocele. *Scand J Urol Nephrol*. 2008;42(5):441-3.
33. Oztürk H., Tander B., Aydin A., Okumus Z., Cetinkursun S. The effects of chemical sympathectomy on testicular injury in varicocele. *BJU Int*. 2001;87(3):232-4.
34. Panach-Navarrete J, Morales-Giraldo A, Ferrandis-Cortés C, García-Morata F, Pastor-Lence JC, Martínez-Jabaloyas JM. Is there a relationship between varicocele and testosterone levels? *Aging Male*. 2020;23(5):592-598.
35. Romeo C, Santoro G. Free radicals in adolescent varicocele testis. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:912878.
36. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl*. 2002;23(6):737-52.
37. Shafie A, Kianian F, Ashabi G, Kadkhodae M, Ranjbaran M, Hajiaqaei M, Lorian K, Abdi A, Seifi B. Beneficial effects of combination therapy with testosterone and hydrogen sulfide by reducing oxidative stress and apoptosis: Rat experimental varicocele model. *Int J Reprod Biomed*. 2022; 20(11):941-954.
38. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M, Salehi B, Soltani-Nejad A, Rajabi S, Tajbakhsh M, Sharifi-Rad J. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018; 32(9):1675-1687.
39. Shoorei H, Khaki A, Shokoohi M, Khaki AA, Alihemmati A, Moghimian M, Abtahi-Eivary SH. Evaluation of carvacrol on pituitary and sexual hormones and their receptors in the testicle of male diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2020;39(8):1019-1030.
40. Tian D, Huang W, Yan H, Zong H, Zhang Y. Effect of Varicocelectomy on Serum FSH and LH Levels for Patients with Varicocele: a Systematic Review and Meta-analysis. *Indian J Surg*. 2018;80(3):233-8.
41. Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(10):4606-10.
42. Uyar A, Cellat M, Kanat Ö, Etyemez M, Kutlu T, Devenci MYZ, Yavaş İ, Kuzu M. Carvacrol showed a curative effect on
22. Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol*. 2008;600(1-3):78-82.
23. Khatami A, Rahmanifar G, Khaki A, Teymoori A, Rezaii A. Preservation of testicular tissue and alleviation of oxidative stress by carvacrol following torsion/detorsion in adult male rats. *Crescent J Med Biol Sci*. 2023;10(4):182-7.
24. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl*. 2003;5(2):95-9.
25. Lampiao F, du Plessis SS. TNF-alpha and IL-6 affect human sperm function by elevating nitric oxide production. *Reprod Biomed Online*. 2008; 17(5):628-31.
26. Lehimcioğlu NC, Öztürkler Y, YILDIZ S, ARI UÇ. The Effect of intrauterine infusion of carvacrol after insemination on conception rate in repeat breeder cows subjected to progesterone based estrus synchronization protocol. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2019; 25(5):633-8.
27. Lorian K, Kadkhodae M, Kianian F, Abdi A, Ranjbaran M, Ashabi G, Seifi B. Long-term NaHS administration reduces oxidative stress and apoptosis in a rat model of left-side varicocele. *Andrologia*. 2020;52(2):e13496.
28. Mahran YF, Badr AM, Aldosari A, Bin-Zaid R, Alotaibi HN. Carvacrol and Thymol Modulate the Cross-Talk between TNF- α and IGF-1 Signaling in Radiotherapy-Induced Ovarian Failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019:3173745.
29. Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Herschlag A, Feng HL. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010; 151(2):176-80.3.
30. Marmar J.L. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*. 2001;7(5):461-72.
31. Missassi G, Dos Santos Borges C, de Lima Rosa J, Villela E Silva P, da Cunha Martins A Jr, Barbosa F Jr, De Grava Kempinas W. Chrysin Administration Protects against Oxidative Damage in Varicocele-Induced Adult Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:2172981.

44. Walczak-Jedrzejska R, Slowikowska-Hilczer J, Marchlewsk K, Oszukowska E, Kula K. During seminiferous tubule maturation testosterone and synergistic action of FSH with estradiol support germ cell survival while estradiol alone has pro-apoptotic effect. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45 Suppl 1:S59-64.
- reproductive toxicity caused by Bisphenol AF via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. *Reprod Toxicol.* 2023; 121:108456.
43. van der Horst G, Maree L. SpermBlue: a new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotech Histochem.* 2009; 84(6):299-308.