

## Koçlarda spermaya katılan CAPE'in (Kafeik asit fenil ester) dondurma ve çözündürme sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri

### The effects of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) addition on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after frozen-thawed process in ram semen

#### ÖZET

Bu çalışmanın amacı koç sperma sulandırıcısına ilave edilen farklı dozlardaki Kafeik asit fenil ester (CAPE) çözümü sonu spermatolojik parametreler, oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri araştırıldı. Ejakulatlar beş baş Merinos koçtan haftada bir kez suni vajen yardımıyla toplandı ve bu işlem altı kere tekrarlandı. Ejakulatlar ml'de  $150 \times 10^6$  spermatozoon olacak şekilde antioksidan içermeyen (kontrol) ve antioksidan içeren (10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  ve 100  $\mu\text{g/ml}$ ) sulandırıcılar ile dört bölüme ayrıldı. Sulandırılan örnekler 0,25 ml'lik payetlerde 5 °C'de 3 saat ekilibrasyona tabi tutulduktan sonra sıvı azot buharında donduruldu. Subjektif motilite yönünden 50 ve 100  $\mu\text{g/ml}$  içeren grupların, kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı ( $P < 0.05$ ) gözlemlendi. Ayrıca orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100  $\mu\text{g/ml}$  içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100  $\mu\text{g/ml}$  içeren gruplardaki azalma önemli ( $P < 0.05$ ) bulundu. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki artış, tail length, tail DNA ve tail moment bakımından kontrol grubuna göre 100  $\mu\text{g/ml}$  CAPE içeren gruptaki azalmalar ve kontrol grubuna göre spermatozoon TAS düzeylerinde 10 ve 100  $\mu\text{g/ml}$  CAPE içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli ( $P < 0.05$ ) bulundu. Sonuç olarak yaptığımız çalışmada koç spermanın saklanması spermaya katılan farklı dozlardaki CAPE'in 100  $\mu\text{g/ml}$  dozu spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, HOST-Eozin test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Gölbaşı Gölü, kondisyon faktörü, sıcaklık, tatlı su midyesi, *Unio terminalis*

#### ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the effects of different doses caffeic acid phenethyl ester (CAPE) adding to extender on some spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage during post-thawed of ram semen. Ejaculates were collected from five Merino rams using an artificial vagina ones a week and this process was repeated six times. Ejaculates were split into four aliquots and diluted to a final concentration of  $150 \times 10^6$  spermatozoa/ml with the base extender containing antioxidant (10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) and no additive (control). All samples were cooled to 4°C and equilibrated for 3 h then were loaded into 0.25 ml straws and frozen using a liqued nitrogen vapour and plunged into liquid nitrogen. In terms of subjective motility, the groups containing 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  were found to be significantly superior ( $P < 0.05$ ) compared to the control group. In addition, in terms of mid-piece anomalies and total abnormal spermatozoon rate, the decrease in the group containing 100  $\mu\text{g/ml}$  compared to the control group and in the groups containing 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  in terms of tail anomalies was found to be significant ( $P < 0.05$ ). The increase in all antioxidant groups in terms of H + / E- ratio compared to the control group, decreases in the group containing 100  $\mu\text{g/ml}$  CAPE compared to the control group in terms of tail length, tail DNA and tail moment, and the spermatozoon TAS levels in the groups containing 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$  CAPE compared to the control group. the increase was statistically significant ( $P < 0.05$ ). In conclusion, in our study, it was observed that the 100  $\mu\text{g/ml}$  dose of CAPE in different doses added to the sperm in the storage of ram semen provided the best protection compared to the control group and other groups in terms of spermatozoon motility, abnormal spermatozoon rate, HOST-Eosin test rate, oxidative stress and DNA damage.

**Keywords:** Condition factor, freshwater mussel, Gölbaşı Lake, temperature, *Unio terminalis*

#### How to cite this article

Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Hazman, Ö. (2021). The effects of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) addition on spermatological parameters, oxidative stress and DNA damage after frozen-thawed process in ram semen. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(3), 270-277. <https://doi.org/10.31797/vetbio.1008995>

#### Research Article

Mustafa Gündoğan<sup>1a</sup>  
Deniz Yeni<sup>1b</sup>  
Fatih Avdatek<sup>1c</sup>  
Ömer Hazman<sup>2d</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University  
Veterinary Faculty  
Reproduction and Artificial  
Insemination Department,  
Afyonkarahisar, Turkey  
<sup>2</sup>Afyon Kocatepe  
University, Faculty of  
Science and Arts,  
Department of Chemistry,  
Biochemistry Division,  
Afyonkarahisar, Turkey

#### ORCID-

<sup>a</sup>[0000-0002-3292-4625](https://orcid.org/0000-0002-3292-4625)

<sup>b</sup>[0000-0002-9105-5677](https://orcid.org/0000-0002-9105-5677)

<sup>c</sup>[0000-0003-2345-8826](https://orcid.org/0000-0003-2345-8826)

<sup>d</sup>[0000-0002-2702-6847](https://orcid.org/0000-0002-2702-6847)

#### Correspondence

Fatih AVDATEK

[favdatek@aku.edu.tr](mailto:favdatek@aku.edu.tr)

#### Article info

Submission: 13-10-2021

Accepted: 13-12-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a  
Creative Commons Attribution

4.0 International License



# GİRİŞ

Koçlarda üreme üzerinde en önemli etkenlerden biri diğer türlerde olduğu gibi, sperma kalitesi ve spermatolojik özellikleridir. Bu parametrelerin tam olarak ortaya koyabilmek için gerek nativ olarak suni tohumlama uygulamasında gerekse dondurularak saklanması çalışmalarında koç spermasını uygun sulandırıcı kompozisyonları ile sulandırılması gerekmektedir. Çünkü günümüzde hala koç spermasının kısa ve uzun süreli saklanması çalışmalarında farklı sulandırıcı kompozisyonları ve yöntemleri kullanılmaktadır.

Sulandırıcı içerisinde kullanılan maddelerin spermatozoonlar üzerine olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için sulandırıcı kompozisyonuna çeşitli şekerler veya antioksidan özelliği bilinen katkı maddeleri ilave edilmektedir. Bu sayede dondurma sırasında normal değerlerden çok daha fazla meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) spermatozoonların fertilizasyon yeteneklerine negatif yönde ciddi etkileri oluşmaktadır. Oksijen, hücreler tarafından oksidatif fosforilasyon yoluyla bir enerji kaynağı olarak kullanılır. Bu süreçte, ATP üretimi, iki H<sub>2</sub>O molekülü oluşturmak için O<sub>2</sub>'ye dört elektron ve dört protonun eklendiği bir reaksiyonla birleştirilir. Ancak bir O<sub>2</sub> molekülü, süperoksit anyonu (O<sub>2</sub> • -) oluşturmak için yalnızca bir elektron kazandığında bu reaktif oksijen türü (ROS), H<sub>2</sub>O oluşturmak için üç elektron ve dört proton daha kazanma eğilimindedir. Bu işlem birkaç reaksiyon içerir ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidroksil radikal (OH •) ve peroksinitrit (ONOO-) gibi diğer ROS üretimiyle sonuçlanır. Kontrollü ROS üretimi önemli bir fizyolojik role sahip olmasına rağmen, hücresel antioksidan savunma tarafından dengelenmeyen yüksek ROS üretimi oksidatif strese neden olur.

Oksidatif stresin kanser, kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi / reperfüzyon hasarı, diabetes mellitus, nörodejeneratif bozukluklar, romatoid artrit ve yaşlanma gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Buna göre antioksidanlar, çeşitli hastalık koşullarında önemli bir koruyucu rol oynayabilir (Reuter vd., 2010). Polifenollerin antioksidan özellikleri geniş çapta kabul edilmektedir. Kafeik asit fenil ester (CAPE), sinamik asidin bir hidroksil türevidir. CAPE, moleküler formülü C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> ve moleküler ağırlığı 284.3 olan difenolik bir bileşiktir. CAPE'nin tam kimyasal adı, (E) -3-(3,4-dihidroksifenil) -2-propionik asit, 2-feniletıl 3- (3,4 dihidroksifenil) -2-propenoattır. CAPE, suda çözünmeyen ancak etanol, metanol, aseton ve DMSO'da serbestçe çözünen beyaz, ince kristal bir tozdur. Tarçın asitlerinde CH<sub>2</sub> = CH-COOH grubunun varlığı, benzoik asit gibi diğer fenolik asitlere kıyasla daha yüksek antioksidan kapasitesi sağlar. Fenolik hidroksillerin metil gibi komşu bir inert grup tarafından sterik engellenmesi, antioksidan aktivitesini arttırmaktadır (Widjaja vd., 2008). Difenolikler, hem serbest radikallerin yayılmasını hem de oluşum reaksiyonlarını inhibe ederek antioksidan görevi görür. Geçiş metalini şelatlama veya başlatma reaksiyonlarında yer alan enzimleri inhibe etme kapasitesine sahiptirler (Russo vd., 2000).

İn vivo deneylerde CAPE için çözücü olarak alkollerin kullanılması, transestrifikasyon yoluyla yeni kafeik asit esterleri üretebildikleri için dikkatli olunmalıdır (Celli vd., 2007). CAPE ilk olarak 1987'de propolisin bir bileşeni olarak tanımlandı (Bankova vd., 1987). CAPE, propolisten farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilebilir veya % 96 ve % 91,2 molar dönüşüm değerine sahip kafeik asit ve fenetil alkollerden yanıt yüzey metodolojisi dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle kimyasal olarak sentezlenebilir (Chen vd., 2011). Propolis özütü, ilginç antioksidan özellikler sergiler Russo vd.

(2000) CAPE içeren propolis ekstraktını, CAPE'den yoksun propolis ile karşılaştırıldığında daha belirgin antioksidan özellikler sergilediğini göstermiştir. Bu, propolisin antioksidan aktivitesinde CAPE'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Russo vd., 2002). CAPE, oksidatif hasara karşı güçlü bir antilipoperoksidatif sitoprotektif ve antijenotoksik potansiyel sergiler (Wang vd., 2010). Yapısal olarak flavonoidlerle ilişkili olarak, CAPE bal arısı propolis ekstraktının biyolojik olarak aktif bileşenidir ve normal hücreler üzerinde zararlı etkileri olmayan yerel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Bileşiğin güçlü antimikrobik, anti-inflamatuar, antineoplastik ve antioksidan etkileri olduğu bilinmektedir (Koltuksuz, vd., 2000). Yağda çözünebilir bir antioksidan olan CAPE, geleneksel tıp gibi birçok iltihaplı ve bulaşıcı hastalıkta kullanılmaktadır. (Tolba, vd., 2013). Bir çalışma oksidatif stresin tedavisinde CAPE'nin iyileştirici etkilerini göstermiştir (Song vd., 2012). CAPE, geniş farmakolojik aktiviteleri, antibakteriyel, antiproliferatif, antiparazitik ve antioksidan etkileri nedeniyle dikkat çeken bir propolis bileşendir (Alday-Provencio vd., 2015). CAPE, serbest oksijen radikallerini azaltarak yararlı etkilerini gösterir ve bu antioksidan enzimlere paralel hareket ederek serbest radikal temizleme enzimlerinin tüketimini önler (Ogeturk vd., 2005). Çalışmamızın amacı koçlarda sperma sulandırıcısına ilave edilen CAPE'in spermatolojik özelliklere, oksidatif strese ve DNA hasarına etkisini ortaya koymakla beraber yapmış olduğumuz literatür taramalarında hakkında yeterli miktarda çalışma olmaması araştırmamızın orijinallliğini göstermektedir.

## MATERYAL VE METOT

### *Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi*

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan 2-3 yaşlı 5 baş Merinos ırkı koç kullanılmıştır. Koçlardan

sperma suni vajen yardımıyla sperma alma esnasında aşım partneri olarak kızgınlığı tespit edilmiş koyun, olmadığı zamanda ise kızgınlık göstermeyen koyunlar kullanıldı. Bir yardımcı tarafından tutulan koyunun üzerine atlayan koçun penisine daha önceden hazırlanmış suni vajen usulüne uygun takılarak sperma alındı. Sezon dışı dönemde düzenli olarak koçlardan haftada iki kez suni vajenle sperma alındı (Evans ve Maxwell, 1987). Aynı ayrı tüplere alınan sperma örnekleri bir tüpte birleştirilerek (pooling) spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra 4 eşit hacme ayrılarak kontrol ve farklı konsantrasyonlarda CAPE (10, 50, 100 µg/ml) içeren sulandırıcılarla sulandırıldıktan sonra kryoprotektan olarak % 5 gliserol içeren sulandırıcı ile son sulandırma yapılacaktır. Tris stok solüsyonu için: Trisma base 3,63 g Sitrik asit 1,99 g Fruktoz 0,5 g Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak tris-sitrik asit-fruktoz solüsyonu hazırlandı. (Evans ve Maxwell, 1987) Gliserolizasyon sonrası spermalar 5°C'de 3 saat ekilibrasyondan sonra 5°C'de bulunan spermalar 0.25 ml'lik payetlere çekilip -110°C'de 15 dk. içerisinde donmaları sağlandı. İdentifikasyon amaçlı farklı renklerdeki payetler invitro değerlendirmelere kadar sıvı azot içerisinde (-196 °C) depolandı. Dondurulmuş spermalardan her grup için 6 adet olmak üzere 4 sulandırıcı için toplam 24 payet 37°C'lik su banyosunda 30 saniyede çözdürüldükten sonra spermatolojik parametreler, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı ise Comet assay yöntemiyle değerlendirildi.

### *Spermatozoa Motilitesi*

Faz-kontrast mikroskopun 37°C'ye ayarlanmış ısıtma tablasına bir lam yerleştirildi. Lam üzerine izotonik solüsyonu ile toplu iğne başı büyüklüğünde sperma konularak sulandırılmış olan bu sperma üzerine lamel kapatıldı. Mikroskopun 100x objektifi ile görüntü bulunduktan sonra 200x ve 400x büyütmede muayene edildi. Motilitenin belirlenmesine yönelik olarak, en az üç mikroskop alanında değerlendirme yapılarak ve bir yönde düzgün

doğrusal hareket eden spermatozoonların aynı alandaki tüm spermatozoonlara yüzde (%) oranı şeklinde motilite tespit edilerek kaydedildi (Hafez, 1987).

### **Anormal Spermatozoa Oranı**

Sperma numunelerinde anormal spermatozoa oranı sıvı fizyasyon yöntemi ile belirlendi (Schafer ve Holzmann, 2000).

### **Hipo-ozmotik Eosin Boyama Test (HE-test)**

Sperma numunelerinde ölü-canlı spermatozoa oranını ve hipo-ozmotik şişme testinin birlikte uygulandığı HE test kullanıldı. Ependorf tüpler içerisine su banyosunda 37°C'teki 100 mOsm'luk HOST solüsyonundan 1 ml alındı üzerine sperma numunesinden 10 µl eklendi daha sonra eosin boyası ilave edilip karışım 37°C'lik su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakılıp membranı sağlam ve canlı spermatozoonlar açısından değerlendirildi (Gündoğan vd., 2010).

### **DNA Hasarının Tespiti**

Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) yöntemi kullanıldı. Comet assay olarak da adlandırılan bu yöntemde alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göçleri prensibine göre değerlendirme yapıldı (Avdatek vd., 2018).

### **Total Oksidan Seviyesi (TOS)**

Ölçüm Erel'in (2004) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 3-4 dakika sonra spektrofotometrede end-point okuma yapılarak gerçekleştirildi.

### **Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)**

Ölçüm Erel'in (2005) geliştirdiği metoda göre, numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 5 dakika sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi.

### **İstatistiksel Analiz**

Önemlilik testlerinden önce, tüm değişkenler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilks ve Skewness test ile varyansların homojenliği yönünden ise Levene's testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile, gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testinden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. P<0,05 düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi.

## **BULGULAR**

Subjektif motilite ve anormal spermatozoon ile ilgili elde edilen bulgular Tablo 1'de verildi. Subjektif motilite yönünden 50 ve 100 µg/ml içeren grupların, kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı (P<0.05) gözlemlendi. Ayrıca orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100 µg/ml içeren gruplardaki azalma önemli (P<0.05) bulunmuştur. HE-test sonucunda elde edilen veriler Tablo 2'de verildi. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki artış, H-/E- oranı yönünden kontrol grubuna göre 50 ve 100 µg/ml içeren gruplardaki artış ve H+/E+ oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml içeren gruptaki azalış ile beraber H-/E+ oranına göre kontrol grubuna göre tüm gruplardaki azalmanın önemli (P<0.05) olduğu belirlendi. DNA hasarı yönünden elde edilen bulgular Tablo 3'de sunuldu. Tail length, tail DNA ve tail moment açısından kontrol grubuna göre 100 µg/ml CAPE içeren gruptaki azalmalar istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu. Oksidatif stres parametrelerine ait bulgular Tablo 4'de verildi. Spermatozoon TAS düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre 10 ve 100 µg/ml CAPE



## The effects of CAPE (caffeic acid phenethyl ester)

içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli ( $P < 0.05$ ) bulundu.

**Tablo 1.** Çözüm sonrası spermatolojik parametreler ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6).

Gruplar	Motilite (%)	Baş (%)	Orta Kısım (%)	Kuyruk (%)	Toplam (%)
<b>Kontrol</b>	44,16±3,00 <sup>c</sup>	4,13±0,09 <sup>c</sup>	2,91±0,09 <sup>c</sup>	12,78±0,54 <sup>a</sup>	19,80±0,62 <sup>b</sup>
<b>10 µg/ml</b>	46,66±2,10 <sup>bc</sup>	4,83±0,11 <sup>a</sup>	4,31±0,16 <sup>a</sup>	13,95±0,47 <sup>a</sup>	23,10±0,49 <sup>a</sup>
<b>50 µg/ml</b>	51,66±1,66 <sup>ab</sup>	4,45±0,10 <sup>b</sup>	3,61±0,09 <sup>b</sup>	11,30±0,59 <sup>b</sup>	19,36±0,65 <sup>b</sup>
<b>100 µg/ml</b>	55,83±2,00 <sup>a</sup>	4,10±0,06 <sup>c</sup>	2,33±0,16 <sup>d</sup>	6,81±0,28 <sup>c</sup>	13,28±0,45 <sup>c</sup>

a-d: Herbir sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ).

**Tablo 2.** Çözüm sonrası HE-test parametreleri ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6).

Gruplar	H+/E- (%)	H-/E- (%)	H+/E+ (%)	H-/E+ (%)
<b>Kontrol</b>	22,66±0,33 <sup>d</sup>	18,16±0,60 <sup>c</sup>	28,50±0,67 <sup>b</sup>	30,66±1,08 <sup>a</sup>
<b>10 µg/ml</b>	26,16±0,40 <sup>c</sup>	19,33±0,33 <sup>bc</sup>	32,00±0,36 <sup>a</sup>	22,33±0,42 <sup>b</sup>
<b>50 µg/ml</b>	30,83±0,70 <sup>b</sup>	19,83±0,47 <sup>b</sup>	31,00±1,21 <sup>a</sup>	18,33±1,17 <sup>c</sup>
<b>100 µg/ml</b>	32,33±0,49 <sup>a</sup>	24,00±0,36 <sup>a</sup>	26,00±0,25 <sup>c</sup>	17,83±0,47 <sup>c</sup>

a-d: Aynı sütun içerisinde farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî olarak önemlidir ( $P < 0,05$ ).

**Tablo 3.** Çözüm sonrası DNA Hasarları ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6).

Gruplar	Tail Length (µm/s)	Tail DNA (%)	Tail Moment (µm/s)
<b>Kontrol</b>	21,27±0,50 <sup>b</sup>	63,91±1,08 <sup>b</sup>	16,25±0,18 <sup>b</sup>
<b>10 µg/ml</b>	31,05±0,52 <sup>a</sup>	67,90±0,92 <sup>a</sup>	23,28±0,40 <sup>a</sup>
<b>50 µg/ml</b>	31,39±0,45 <sup>a</sup>	69,85±1,02 <sup>a</sup>	23,88±0,70 <sup>a</sup>
<b>100 µg/ml</b>	17,93±0,26 <sup>c</sup>	38,94±0,65 <sup>c</sup>	13,34±0,56 <sup>c</sup>

a-c: Sütun içerisinde farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ).

**Tablo 4.** Dondurma-çözdürme sonrası oksidatif stres parametreleri ( $\bar{X} \pm SEM$ , n:6).

Gruplar	TAS (mmolTrolox Equiv./L)	TOS (µmol hidrojenperoksit-Equiv./L)
<b>Kontrol</b>	2,66±0,84 <sup>c</sup>	27,72±0,35 <sup>ab</sup>
<b>10 µg/ml</b>	3,09±0,07 <sup>b</sup>	28,16±1,84 <sup>ab</sup>
<b>50 µg/ml</b>	2,55±0,10 <sup>c</sup>	29,08±0,41 <sup>a</sup>
<b>100 µg/ml</b>	4,47±0,15 <sup>a</sup>	25,75±0,49 <sup>b</sup>

a-c: Herbir sütundaki farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistikî açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ).

## TARTIŞMA

Dondurulmuş-çözdürülmüş spermada azalan antioksidan kapasite ve artan reaktif oksijen radikal oluşumu, spermatolojik özellikleri ve fertilitiyi olumsuz olarak etkiler. Dondurulmuş-çözdürülmüş sperma, taze spermaya göre peroksidasyona daha duyarlıdır. Son zamanlardaki araştırmalar spermanın saklanması sırasında infertiliteye yol açan en önemli sebep olarak spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonunu göstermektedir. Bu nedenle koç spermasının dondurulmasında, çözdürme

sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünüldüğünden,

sperma sulandırıcılarına antioksidan maddeler katılmaktadır. Çalışmamızda subjektif motilite yönünden 50 ve 100 µg/ml içeren grupların, kontrol grubuna göre belirgin bir üstünlük sağladığı (P<0.05) gözlemlendi. Ayrıca orta kısım anomalileri ile toplam anormal spermatozoon oranı bakımından kontrol grubuna göre 100 µg/ml CAPE içeren gruptaki ve kuyruk kısmındaki anomaliler açısından 50 ve 100 µg/ml CAPE içeren gruplardaki azalma önemli (P<0.05) bulunmuştur. H+/E- oranı açısından kontrol grubuna göre tüm antioksidan gruplarındaki artış önemli (P<0,05) olduğu belirlendi. Tail lenght, tail DNA ve tail moment açısından kontrol grubuna göre 100 µg/ml CAPE içeren gruptaki azalmalar istatistikî olarak önemli (P<0.05) bulundu. Spermatozoon TAS düzeyleri bakımından kontrol grubuna göre 10 ve 100 µg/ml CAPE içeren gruplardaki artış istatistikî olarak önemli (P<0,05) bulundu.

Soleimanzadeh vd. (2020), tarafından mandalarda yapılan bir çalışmada sperma sulandırıcısına ilave edilen 100 µM Kafeik Asit ilavesinin çözüm sonu spermatozoon motilitesi, oksidatif stres parametreleri ile DNA hasarı üzerine olumlu katkı sağladığını ortaya koymuşlardır. Namula vd. (2018), tarafından yapılan bir çalışmada, domuz spermasının dondurulması sırasında sperma sulandırıcısına 100 µM Kafeik Asit eklenmesinin motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü dahil olmak üzere bazı spermatolojik parametreleri iyileştirdiği bildirilmiştir. Ayla vd. (2018), motilitesi ve morfolojisi bozuk insan spermatozoon örneklerini farklı konsantrasyonlarda CAPE ile 36 °C'de 2 saat inkübasyona tabii tutup daha sonra seminal plazma MDA seviyesi ile spermatozoon DNA'sını değerlendirdikleri çalışmalarında CAPE ile ön inkübasyonunun oksidatif stres ve DNA hasarına karşı koruma sağladığını bildirmektedirler. Okutan vd. (2005), diyabet oluşturarak ratlarda yaptıkları çalışmalarında, diabetes mellitus'un kalp dokusunda oksidatif stresi arttırdığını ve CAPE'nin antioksidan

özelliği sayesinde oksidatif stresi iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mercantepe vd. (2018), ratları sispilatin toksisitesine maruz bıraktıkları ve koruyucu etkilerinden yaralanmak için farklı antioksidanlar kullandıkları çalışmalarında intraperitoneal 10 µmol/kg/gün CAPE verdikleri grubun testis dokusu üzerinde meydana gelen hasarı geri çevirdiğini bildirmektedirler. Erboğa vd. (2016), ratlarda kadmiyum toksisitesi oluşturdukları çalışmalarında 30 gün boyunca 10 µmol/kg/gün dozunda CAPE verilen grubun kadmiyumun neden olduğu testis hasarı, apoptoz ve oksidatif strese karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirmektedirler. Abdallah vd. (2012), ratlarda bir pestisid olan cyhalothrin vererek üreme organları ve fertilité üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında CAPE'in cyhalothrin kaynaklı oluşan oksidatif stresi ve testis toksisitesini azalttığını ortaya koymuşlardır. Özyurt vd. (2006), sigara dumanına 60 gün boyunca maruz bıraktığı ratlarda periton içi CAPE uygulanmış ve testiküler NO, SOD, GSH-Px, katalaz ve MDA çalışılmıştır. Sigara içen grupta CAT ve SOD aktivitelerinin anlamlı olarak yüksek ve GSH-Px aktivitesinin anlamlı olarak düşük olduğu, CAPE uygulanan grupta ise bu etkilerin normalize edildiği görülmüş. Sigara içen grupta testis dokusundaki artmış MDA ve NO seviyeleri CAPE uygulamasıyla tersine çevrilerek, CAPE'nin sigaraya bağlı hasar üzerindeki koruyucu rolünü belirlemişlerdir. Armağan vd. (2008), ratların testislerinde kemoterapötik ajan olan Metotreksat (MTX), uygulamasıyla ROS üretiminde ve oksidatif streste herhangi bir değişiklik olup olmadığını ve CAPE tedavisinin bu anormal durumu durdurup durdurmadığını araştırdıkları çalışmalarında ortalama vücut ve testis ağırlığı, antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyon parametreleri değerlendirilmişler. Lipid peroksidasyon seviyesi ve SOD aktiviteleri MTX grubunda anlamlı olarak daha yüksek iken CAPE uygulamasından sonra bunların azaldığını belirlemişler. Sonuç

olarak, MTX tedavisi ile CAPE uygulamasının testislerde MTX kaynaklı oksidatif hasar üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlar. Huyut vd. (2020), kemoterapötik bir ajan olan doxorubicin (DOX) ile ratlarda testis hasarı oluşturarak curcuminin ve CAPE'in koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında her iki antioksidanın da oksidatif stresi azaltarak testislerde meydana toksisiteyi azalttığını belirlemişlerdir. Yılmaz vd. (2008), ratlara radyografik kontrast madde uygulayarak testislerinde oksidatif stres kaynaklı toksisite oluşturdukları çalışmalarında antioksidan özelliklerinden yararlanmak amacıyla erdostin ve CAPE tedavisi uygulamışlar CAPE'in erdostine göre oksidatif hasarı ve dolayısıyla testis toksisitesini baskıladığını bildirmektedirler. Ceylan vd. (2020), ratlarda propolisin etken maddelerinden olan CAPE'in sisplatin'e bağlı testis hasarını ortadan kaldırmadaki koruyucu etkisinin araştırdıkları çalışmalarında CAPE uygulanan grubun diğer gruplara göre oksidatif stresi ve spermatozoon DNA hasarını azaltarak CAPE'in koruyucu ve düzeltici bir etkisi olduğunu bildirmektedirler. Yaptığımız literatür taramalarında koç spermasının uzun süre saklanmasında sulandırıcıya antioksidan özelliğinden yararlanmak amacıyla ilave edilen bal arısı propolis ekstraktının biyolojik olarak aktif bileşeni olan CAPE'in çalışıldığı herhangi bir literatüre rastlanmadı.

Çözüm sonrası spermatolojik parametreler, oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarında elde edilen veriler yukarıda bahsedilen bazı çalışmalar ile paralellik gösterirken bazı çalışmalar ile de farklılıklar göstermektedir. Gözlenen bu farklılıklar ırk, sperma alma metodu gibi faktörlerin yanı sıra dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktarı ve oranları, özellikle sperma sulandırıcısına katılan antioksidanın farklı konsantrasyonda olması ve spermanın değerlendirilmesinde kullanılan teknikler gibi faktörlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada koç spermanın dondurularak saklanmasında spermaya katılan farklı dozlardaki CAPE'in 100 µg/ml grubunun spermatozoon motilite, anormal spermatozoon oranı, H-E test oranı, oksidatif stres ve DNA hasarı yönünden kontrol grubu ve diğer gruplara göre en iyi korumayı sağladığı görüldü. Ayrıca yapılacak araştırmalarda in-vitro muayene parametrelerinin in-vitro/vivo fertilitate parametreleri ile de desteklenmesinin uygun olacağı kanaatine varıldı.

## AÇIKLAMALAR

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi tarafından 18. KARIYER.133 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Etik onay:** Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel etik Kurulu tarafından 13.03.2018 tarihli toplantıda (AKÜHADYEK) -35-18 referans numaralı kararı ile onaylanmıştır.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur. Yazarlar, bildirilen araştırmanın tarafsızlığına zarar verecek şekilde algılanabilecek herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Fetoui, H, Zribi, N., Fakhfakh, F, Keskes, L. (2012).** Protective role of caffeic acid on lambda cyhalothrin-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Toxicol Ind Health*, 28, 639-47.
- Alday-Provencio, S., Diaz, G., Rascon, L., Quintero, J., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Astiazaran, H., Hernandez, J., Velazquez, C. (2015).** Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of Giardia lamblia trophozoites. *Planta Med*, 81 (9), 742-747.
- Armagan, A., Uzar, E., Uz, E., Yılmaz, H.R., Kutluhan, S., Koyuncuoglu, H.R., Soyupek, S., Cam, H., Serel, T.A. (2008).** Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol*, 27, 547-52.
- Avdatek, F., Yeni, D., İnanç, M.E., et al. (2018).** Supplementation of quercetin for advanced DNA integrity in bull semen cryopreservation. *Andrologia*, 50:e12975.

- Ayla, Ş., Tunalı, G., Bilgiç, B.E., Sofuoğlu, K., Özdemir, A.A., Tanrıverdi, G., Özdemir, S., Soner, B.C., Öztürk, B., Karahüseyinoğlu, S., Aslan, E.G., Seçkin I. (2018). Antioxidant activity of CAPE (caffeic acid phenethyl ester) in vitro can protect human sperm deoxyribonucleic acid from oxidative damage. *Acta Histochemica*, 120(2), 117-121.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Marekov, N., (1987). A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z Naturforsch*, 42, 147-151.
- Celli, N., Dragani, L.K., Murzilli, S., Pagliani, T., Poggi, A., (2007). In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. *J Agric Food Chem*, 55, 3398–3407.
- Ceylan, T., Kaymak, E., Cantürk, F., Yakan, B. (2020). Research on the protective effect of caffeic acid phenethyl ester on testicular damage caused by cisplatin. *Turk J Med Sci*. 50, 2032-2039.
- Chen, H.C., Chen, J.H., Chang, C., Shieh, C.J. (2011). Optimization of ultrasound accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrason Sonochem*, 18, 455–459.
- Erboga, M., Kanter, M., Aktas, C., Donmez, Y.B., Erboga, Z.F., Aktas, E., Gurel A. (2016). Anti-Apoptotic and Anti-Oxidant Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res*, 171, 176–184.
- Erel, Ö. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, 37(2), 112-119.
- Erel, Ö. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38(12), 1103-1111.
- Gündoğan, M., Yeni, D., Avdatek, F., Fidan, A.F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci*, 122, 200-207.
- Hafez E.S.E. (1987). Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. Editor: HAFEZ ESE. *Reproduction in Farm animals*, 5th edition Lea-Febriger, Philadelphia, page 571-600.
- Huyut, Z., Alp, H.H., Yaman, T., Keleş, Ö.F., Yener, Z., Türkan, F., Ayengin, K. (2020). Comparison of the protective effects of curcumin and caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced testicular toxicity. *Andrologia*, 00:e13919.
- Koltuksuz, U., Irmak, M.K., Karaman, A., Uz, E., Var, A., Ozyurt, H., Akyol, O., (2000). Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol. Res*, 28 (6), 360–363.
- Mercantep, T., Unal, D., Tümkaya, L., Yazıcı, Z.A. (2018). Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Exp Ther Med*, 15(4), 3404-3412.
- Namula, M., Hirata, M., Wittayararat, F., Tanihara, N., Thi Nguyen, T., Hirano, M., Nii, T. (2018). Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm. *Reprod. Domest. Anim*. 53, 1600–1604.
- Ogeturk, M., Kus, I., Colakoglu, N., Zararsiz, I., Ilhan, N., Sarsilmaz, M. (2005). Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J. Ethnopharmacol*. 97 (2), 273–280.
- Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H.R., Uz, E. (2005). Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, 38, 191–196.
- Ozyurt, H., Pekmez, H., Parlaktas, B.S., Kus, I., Ozyurt, B., Sarsilmaz, M. (2006). Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J Androl*, 8, 189-93.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal. B.B., (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49, 1603-1616.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, 16, 91-98.
- Russo, A., Longo, R., Vanella, A., (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73(1), S21-29.
- Schafer, S., Holzmänn, A. (2000). The use of transmigrator and Spermac<sup>TM</sup> stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*. 59, 201-211.
- Soleimanzadeh, A., Talavi, N., Yourdshahi, V.S., Bucak, M.N. (2020). Caffeic acid improves microscopic sperm parameters and antioxidant status of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen following freeze-thawing process. *Cryobiology*. 95, 29-35.
- Song, J.J., Lim, H.W., Kim, K., Kim, K.M., Cho, S., Chae, S.W. (2012). Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 76 (5), 675–679.
- Tolba, M.F., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Rahman, S.Z., Abdel-Naim, A.B. (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life*, 65 (8), 699–709.
- Wang X., Stavchansky S., Kerwin S. M., Bowman P. D., (2010). Structure-activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities. *Eur J Pharmacol*, 635, 16-22.
- Widjaja A, Yeh TH, Ju YH, (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *J Chin Inst Chem Eng*, 39, 413-418.
- Yılmaz, H.R., Uz, E., Yeşildağ, A., Özden, A., Sırmalı, R., Ağackiran, Y., Vural, H. (2008). Effects of caffeic acid phenethyl ester and erdosteine on radiocontrast media-induced oxidative stress and histopathological changes in rat testicular tissue. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 1(2), 78-83.