



Sıçanlarda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Testis Hasarına Karşı Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkileri: Histolojik Çalışma

Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester Against Carbon Tetrachloride-induced Testicular Damage in Rats: A Histological Study

Belemir GÜLHAN¹, Elif TAŞLIDERE², Nigar VARDI², Aslı TAŞLIDERE², Hülya ELBE³

¹Samsun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

²İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

³Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye

ÖZ

Amaç: Karbon tetraklorür (CCl₄) birçok dokuda hasara yol açabilen, uçucu organik bir kimyasal ajandır. Yapıca flavonoidlere benzeyen kafeik asit fenetil ester (CAPE), bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir. CAPE'nin antitoksik, antioksidan, anti-enflamatuvar etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada CCl₄'ün neden olduğu testis hasarına karşı CAPE'in etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Yirmi sekiz adet Wistar-albino sıçan 4 gruba ayrıldı (n=7). Grup 1: Kontrol (%5 etanol, 1 mL/gün/ip), Grup 2: Zeytinyağı (0,5 mL/gün aşırı/ip), Grup 3: CCl₄ (0,5 mL/kg gün aşırı/ip), Grup 4: CCl₄+CAPE (10 µmol/kg/gün/ip). Deney sonunda alınan doku örnekleri %10'luk formaldehitte tespit edilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı. Testiküler hasarı değerlendirmek için ışık mikroskopunda her kesitten x20 büyütmede rastgele 100 tübül incelenerek sağlam, atrofik ve dejenere tübüller olarak sınıflandırıldı. Kesitler, Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd. Cambridge, UK) kullanılarak incelendi.

Bulgular: Kontrol ve zeytinyağı gruplarına ait testis kesitleri normal histolojik görünümdeydi. CCl₄ grubunda seminifer tubullerin %55,00±4,22'si sağlam, %25,00±2,67'si atrofik ve %20,00±1,88'i dejeneratif olarak gözlemlendi. Ayrıca, bazı seminer tübüllerin lümeninde multinükleer dev hücrelere rastlandı. CCl₄+CAPE grubunda ise tübüllerin %72,14±3,91'i sağlam, %16,42±2,10'u atrofik ve %11,42±2,36'sı dejeneratifti. CCl₄ grubunda etkilenen tübüllerin sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken (p<0,05), CCl₄+CAPE grubunda etkilenen seminifer tübüllerin sayısının, CCl₄ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (p<0,05).

Sonuç: CAPE'nin, CCl₄'ün testis üzerindeki hasar verici etkilerinin azaltılmasında faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: CAPE, karbon tetraklorür, sıçan, testis

ABSTRACT

Aim: Carbon tetrachloride (CCl₄) is a volatile organic chemical agent that can cause damage to many tissues. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), which is structurally similar to flavonoids, is an active component of honeybee propolis. CAPE is known for its antitoxic, antioxidant, and anti-inflammatory effects. In this study, we aimed to investigate the effects of CAPE against testicular damage caused by CCl₄.

Materials and Methods: Twenty-eight Wistar albino rats were divided into 4 groups (n=7) as, Group 1: control (5% ethanol, 1 mL/day/ip), Group 2: olive oil (0.5 mL/day over/ip), Group 3: CCl₄ (0.5 mL/kg over/ip), Group 4: CCl₄+CAPE (10 µmol/kg/day/ip). Tissue samples collected at the end of the experiment were detected in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Five-micron-thick sections taken from paraffin blocks were stained with hematoxylin-eosin. To evaluate testicular damage, 100 tubules from each section were randomly examined at 20x magnification under a light microscope and classified as intact, atrophic, and degenerated tubules. Sections were examined by using Leica DFC 280 light microscope and Leica Q Win Image Analysis system (Leica Micros Imaging Solutions Ltd. Cambridge, UK).

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Elif TAŞLIDERE, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

Tel.: +90 505 668 04 94 **E-posta:** eliftaslidere@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-1723-2556

Geliş tarihi/Received: 06.12.2022 **Kabul tarihi/Accepted:** 10.01.2023

Results: The testicular sections of the control group and the olive oil group had a normal histological appearance. In the CCl₄ group, 55.00±4.22% of the seminiferous tubules were intact, 25.00±2.67% were atrophic and 20.00±1.88% were degenerative. In addition, multinucleated giant cells were found in the lumen of some seminiferous tubules. In the CCl₄+CAPE group, 72.14±3.91% of the tubules were intact, 16.42±2.10% were atrophic, and 11.42±2.36% were degenerative. While the number of affected tubules significantly increased in the CCl₄ group compared to the control group (p<0.05), the number of affected seminiferous tubules decreased significantly in the CCl₄+CAPE group compared to the CCl₄ group (p<0.05).

Conclusion: We think that CAPE may be useful in reducing the damaging effects of CCl₄ on the testicle.

Keywords: CAPE, carbon tetrachloride, rat, testis

GİRİŞ

Ksenobiyotik olan karbon tetraklorür (CCl₄) tatlı bir kokuya sahip renksiz bir sıvıdır¹. Yüksek oranda toksik bir madde olarak insan ve hayvanlarda potansiyel kanserojenik bir etkiye sahip olan CCl₄, günümüzde endüstride soğutucu floroklorokarbonların üretiminde dolayısıyla, klima ve soğuk hava deposu makinalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. CCl₄'ün başta karaciğer olmak üzere böbrek, kalp, akciğer, beyin ve testis dokularında toksik etkileri bulunmaktadır^{2,3}. CCl₄'ün spermatogenik seri hücrelerinde hasar, bazal membran ayrılması, seminifer tübül atrofi, interstisyel alanda genişleme ve sperm sayısında azalma meydana getirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{4,5}.

Yapıca flavonoidlere benzeyen kafeik asit fenetil ester "caffeic acid phenethyl ester" (CAPE), bal arısı propolisinin aktif bir bileşenidir⁶. CAPE'nin antitoksik, antioksidan, anti-enflamatuvar, antiviral, immünomodülatör, nöroprotektif ve sitostatik etkileri olduğu bilinmektedir^{7,8}. Diğer propolis bileşenlerine göre araşidonik asit kaskadını güçlü şekilde modüle ettiğinden anti-enflamatuvar etkisi daha belirgindir⁶. Genellikle 10 µmol/L konsantrasyonda ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi tarafından meydana getirilen reaktif oksijen türlerinin hepsini bloke ettiği gösterilmiştir⁹.

Bu çalışmada, CCl₄ ile testiküler hasar oluşturulan sıçanların testis dokusundaki histolojik değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine CAPE'nin iyileştirici etkilerinin histokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları

Çalışmamızda kullanılan 200-250 g olan 3 aylık 28 adet Wistar albino erkek sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmamız için İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (protokol no: 2012/A-49, tarih: 21.03.2012). Sıçanlar oda sıcaklığı 24-27 °C arasında, havalandırma şartları sağlanmış, aydınlatılması 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan odalarda barındırıldı. Sıçanlar çalışma boyunca *ad libitum* standart pellet yemle beslendi. Rastgele seçilen denekler 4 farklı gruba ayrıldı.

Deney Grupları

Grup 1: Kontrol, Grup 2: Zeytinyağı, Grup 3: CCl₄, Grup 4: CCl₄+CAPE.

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara 10 gün süreyle, 1 mL/gün %5 etanol intraperitoneal olarak uygulandı.

2. Zeytinyağı grubu: Bu gruptaki sıçanlara 10 gün süreyle 0,5 mL/gün aşırı zeytinyağı intraperitoneal olarak uygulandı.

3. CCl₄ grubu: Bu gruptaki sıçanlara 10 gün süreyle 0,5 mL/kg gün aşırı CCl₄ intraperitoneal yolla uygulandı.

4. CCl₄+CAPE grubu: Bu gruptaki sıçanlara 10 gün süreyle zeytinyağında çözülerek hazırlanan 0,5 mL/kg gün aşırı CCl₄ ve ardından 10 µmol/kg CAPE etanolde çözülerek intraperitoneal yolla uygulandı.

Çalışmanın 11. gününde sıçanlara 5 mg/kg xylazine ile 50 mg/kg ketamin i.p uygulanarak genel anestezi altında orta hat insizyonu ile batinları açıldı. Histolojik incelemeler için testis doku örnekleri alındı.

Histolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme için dokuların tespit ve takip işlemlerine geçildi. Dokunun iyi fikse olması için %10'luk formaldehite konuldu. Örnekler, daha sonra 34 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp plastik doku takip kasetlerine konularak formaldehite 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Daha sonra dereceli alkollerde dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM2145 marka mikrotom yardımıyla 5'er mikron'luk kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen ve eozin, boyama yöntemi uygulandı. Testiküler hasarı değerlendirmek için ışık mikroskopunda her kesitten x20 büyütmede rastgele 100 tübül incelenerek sağlam, atrofik ve dejenere tübüller olarak sınıflandırıldı. Kesitler, Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz sistemi (Leica Micros Imaging Solutions Ltd. Cambridge, UK) kullanılarak incelendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programı (SPSS for Windows version 13) ve MedCalc

(2007, Belçika) istatistiksel yazılım programları ile yapıldı. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. Tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin Shapiro-Wilk normallik testine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p>0,05$). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanılırken grupların ikili karşılaştırılmasında ise Conover testi kullanıldı. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol ve zeytinyağı gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde seminifer tübüller normal histolojik görünümdeydi. Tübüller belirgin bir bazal lamina üzerine oturmuş seminifer epitelden oluşmaktaydı. Seminifer epitelindeki Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri belirgin olarak ayırt edilmekteydi. Spermatogonyumlar yuvarlak ve oval şekilleriyle bazal membranın hemen üzerinde yer alırken spermatidler lümende izlendi (Şekil 1A, 1B).

CCl_4 grubunda bazı tübüllerde eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde izlenen dejenere hücrelere rastlandı (Şekil 1C). Ayrıca, bazı seminer tübüllerin lümeninde multinükleer dev hücreler izlendi (Şekil 1D). Bu grupta seminifer tübüllerin $55,00 \pm 4,22$ 'si sağlam, $25,00 \pm 2,67$ 'si atrofik ve $20,00 \pm 1,88$ 'i dejeneratif olarak gözlemlendi. CCl_4 +CAPE grubunda ise tübüllerin $72,14 \pm 3,91$ 'i sağlam, $16,42 \pm 2,10$ 'u atrofik ve $11,42 \pm 2,36$ 'sı dejeneratifti (Şekil 1E, 1F). CCl_4 grubunda etkilenen tübüllerin sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken ($p<0,05$), CCl_4 +CAPE grubunda etkilenen seminifer tübüllerin sayısının, CCl_4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 1).

TARTIŞMA

Çevresel ve/veya mesleki toksik maddelere maruz kalınması, sperm kalitesinin düşüşünden sorumlu ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir¹⁰. Toksik maddelerin çevremizde kalıcılığı ve

genel sağlık başta olmak üzere üreme sağlığı üzerinde gözlenen tüm etkileri onu bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir.

CCl_4 , hava, su ve toprağa toksik emisyon yoluyla salındıktan sonra insanlarda ve hayvanlarda hızla emilen renksiz, uçucu ve toksik endüstriyel bir maddedir. CCl_4 'ün deney hayvanlarında karaciğer³, akciğer¹¹, böbrek¹²⁻¹⁴ ve testis¹⁵ hasarlarına neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. CCl_4 uygulamasının erkek sıçanlarda oksidatif toksite oluşturmasıyla üreme sisteminde hasara yol açtığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir^{4,14,16}.

Birçok ilacın ve kimyasal ajanın olumsuz yan etkilerinin sebep olduğu değişiklikler göz önüne alındığında, iyileştirici maddelerin vücudun çeşitli dokuları üzerindeki olası etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Propolis bal arıları tarafından ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden toplanan çeşitli yağlar, polenler, özel reçine ve mumsu maddelerin karışımından oluşan; çok kuvvetli anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal etkiye sahip yapışkan bir maddedir¹⁷. CAPE, propolisin aktif bir bileşenidir ve anti-enflamatuvar, anti-mitojenik, anti-kanserojen, anti-oksidan ve immünomodülatör etkiler ile farmakolojik olarak güvenli bir bileşik olduğu gösterilmiştir¹⁸⁻²². Bu çalışma CCl_4 ile oluşturulan testis hasarında, CAPE'nin tedavi edici etkilerinin histolojik olarak değerlendirilmesi amacıyla planlandı.

Deneyssel olarak gerçekleştirilmiş daha önceki araştırmalarda, CCl_4 maruziyetinin erkek üreme sisteminde yapısal ve fonksiyonel hasara yol açtığı bildirilmiştir²³. Ayrıca, daha önce yapılmış olan benzer çalışmalarda, CCl_4 toksisitesine bağlı olarak testis dokusunda histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği ortaya konmuştur²⁴. Türk ve ark.'nın⁵ sıçanlarla yaptığı CCl_4 çalışmasında germinal hücrelerde dejenerasyon, interstisyel alanda ödem ve konjesyon gözledikleri rapor edilmiştir. Benzer şekilde Khan ve Ahmed'in⁴ sıçanlarla yaptığı çalışmada CCl_4 'ün spermatogenik seri hücrelerinde dejenerasyon, bazal membran ayrılması, seminifer tübül atrofisi, interstisyel alanda genişleme izledikleri bildirilmiştir. Horn ve ark.'nın¹⁶ sıçanlarla yaptığı çalışmada CCl_4 uygulanması ile germ hücrelerinde kayıp, germinal epitelde vakuolizasyon, mayozun kesintiye uğraması sonucunda seminifer tübüllerde sadece Sertoli

Tablo 1. Tüm grupların histopatolojik skor değerleri

Gruplar	Sağlam tübül	Atrofik tübül	Dejenere tübül
1. Kontrol (%)	83,57 $\pm$ 2,10	10,71 $\pm$ 0,71	5,71 $\pm$ 1,70
2. Zeytin yağı (%)	80,00 $\pm$ 2,43	10,71 $\pm$ 1,70	9,28 $\pm$ 1,30
3. CCl_4 (%)	55,00 $\pm$ 4,22 ^a	25,00 $\pm$ 2,67 ^a	20,00 $\pm$ 1,88 ^c
4. CCl_4 +CAPE (%)	72,14 $\pm$ 3,91 ^b	16,42 $\pm$ 2,10 ^b	11,42 $\pm$ 2,36 ^d

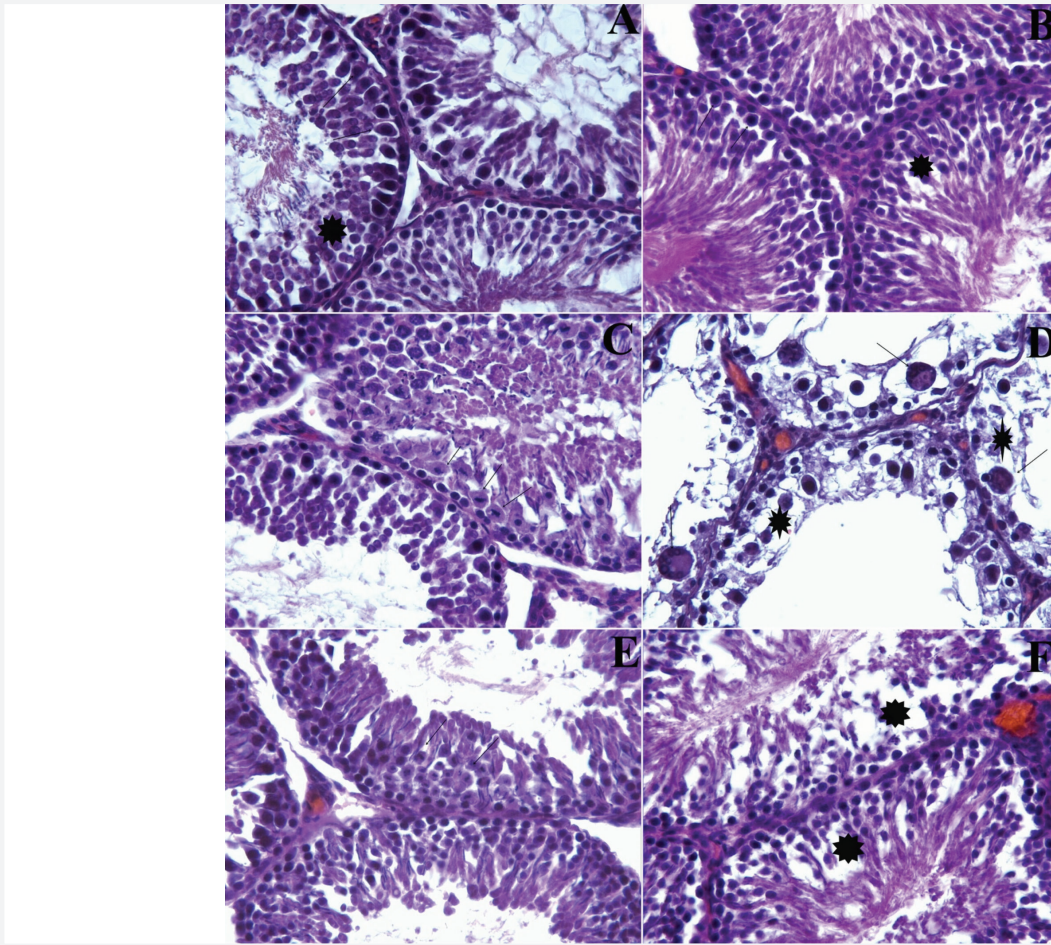
^aKontrol ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0,0008$).

^b CCl_4 ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0,0008$).

^cKontrol ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0,0025$).

^d CCl_4 ile istatistiksel olarak anlamlı fark ($p=0,0025$).

CCl_4 : Karbon tetraklorür, CAPE: Kafeik asit fenetil ester



Şekil 1. Kontrol (A) ve zeytinyağı grubu (B) seminifer tübül epitelinde Sertoli hücrelerinin (oklar) ve spermatojenik hücrelerin (yıldız) görünümü. CCl_4 grubu (C), bölünmenin farklı aşamalarında kalmış spermatositlerin görünümü (oklar). (D) germinal hücre kaybı (yıldız) ve multinükleer dev hücrelerin (oklar) görünümü CCl_4 +CAPE grubu (E) farklı bölünme aşamalarında kalmış spermatositlerin görünümü (oklar) (F) germinal hücre kaybı (yıldız)

CCl_4 : Karbon tetraklorür, CAPE: Kafeik asit fenetil ester

hücreleri gözlediklerini bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda CCl_4 'ün testis üzerinde meydana getirdiği hasarı histopatolojik olarak göstermek için tübüllerini dejenere hücrelerinin varlığına ve atrofi olmalarına göre sınıflandırdık. Çalışmamızda; CCl_4 uygulamasının ardından testis dokusunda atrofik tübüllerin yanı sıra bazı tübüllerde eozinofilik sitoplazmalı, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde izlenen dejenere hücrelere rastladık. Ayrıca, bazı seminer tübüllerin lümeninde multinükleer dev hücrelerin varlığını tespit ettik.

Çalışmamızda CCl_4 verilmesiyle testiste izlenen histolojik hasarın CAPE tedavisiyle azaldığı izlendi. CAPE bu koruyucu etkilere, antioksidan özellikleri sonucu sahiptir. Ancak CAPE'nin antioksidan özelliklerinin kesin mekanizması henüz bilinmemektedir. Ancak CAPE'nin antioksidan enzim genlerinin ve gen ürünlerinin transkripsiyonunu ve/veya translasyonunu etkileyebileceği tahmin edilmektedir²⁵. Ayrıca

CAPE'nin koruyucu etkileri, serbest radikalleri temizleme yeteneği ile birlikte CYP2E1 aktivitesini inhibe ederek CCl_4 'ün biyoaktivasyonunu bloke etme yeteneğinden kaynaklanıyor olabilir²⁶. Atik ve ark.²⁷ tarafından sıçanlarda iskemi/reperfüzyonun neden olduğu testis hasarına karşı CAPE'nin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, CAPE uygulaması ile histopatolojik hasarın etkisinin azaldığı bildirilmiştir. Abdallah ve El-Refaei²⁸ sıçanlara kadmiyum uygulaması ile testiste gözlemledikleri yaygın enflamasyon, nekroz ve hemorajinin, CAPE uygulaması ile hafiflediğini bildirmişlerdir. Biz de çalışmamızda CCl_4 +CAPE grubunda etkilenen seminifer tübüllerin sayısının, CCl_4 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını tespit ettik.

Çalışma Kısıtlılıkları

Çalışmamızın en önemli kısıtlaması, fonksiyonel iyileşme ve biyokimyasal parametrelerle desteklenmemesidir.

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda, CCl₄'e bağlı testis hasarında CAPE'nin olası etkisi araştırılmıştır ve çalışmamızın sonuçlarına göre, CCl₄'ün testisler üzerinde hasara sebep olduğu ve CCl₄ ile birlikte CAPE verilmesi durumunda testislerdeki bu hasarın belli bir ölçüde düzelme sağladığı gösterilmiştir. Bu bulgular eşliğinde testis hasarının tedavisinde CAPE gibi antioksidan ve anti-enflamatuvar özelliği olan ajanların kullanılmasının, olumlu etkileri olabileceğini düşünmekteyiz.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma için İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (protokol no: 2012/A-49, tarih: 21.03.2012).

Hasta Onayı: Hayvanlar üzerinde yapılmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: E.T., Dizayn: E.T., Veri Toplama veya İşleme: B.G., N.V., A.T., H.E., Analiz veya Yorumlama: E.T., Literatür Arama: B.G., Yazan: B.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Frank D, Savir S, Gruenbaum BF, Melamed I, Grinshpun J, Kuts R, et al. Inducing Acute Liver Injury in Rats via Carbon Tetrachloride (CCl₄) Exposure Through an Orogastric Tube. *J Vis Exp*. 2020;28:10.
- Tirkey N, Pilkhwal S, Kuhad A, Chopra K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacol*. 2005;5:2.
- Mahmoodzadeh Y, Mazani M, Rezagholizadeh L. Hepatoprotective effect of methanolic Tanacetum parthenium extract on CCl₄-induced liver damage in rats. *Toxicol Rep*. 2017;4:455-62.
- Khan MR, Ahmed D. Protective effects of *Digera muricata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:1393-9.
- Türk G, Çeribaşı S, Sönmez M, Çiftçi M, Yüce A, Güvenç M, et al. Ameliorating effect of pomegranate juice consumption on carbon tetrachloride-induced sperm damages, lipid peroxidation, and testicular apoptosis. *Toxicol Ind Health*. 2016;32:126-37.
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical Compounds Involved in the Anti-inflammatory Effect of Propolis Extract. *Fitoterapia*. 2002;73(Suppl 1):53-63.
- Castaldo S, Capasso F. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. *Fitoterapia*. 2002;73(Suppl 1):1-6.
- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, Antifungal, Antiamoebic, Antiinflammatory and Antipyretic Studies on Propolis Bee Products. *J Ethnopharmacol*. 1991;35:77-82.
- Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Lipoxygenase Inhibitor with Antioxidant Properties. *FEBS Lett*. 1993;329:21-4.
- Burdorf A, Figà-Talamanca I, Jensen TK, Thulstrup AM. Effects of occupational exposure on the reproductive system: Core evidence and practical implications. *Occup Med (Lond)*. 2006;56:516-20.
- Abraham P, Wilfred G, Cathrine. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta*. 1999;289:177-9.
- Suzuki K, Nakagawa K, Yamamoto T, Miyazawa T, Kimura F, Kamei M, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatic and renal damages in rat: inhibitory effects of cacao polyphenol. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79:1669-75.
- Fadhel ZA, Amran S. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytother Res*. 2002;16(Suppl 1):8-32.
- Manjrekar AP, Jisha V, Bag PP, Adhikary B, Pai MM, Hegde A, et al. Effect of *Phyllanthus niruri* Linn. treatment on liver, kidney and testes CCl₄ induced hepatotoxic rats. *Indian J Exp Biol*. 2008;46:514-20.
- Mazani M, Ojarudi M, Banaei S, Salimnejad R, Latifi M, Azizi H, et al. The protective effect of cinnamon and ginger hydro-alcoholic extract on carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 2020;52:13651.
- Horn MM, Ramos AR, Winkelmann L, Matte US, Goldani HA, Silveira TR. Seminiferous epithelium of rats with food restriction and carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Int Braz J Urol*. 2006;32:94-9.
- Volpert R, Elster EF. Biochemical activity of propolis extracts. II. Photodynamic activities. *Z Naturforsch CJ Biosci*. 1993;48:858-62.
- Orban Z, Mitsiades N, Burke TR Jr, Tsokos M, Chrousos GP. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7:99-105.
- Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship *J Agric Food Chem*. 2002;30;50:468-72.
- Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Harimaya Y, Koizumi K, Saiki I, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester analogues on experimental lung metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:638-41.
- Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002;73(Suppl 1):21-9.
- Song JJ, Lim HW, Kim K, Kim KM, Cho S, Chae SW. Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012;76:675-9.
- Abdou HS, Salah SH, Hoda FB, Rahim A. Effect of pomegranate pretreatment on genotoxicity and hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in male rats. *J Med Plant Res*. 2012;6:3370-80.
- Gülçen B, Kuş MA, Çolakgözü S, Ögetürk M, Kuş İ, Ersoy MA, et al. Deneysel Karbon Tetraklorür Zehirlenmesinde Akciğer Doku Hasarı ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Rolü: Işık Mikroskopik ve Biyokimyasal Bir Çalışma. *Düzce Tıp Dergisi*. 2012;14:37-42.
- Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H, et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol*. 2004;24:27-35.
- Lee KJ, Choi JH, Khanal T, Hwang YP, Chung YC, Jeong HG. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology*. 2008;248:18-24.
- Atik E, Görür S, Kiper AN. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on histopathological changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*. 2006;54:293-7.
- Abdallah EAA, El-Refai MF. Caffeic acid phenethyl ester mitigates infertility: A crucial role of metalloproteinase and angiogenic factor in cadmium-induced testicular damage *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36:22960.