



In Vitro Effects of Fenugreek, Sunflower, Green Cardamom and Seed Extracts on Motility Parameters and Oxidative Stress of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa

Burak Evren İnanan^{1,a,*}, Mahir Kanyılmaz^{2,3,b}

¹Department of Veterinary Science, Eskil Vocational School, Aksaray University, 68800 Aksaray, Turkey

²Mediterranean Fisheries Research, Production and Training Institute, 07192 Antalya, Turkey

³Department of Resource Management and Fisheries Structures, General Directorate of Fisheries and Aquaculture, 06800 Ankara, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 18/09/2019 Accepted : 17/10/2019</p> <p>Keywords: Common carp Sperm motility Oxidative stress Sunflower Green cardamom</p>	<p>The aim of the present study is to assess the effects Fenugreek (<i>Trigonella foenum-graecum</i>, Fabaceae), sunflower (<i>Helianthus annuus</i>, Asteraceae), green cardamom (<i>Elettaria cardamomum</i>, Zingiberaceae) and seed extracts, which they belonged to three different plant families, on common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.) spermatozoa motility parameters and oxidative stress conditions. For this reason, sperm samples treated with seed extracts at the ratios of 0.1%, %0.5, 1%, and 2%, were incubated at 4°C and sampled at 2nd and 48th hours. Among sperm motility parameters, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), straightness STR), linearity (LIN), and wobble (WOB) were determined by computer-assisted sperm analysis (CASA). According to the results, sunflower and green cardamom seed extracts have attenuated motility parameters at all tested concentrations. However, motility parameters measured in %0.5 of fenugreek seed extract were higher than all other groups including the control at 48th hour. Also, TBARS values as an oxidative stress indicator in this group were decreased. 2% of all seed extracts had negative effects on the sperm samples. Particularly, 2% sunflower seed extract caused the higher oxidative stress. These results indicate that fenugreek seed extract is more proper for the maintenance of common carp spermatozoa at 4°C, comparing to those of sunflower and green cardamom.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 8(1): 214-219, 2020

Kakule, Ayçiçeği ve Çemen Otu Tohumları Ekstraktlarının Sazan Balığı (*Cyprinus carpio* L.) Sperm Motilitesine ve Oksidatif Strese In Vitro Etkileri

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 18/09/2019 Kabul : 17/10/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Sazan balığı Sperm motilitesi Oksidatif stres Ayçiçeği Çemen Otu</p>	<p>Bu çalışmanın amacı, üç farklı bitki familyasına ait olan kakule (<i>Trigonella foenum-graecum</i>, Fabaceae), Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i>, Asteraceae) ve çemen otu (<i>Elettaria cardamomum</i>, Zingiberaceae) tohumu ekstraktlarının <i>in vitro</i> koşullar altında, sazan balığı (<i>Cyprinus carpio</i> L.) sperm hücrelerinin motilite parametrelerine ve oksidatif stres durumlarına etkilerini belirlemektir. Bu amaçla, %0,1, %0,5, %1 ve %2 oranlarındaki tohum ekstratları ile muamele edilen sperm örnekleri 4°C'de muhafaza edilerek, 2. ve 48. saatte ölçümleri yapılmıştır. Sperm motilite parametrelerinden kavisli hareket hızı (VCL), ortalama hızı (VAP), ileri doğru doğrusal hareket hızı (VSL), doğruluk (STR), doğrusallık (LIN), sperm başı titreşim hareketi (WOB) tayinleri bilgisayar yardımıyla sperm analizi (CASA) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Ayçiçeği ve çemen otu tohum ekstraktları, test edilen oranların tamamında motilite parametrelerini azaltıcı yönde tesir etmiştir. Buna karşın, 48. saatte %0,5 kakule tohumu ekstraktı kontrol grubu dâhil tüm gruplara kıyasla motilite parametrelerini yükseltmiştir. Ayrıca bu grupta, oksidatif stres göstergesi olarak ölçülen TBARS değerleri azalmıştır. %2 tohum ekstraktlarının tümü negatif olarak sperm örneklerini etkilemiştir. Özellikle, %2 Ayçiçeği tohum ekstratı grubu yüksek oksidatif strese neden olmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, 4°C'de sazan balığı sperm muhafazasında, ayçiçeği ve çemen otuna göre kakule tohum ekstraktının kullanımının daha uygun olduğunu göstermiştir.</p>

^a burakinanan@aksaray.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-2888-8457> | mahirkan@yahoo.com

^c <https://orcid.org/0000-0003-0261-1422>



Giriş

Memeli hayvanların aksine, birçok balık türünde sperm hücreleri testislerde hareketsizdir, sucul ortama salındıklarında hareket etmeye başlarlar, diğer bir ifade ile motilite kazanırlar. Uygun koşullarda alınan sperm örneği, seminal plazma içeriğine benzer solüsyonlarda hareket kazanmadan muhafaza edilebilmektedir. Bu solüsyon ortamının özellikleri, tatlı su balık türlerinde birkaç dakikadan 15-20 dakikaya kadar sürebilen sperm motilite süresini ve diğer parametrelerini etkilemektedir (Alavi ve Cosson, 2005). Sonuçta, sperm hücrelerinin yumurtayı dölleme kabiliyeti azalmakta ve oluşacak yavru oranı azalmaktadır. Saklama solüsyonları, gametlerin kısa ve uzun süreli saklama koşullarının geliştirilmesine katkı sunduğu gibi, gamet biyolojisinin anlaşılmasına da imkân sağlamaktadır. Optimum saklama koşullarının belirlenmesinde, sıcaklık, pH, iyonik bileşim gibi faktörlerin yanında, antioksidan ve antibakteriyel özellikleri barındıran maddelerin eklenmesi de önemli olmaktadır (Ubilla ve Valdebenito, 2011).

Bitki ekstraktlarının, yeme karıştırılarak balıklara verilmesi veya et saklama ortamına eklenmesi yaygınca uygulanmaktadır. Yerfıstığı, şeker portakalı kabuğu, tarçın, sarımsak, çörek otu gibi bitkilerin yağları, sulu ekstraktları veya direk kendileri, balıklarda büyüme artırıcı, kan parametrelerine olumlu etki edici, hastalıklara direnç kazandırıcı, et saklama koşullarını iyileştirici olmaları gibi niteliklere sahip oldukları bildirilmiştir (Dikel, 2015; Kesbiç ve ark., 2015; Acar ve ark., 2015; Öz ve ark., 2017; Öz, 2018; Kesbiç, 2019). Sperm parametreleri de besin kompozisyonundan direk olarak etkilenmektedir (Tizkar ve ark., 2015). Bununla beraber, bu tip ekstraktların gamet kalitesine *in vivo* veya *in vitro* etkisini gösteren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kakule, Ayçiçeği ve çemen otu tohumları, popüler olarak günümüzde geleneksel alternatif ve tamamlayıcı tıpta kullanılmaktadırlar. Her üç bitkinin tohumları, antioksidan özellikleri ile öne çıkmaktadır. Dünya çapında yaygın tarım bitkilerinden olan Ayçiçeği tohumu, içerdiği fenolik bileşikler, yağ asitleri ve vitaminler gibi etken maddeler sebebiyle, antioksidan, antimikrobiyal ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Guo ve ark., 2017). Çemen otu, dünyada en yaygın kültürü yapılan aromatik bitkilerden olup, sindirim sistemi, hipertansiyon ve astım gibi rahatsızlıklara iyi geldiğinden insanlar tarafından tüketilmektedir (Abu-Taweel ve ark., 2018). Kakule ise birçok ülkenin mutfağında baharat olarak kullanılmaktadır. Kakule tohumunun mide ve karaciğer koruyucu özelliği bulunmakta olup, şeker hastalığı ve kolesterol yükselmesinde yararları saptanmıştır. Ayrıca, büyüme ve üreme hormonlarını uyarıcı etkisi olduğu da rapor edilmiştir (Wani ve Kumar, 2018).

Bu çalışmada, üç farklı bitki familyasına ait olan kakule (*Trigonella foenum-graecum*, Fabaceae), Ayçiçeği (*Helianthus annuus*, Asteraceae) ve çemen otu (*Elettaria cardamomum*, Zingiberaceae) tohumlarının ekstraktlarının *in vitro* koşullar altında, sazan balığı (*Cyprinus carpio* L.) sperm hücrelerinin motilite parametrelerine üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, farklı oranlarındaki (%0,1, %0,5, %1 ve %2) tohum ekstraktları ile muamele edilen sperm örnekleri 4°C'de muhafaza edilerek, 2. ve 48. saatte örneklendirilmiştir. Ayrıca örneklendirmede sperm hücrelerindeki, bir oksidatif stres göstergesi olarak lipid peroksidasyonları da tayin edilmiştir.

Materyal ve Metot

Anaç Balıklar ve Sperm Örnekleme

Çalışmada, ilgili etik kurul izni alınarak Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü'nde (AKSAM, Antalya) rutin üretimde anaç olarak kullanılan 3 adet 3-4 yaşındaki erkek sazan balığından (*Cyprinus carpio* L.) alınan sperm örnekleri kullanılmıştır. Sazan balığı anaçları toprak havuzdan, 48 saat öncesinden kuluçkahaneye getirilmiş, bu sürede balıklar beslenmemiştir. Sperm örneklemesinden 10 saat öncesi, anaçlara 2 mg/kg vücut ağırlığı oranında hipofiz uygulanmıştır. Örnekler alınmadan, anaçlar anestezi (2-fenoksietanol, 0,3 ml/L) ile bayıltılmıştır. Anaç balıklar, sudan çıkartıldıktan sonra, iyice kurulanmıştır. Sağım sırasında, semen örneklerine su, kan, idrar veya dışkı bulaşmamasına özen gösterilmiştir. Sperm örnekleri karın masajı (sağım) ile direk cam tüplere alınmıştır ve bu tüpler buz üzerinde bekletilerek ivedilikle analizlerine başlanmıştır.

Deney Grupları

Çalışmada, Fabaceae familyasına ait kakule (*Trigonella foenum-graecum*), Asteraceae familyasına ait ayçiçeği (*Helianthus annuus*), Zingiberaceae familyasına ait çemen otu (*Elettaria cardamomum*) tohumlarının ekstraksiyonları kullanılmıştır. Bu ekstraksiyonlar %0,1, %0,5, %1 ve %2 oranlarında suni seminal plazma solüsyonuna (sulandırıcı) katılmış ve sırasıyla kakule ekstraktı için Ka1, Ka5, Ka10, Ka20, ayçiçeği ekstraktı için Ay1, Ay5, Ay10, Ay20, çemen ekstraktı için Çe1, Çe5, Çe10, Çe20 şeklinde isimlendirme yapılmıştır. Ayrıca, ekstrasyonda etanol kullanıldığı için, kontrol grupları oluşturulurken aynı oranda etanol içermelerine özen gösterilmiş, kontrol grupları Ko1, Ko5, Ko10 ve Ko20 olarak isimlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan sulandırıcının içeriği 75 mM NaCl, 70 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ ve 20 mM Tris, pH 8,0 şeklindedir (Lahnsteiner ve ark., 1999). Tohumlar ticari olarak satın alınmış, ekstraksiyon öncesi toz şekline gelinceye kadar öğütülmüş ve buzdolabında saklanmıştır. 2 g öğütülmüş tohum, 15 ml etanol içinde 4 dakika boyunca çalkalanmış, daha sonra 2 saat ultrasonik buzlu su banyosunda bekletilmişlerdir. Daha sonra süspansiyonlar 10.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar alınarak, sulandırmalarda kullanılmaya kadar +4°C'de saklanmıştır (Pothinuch ve Tongchitpakdee, 2011). 1:2 oranında sulandırılan sperm örnekleri +4°C inkübe edilerek 2. ve 48. saatlerde motilite ve TBARS örnekleme yapılmıştır.

Sperm Motilite ve TBARS Analizi

Her bir anaçtan alınan sperm örnekleri incelenmiş, >%90 doğrusal motiliteye sahip olan bu örnekler birleştirilerek deneylerde kullanılmıştır. Motilite analizleri, bilgisayar yardımıyla sperm analizi (CASA) ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde SCA® (Sperm Class Analyzer v. 4.0.0., Microptic S.L., Barselona, İspanya) sisteminin ilgili modülü kullanılmıştır. Ayrıca aynı modül ile sperm yoğunluğu da kontrol edilmiştir. Bu çalışmada sulandırmalarda kullanılan birleştirilmiş sperm örneğindeki sperm yoğunluğu $6,1 \pm 0,21 \times 10^9$ ml/sperm hücresi olarak hesaplanmıştır. Motilite ölçümü için temelde Dziewulska ve ark., (2011) tarafından önerilen sistem ayarları kullanılarak sperm motilite parametrelerinden; kavisli hareket hızı (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), ortalama hızı (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), ileri doğru doğrusal hareket hızı (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), doğruluk (STR=VSL/VAP×100),

doğrusallık ($LIN=VSL/VCL \times 100$), sperm başı titreşim hareketi ($WOB=VAP/VCL$) belirlenmiştir. Parametreler motilitenin başlamasından sonraki 12. saniyede belirlenmiştir. Sperm motilitesinin başlatılmasında 45 mM NaCl, 5 mM KCl, ve 30 mM Tris, pH 8,0 (Percec ve ark., 1995) olan aktivasyon solüsyonu kullanılmıştır. Spermatozoa lipid peroksidasyonu göstergesi olarak TBARS (Tiyobarbitürik ile reaksiyona giren maddeler) değerleri saptanmıştır. Sulandırılan sperm örnekleri 4°C'de 7.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernant atılarak oluşan pelet analiz edilmiştir (Dzyuba ve ark., 2014). TBARS değerleri nmol/10⁸ spermatozoa (spz) olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Sperm motilite ve ölçülen TBARS değerlerindeki anlamlı farkların gösterilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve sonrasında ikili karşılaştırmalar için post-hoc Tukey testi uygulanmıştır. Analizler öncesi, yüzde veriler için *arcsin* transformasyonu, metrik veriler için logaritmik transformasyon uygulanmıştır. İstatistiksel analizlerde istatistik analizlerde R-programı (versiyon 2.9.1) programı kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Sperm motilitesi, sperm kalitesini belirlemede kullanılan en yaygın özelliktir (Alavi ve Cosson, 2005). Bu çalışmada, uygulama gruplarındaki sperm motilite parametreleri incelenmiştir. Ayçiçeği ve çemen otu ekstraktları, %0,1 oranından başlayarak tüm oranlarda motilite parametrelerini azaltıcı yönde tesir etmiştir (Tablo 1). Kakule tohumu grupları ve kontrol grupları arasında %0,1, %0,5, %1 oranlarında 2.saat örneklemelerinde,

motilite parametreleri açısından istatistiki fark saptanamamıştır ($P>0,05$). Bu örnekleme zamanında en yüksek VCL, VAP ve VSL değerleri sırasıyla >140, >130 ve >120 $\mu\text{m s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kakule tohumunun olumlu etkisi %2 oranında tamamen ortadan kalkmış, bu uygulamadaki VCL değeri ($128 \pm 4 \mu\text{m s}^{-1}$) kontrolden ($136 \pm 4 \mu\text{m s}^{-1}$) daha düşük ve diğer gruplardan daha yüksek olarak tayin edilmiştir ($P<0,05$). İnkübasyonun başlamasından 48 saat sonra ise, %0,5 kakule tohumu ekstraktı gurubundaki VCL değeri diğer tüm gruplardan istatistiki olarak fazla bulunmuştur ($P<0,05$). En düşük VCL, VAP ve VSL değerleri %2 oranında Ayçiçeği ve çemen otu ekstraktı gruplarında bulunmuştur. Tablo 2'de sunulan oransal motilite parametrelerinin aynı uygulama oranlarındaki farkları tespit etmede etkin olmadığı gözlemlenmektedir. Bununla beraber, tohum ekstraktları oranlarının artışı STR ve LIN değerlerini azaltmaktadır. 2. saat örneklemeinde %0,1 oranlarında 80'nin üstünde olan STR, %2 gruplarında bu değer altına düşmüştür. Aynı oranlarda, istatistiksel açıdan anlamlı farklar sadece %2 gruplarında 48. saatte STR ve LIN değerlerinde hesaplanmıştır. En düşük STR ve LIN değeri, sırasıyla 41 ± 24 ve 38 ± 23 olarak %2 çemen otu grubunda bulunmuştur.

Bazı bitkilerin ve bunların ekstraktlarının fertilitte üzerine olumlu etkileri olurken bazıları içinse bu etkiler görülmemektedir. *Azadirachta indica* bitkisinin ratlarda fertilitteyi azalttığı, benzer şekilde aynı bitkinin ekstraktının insanlarda sperm motilitesini azaltıcı olduğu bildirilmiştir (Upadhyay ve ark., 1993; Mahato ve Garai 1998). *Montenoa tormentosa* türünün insanlarda fertilitteyi negatif yönde etkileyebileceği gösterilmiştir (Hahn ve ark., 1982). *Acacia auriculiformis* bitki ekstraktının insanlarda sperm motilitesini azaltıcı etkisi olduğu raporlanmıştır.

Tablo 1. % 0,1 (A), %0,5 (B), %1 (C) ve % 2 (D) oranlarındaki kakule (Ka), ay çiçeği (Ay) ve çemen otu (Çe) tohum ekstraktları ile muamele edilen sazan balığı (*Cyprinus carpio* L.) sperm hücrelerine ait kavisli hareket hızı (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), ortalama hızı (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), ileri doğru doğrusal hareket hızı (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$) değerleri ve kontrol grupları (Ko) ile karşılaştırılmaları.

Table 1 Curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), average path velocity (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), and straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$) values of comon carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa treated with at .1% (A), 0.5% (B), 1% (C) and 2% (D) ratios of fenugreek (Ka), sunflower (Ay), and green cardamom (Çe) seed extracts, comparison with the control groups (Ko)

Gruplar	2. saat			48. saat		
	VCL	VAP	VSL	VCL	VAP	VSL
Ko1	140±5 ^{ab}	132±10 ^{ab}	122±17 ^a	99±4 ^a	92±6 ^{ab}	77±15 ^a
Ka1	142±4 ^a	134±10 ^a	122±18 ^a	101±2 ^a	95±5 ^{ab}	77±15 ^a
Ay1	134±2 ^b	127±7 ^{ab}	108±18 ^a	91±4 ^b	80±10 ^{bc}	57±20 ^a
Ce1	135±3 ^b	120±7 ^b	96±19 ^a	92±3 ^b	86±7 ^c	75±15 ^a
Ko5	141±6 ^a	131±9 ^a	107±26 ^{ab}	98±3 ^a	94±8 ^a	76±13 ^{ab}
Ka5	144±3 ^a	135±8 ^a	121±10 ^a	104±2 ^b	98±6 ^a	75±13 ^{bc}
Ay5	131±3 ^b	122±8 ^a	86±29 ^b	86±3 ^c	79±6 ^b	56±11 ^{bc}
Ce5	133±4 ^b	125±6 ^a	97±12 ^{ab}	90±3 ^c	79±10 ^b	52±20 ^c
Ko10	137±6 ^a	128±6 ^a	107±9 ^a	97±4 ^a	91±7 ^a	72±14 ^a
Ka10	135±4 ^a	129±5 ^a	107±20 ^a	103±3 ^a	97±5 ^a	73±14 ^a
Ay10	125±3 ^b	112±13 ^b	89±22 ^a	80±2 ^b	69±7 ^b	51±14 ^a
Ce10	129±4 ^b	120±7 ^{ab}	92±22 ^a	84±4 ^b	76±8 ^b	50±22 ^a
Ko20	136±4 ^a	124±9 ^a	99±23 ^a	98±4 ^a	92±6 ^a	67±11 ^a
Ka20	128±4 ^b	118±11 ^{ab}	89±24 ^a	95±4 ^a	90±4 ^a	75±11 ^a
Ay20	112±4 ^c	107±5 ^b	87±11 ^a	68±4 ^b	55±1 ^c	35±10 ^b
Ce20	117±5 ^c	108±8 ^b	80±19 ^a	75±2 ^c	70±4 ^b	28±16 ^b

Aynı uygulama oranındaki farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan farklıdır ($P<0,05$).

Tablo 2. %0,1 (A), %0,5 (B), %1 (C) ve %2 (D) oranlarındaki kakule (Ka), ay çiçeği (Ay) ve çemen otu (Çe) tohum ekstraktları ile muamele edilen sazan balığı (*Cyprinus carpio* L.) sperm doğruluk (STR), doğrusallık (LIN), sperm başı titreşim hareketi değerleri (WOB) ve kontrol grupları (Ko) ile karşılaştırılmaları

Table 2 Straightness (STR), linearity (LIN), and wobble (WOB) values of comon carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa treated with at 0.1% (A), 0.5% (B), 1% (C) and 2% (D) ratios of fenugreek (Ka), sunflower (Ay), and green cardamom (Çe) seed extracts, comparison with the control groups (Ko)

Gruplar	2. saat			48. saat		
	STR	LIN	WOB	STR	LIN	WOB
Ko1	92±7 ^a	87±10 ^a	95±4 ^a	83±13 ^a	77±13 ^a	93±4 ^a
Ka1	80±16 ^a	76±16 ^a	94±3 ^a	81±11 ^a	75±12 ^a	93±8 ^a
Ay1	83±6 ^a	78±7 ^a	94±4 ^a	79±13 ^a	74±14 ^a	93±6 ^a
Ce1	80±16 ^a	72±17 ^a	90±7 ^a	73±12 ^a	67±12 ^a	92±5 ^a
Ko5	90±7 ^a	85±12 ^a	94±7 ^a	82±14 ^a	77±15 ^a	94±5 ^a
Ka5	91±7 ^a	84±6 ^a	94±4 ^a	77±15 ^a	72±13 ^a	94±4 ^a
Ay5	84±15 ^a	80±15 ^a	95±4 ^a	74±14 ^a	70±13 ^a	94±4 ^a
Ce5	75±18 ^a	70±18 ^a	92±7 ^a	84±9 ^a	79±11 ^a	94±4 ^a
Ko10	85±12 ^a	81±13 ^a	95±4 ^a	71±22 ^a	63±21 ^a	88±10 ^a
Ka10	70±22 ^a	65±23 ^a	93±6 ^a	72±16 ^a	65±14 ^a	92±7 ^a
Ay10	79±12 ^a	72±17 ^a	90±9 ^a	75±21 ^a	64±19 ^a	86±9 ^a
Ce10	82±11 ^a	77±10 ^a	95±4 ^a	65±17 ^a	51±13 ^a	80±13 ^a
Ko20	80±14 ^a	71±14 ^a	89±4 ^a	87±15 ^a	81±15 ^{ab}	93±6 ^a
Ka20	78±9 ^a	73±9 ^a	94±4 ^a	66±22 ^a	58±22 ^b	88±9 ^a
Ay20	77±16 ^a	72±16 ^a	93±5 ^a	65±24 ^{ab}	59±24 ^{ac}	90±9 ^a
Ce20	73±14 ^a	68±17 ^a	92±7 ^a	41±24 ^b	38±23 ^c	93±3 ^a

Aynı uygulama oranındaki farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan farklıdır (P<0,05).

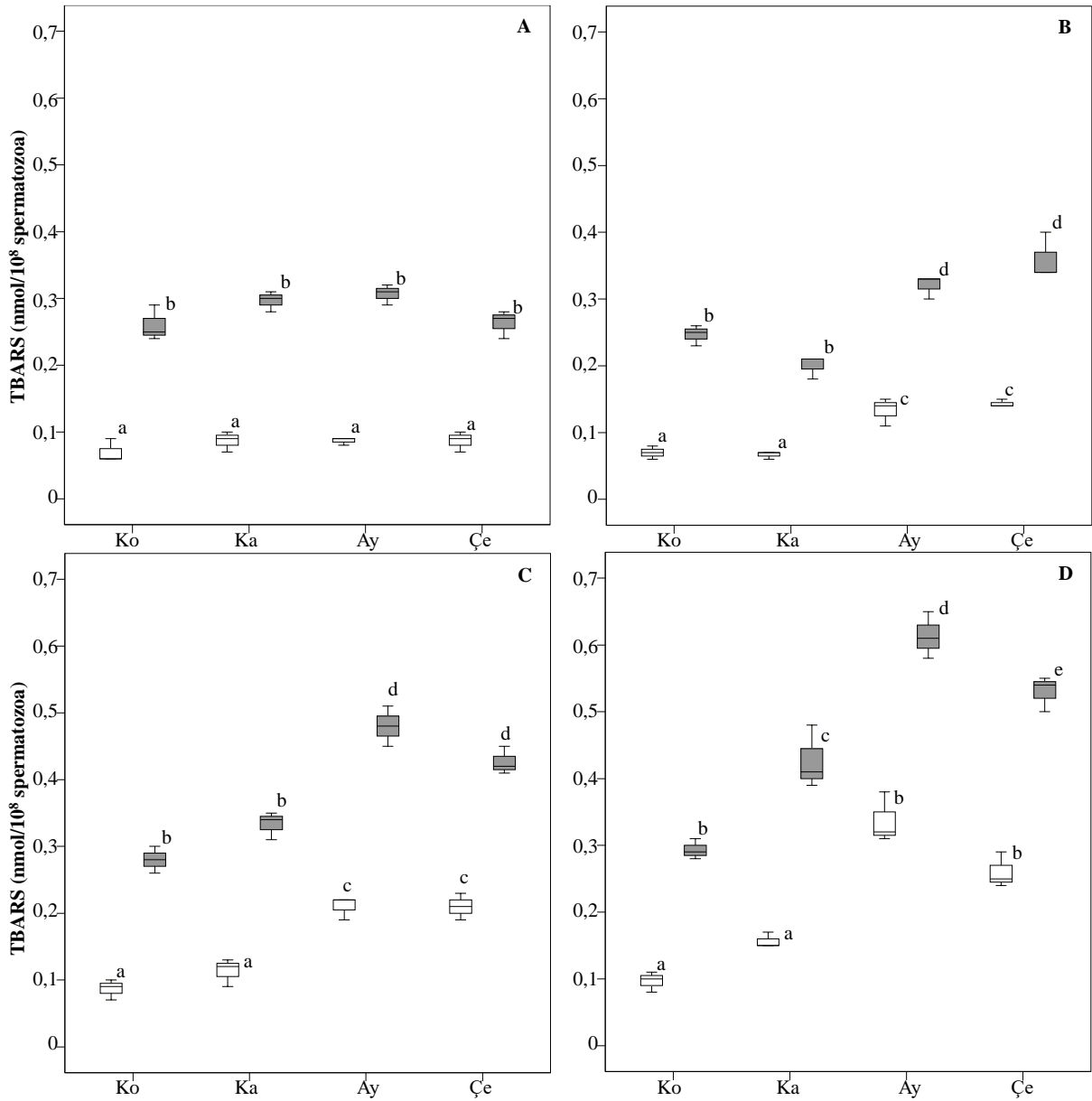
Tropik bir bitki olan *Mollugo pentaphylla* bitkisinden elde edilen ekstraktın 300 µg/ml gibi düşük bir dozda, insan sperm hücrelerinin hem motilitesi hem de canlılığını istatistiki açıdan anlamlı şekilde düşürdüğü saptanmıştır (Rajasekaran ve ark., 1993). Ayçiçeği yapraklarının etanol kullanılarak hazırlanmış ekstraktlarının 0,5 g/kg dozunda oral olarak ratlara uygulanmasında doğurganlığı azalttığı rapor edilmiştir (Emamuzo ve ark., 2010). Ayrıca, pamuk çiğidinden elde edilen gossipol bileşiğinin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üreme sistemi steroidleri üzerine zararlı etkisi saptanmıştır (Rinchard ve ark., 2003). Bu araştırmalarda, bitki ekstraktlarının sperm fonksiyonları üzerindeki azaltıcı etkisi saponinler ile ilişkilendirilmiştir. Birçok bitkide bulunabilen saponinler yapılarında steroid veya steroidal alkaloid gurubu barındırabilmektedir (Garai, 2014). Saponinler, özellikle bu araştırmada kullanılan Ayçiçeği bitkisinde önemli miktarda saptanmıştır (Onoja ve ark., 2019).

Çalışmada, tohum ekstraktları ile muamele edilen sperm örneklerinin TBARS değerleri tayin edilmiştir (Şekil 1). Kontrol grubuna kıyasla, %0,1 oranlarındaki tohum ekstraktları TBARS artışına neden olmamıştır. %0,5 gruplarında ise Ayçiçeği ve çemen otu ekstraktları gruplarında istatistiksel artışlar olmuştur (P<0,05). Her iki örnekleme zamanında da Ayçiçeği ve çemen otu ekstraktlarının ≥%1 oranlarında TBARS artışına neden olduğu saptanmıştır. 2. ve 48. saatlerdeki en yüksek TBARS değerleri % 2 Ayçiçeği gurubunda, sırasıyla 0,34±0,04 ve 0,61±0,04 nmol/10⁸ spz olarak bulunmuştur. Kontrol grubundan (0,25±0,02 nmol/10⁸ spz) daha düşük TBARS ortalaması sadece %0,5 kakule tohumu ekstraktı gurubunda (0,20±0,02 nmol/10⁸ spz) saptanmıştır.

Sperm hücrelerinin ve seminal plazmanın oksidatif durumu, sperm hücresinin canlılığını korumada son derece önemlidir. Oksidatif stresin artışı, sperm kalitesindeki azalma ile ilişkilidir (Dzyuba ve ark., 2014). Özellikle *in vitro* koşullarda, aerobik hücre olan spermatozoa, reaktif oksijen türleri gibi oksijen metabolitlerinin baskısı altında kalmaktadır. Bu metabolitler, spermatozoa kaynaklı olmasına

rağmen ortamda belli bir miktarı geçtiğinde, spermatozoa fonksiyonları üzerine zararlı etkilere sebep olabilmekte, hatta DNA hasarına neden olmaktadır (Shaliutina-Kolešová ve ark., 2014). Bu durum özellikle, spermatozoa muhafazasında önemli bir sorundur. Bu sorun, saklama ortamına ilave edilen antioksidan özellikteki çeşitli maddeler, amino asitler, vitaminler, enzimler ile iyileştirilmeye çalışılarak, saklama sonunda spermatozoa kalitesinin en iyi şekilde korunmasına çalışılmaktadır. Ancak ortamda, bu etken maddelerin belli seviyenin üzerine çıkması da spermatozoa için stres koşulları oluşturmaktadır (Cabrita ve ark., 2011). Bu çalışmada kullanılan tohum ekstraktları ve farklı oranlar göz önüne alındığında, %0,5 oranındaki kakule tohum ekstraktının spermatozoa için uygun oksidatif stres giderici özellikte olduğu saptanmıştır. Etken maddelerin ortamdaki fazlalığı birkaç şekilde spermatozoa motilitesini negatif yönlü etkileyebilmektedir. Balıklarda sperm motilitesinin tetiklenmesi için gerekli olan iyon değişimi, etken maddelerinin yoğunluğu sebebiyle engellenebilir (Billard ve Cossou, 1992). Bununla beraber, özellikle fazla sayıda bileşik içeren bitki ekstraktları, spermatozoa üzerine etkileri birbirinden farklı birçok etken madde barındırabilir. Bu maddeler elektrik yükleri sebebiyle, zar potansiyelini dengesizleştirerek zardan madde geçişlerini engelleyebilir ve nihayetinde spermatozoa motilitesi ve canlılığı azalabilir (Lahnsteiner, 2009).

Sonuç olarak mevcut çalışmada kullanılan tohum ekstraktlarından, %0,5 oranındaki kakule tohum ekstraktının 48. saat sonunda motilite değerlerine pozitif yönde etkilediği ve ayrıca oksidatif stresi de kontrol grubuna kıyasla artırmadığı gözlenmiştir. Buna karşın Ayçiçeği ve çemen otu tohum ekstraktlarının her oranda 2. saatten itibaren sperm parametrelerine olumsuz etkileri gözlenmiştir. Bu iki ekstrakt sperm hücrelerindeki oksidatif stresi de artırmıştır. Özellikle %2 oranında tüm ekstraktların motilite parametrelerini azaltıcı, oksidatif stresi artırıcı etkisi bulunmuştur. Sazan balığı sperm muhafazasında, ayçiçeği ve çemen otuna göre kakule tohum ekstraktının kullanımı daha uygundur.



Şekil 1 Sazan balığı (*Cyprinus carpio* L.) sperm hücrelerindeki, % 0,1 (A), %0,5 (B), %1 (C) ve % 2 (D) oranlarındaki kakule (Ka), Ayçiçeği (Ay) ve çemen otu (Çe) tohum ekstraktlarının neden olduğu TBARS içerikleri, 2.(□) ve 48.(■)saatte kontrol grupları (Ko) ile karşılaştırılmaları.

Aynı uygulama oranındaki farklı harf taşıyan değerler istatistiki açıdan farklıdır (P<0.05).

Figure 1 TBARS content of comon carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa treated with at 0.1% (A), 0.5% (B), 1% (C) ve 2% (D) ratios of fenugreek (Ka), sunflower (Ay), and green cardamom (Çe) seed extracts, comparison with the control groups (Ko) at 2nd and 48th hours.

Teşekkür

Bu araştırmada örneklerin sağlanmasına yardımcı olan başta Adil Yılayaz olmak üzere Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretme ve Eğitim Enstitüsü çalışanlarına ve tohum ekstraktlarının hazırlanmasına katkı sunan Dr. Öğretim Üyesi Tülden Inanan'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abu-Taweel GM. 2018. Cardamom (*Elettaria cardamomum*) Perinatal Exposure Effects on the Development, Behavior and Biochemical Parameters in Mice Offspring. Saudi Journal of Biological Sciences, 25: 186-193.
- Acar Ü, Kesbiç OS, Yılmaz S, Gültepe N, Türker A. 2015. Evaluation of the Effects of Essential Oil Extracted from

Sweet Orange Peel (*Citrus sinensis*) on Growth Rate of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) And Possible Disease Resistance Against *Streptococcus iniae*. Aquaculture, 437: 282-286.

- Alavi SMH, Cosson J. 2005. Sperm Motility in Fishes. I. Effects of Temperature and pH: a Review. Cell Biology International, 29: 101-110.
- Billard R, Cosson MP. 1992. Some Problems Related to the assessment of Sperm Motility in Freshwater Fish. Journal of Experimental Zoology, 261(2): 122-131.
- Cabrera E, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT, Dinis MT. 2011. The Influence of Certain Aminoacids and Vitamins on Post-thaw Fish Sperm Motility, Viability and DNA Fragmentation. Animal Reproduction Science, 125: 189-195.

- Dikel S. 2015. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Büyüme Artırıcı Olarak Sarımsak (*Allium sativum*) Kullanımı. Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(7): 529-536.
- Dziewulska K, Rzemieniecki A, Domagała J. 2008. Basic Physico-chemical Parameters of Milt from Sea Trout (*Salmo trutta m. trutta*), Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Appl. Ichthyol., 24(4): 497-502.
- Dzyuba V, Dzyuba B, Cosson J, Boryshpolets S, Yamaner G, Kholodniy V, Rodina M. 2014. The Antioxidant System of Sterlet Seminal Fluid in Testes and Wolffian Ducts. Fish Physiology and Biochemistry, 40(6): 1731-1739.
- Emamuzo ED, Miniakiri SI, Tedwin EJO, Delesi KH, Precious A. 2010. Effects of Ethanol Extract of Leaves of *Helianthus annuus* on the Fecundity of Wistar Rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3(6): 435-438.
- Garai S. 2014. Triterpenoid Saponins. Nat. Prod. Chem. Res., 2(6): 148.
- Guo S, Ge Y, Jom KN. 2017. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). Chem. Cent. J., 11(1): 95.
- Hahn DW, Ericson EW, Lai MT, Probst A. 1982. Antifertility Activity of *Montenoa tormentosa*. Contraception, 23(2): 113-140.
- Kesbiç OS, Acar Ü, Yigit M, Bulut M, Gültepe N, Yılmaz S. 2015. Unrefined Peanut Oil as a Lipid Source in Diets for Juveniles of Two-banded Seabream *Diplodus vulgaris*. N. Am. J. Aquacult., 78(1): 64-71.
- Kesbiç OS. 2019. Effects of The Cinnamon Oil (*Cinnamomum verum*) on Growth Performance and Blood Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 7(2): 370-376.
- Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. 1999. Sperm Metabolism of the Teleost Fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its Relation to Motility and Viability. J Exp Zool, 284(4): 454-465.
- Lahnsteiner F. 2009. The Role of Free Amino Acids in Semen of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* and Carp *Cyprinus carpio*. Journal of Fish Biology, 75: 816-833.
- Mahato SB, Garai S. 1998. Triterpenoid Saponins. (Organic Natural Products. Herz W, Kirby GW, Moore RE, Steglich W, Tamm Ch). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vienna, Springer. ss: 16. New York 74:1-196. ISBN 978-3-7091-6496-9
- Onoja SO, Onyebuchi GC, Ijeh II, Ezeja MI. 2019. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of Methanol Extract of *Helianthus annuus* Linn. (Asteraceae) Leaf. EuroBiotech Journal, 3(2): 112-116.
- Öz M, Dikel S, Durmuş M, Özoğul Y. 2017. Effects of Black Cumin Oil (*Nigella sativa*) on Sensory, Chemical and Microbiological Properties of Rainbow Trout During 23 Days of Storage at 2±1°C. J. Aquat. Food Prod. Technol., 26(6): 665-674.
- Öz M. 2018. Effects of black cumin (*Nigella sativa*) oil on ammonia and biogenic amine production in rainbow trout. Indian J. Anim. Res., 52(2): 265-269.
- Perchec G, Jeulin C, Cosson J, André F, Billard R. 1995. Relationship Between Sperm ATP Content and Motility of Carp Spermatozoa. J. Cell Sci., 108(2): 747-753.
- Pothinuch P, Tongchitpakdee S. 2011. Melatonin Contents in Mulberry (*Morus spp.*) Leaves: Effects of Sample Preparation, Cultivar, Leaf Age and Tea Processing. Food Chem., 128: 415-419.
- Rajasekaran M, Nair AG, Hellstrom WJ, Sikka SC. 1993. Spermicidal Activity of an Antifungal Saponin Obtained from the Tropical Herb *Mollugo pentaphylla*. Contraception, 47(4): 401-412.
- Rinchar J, Lee KJ, Dabrowski K, Ciereszko A, Blom JH, Ottobre JS. 2003. Influence of Gossypol from Dietary Cottonseed Meal on Haematology, Reproductive Steroids and Tissue Gossypol Enantiomer Concentrations in Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac. Nutr., 9: 275-282.
- Shaliutina-Kolešová A, Gazo I, Cosson J, Linhart O. 2014. Protection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa motility under oxidative stress by antioxidants and seminal plasma. Fish Physiol. Biochem. 40: 1771-1781.
- Tizkar B, Kazemi R, Alipour A, Seidavi A, Naseralavi G, Ponce-Palafox JT. 2015. Effects of Dietary Supplementation with Astaxanthin and β -carotene on the Semen Quality of Goldfish (*Carassius auratus*). Theriogenology, 84: 1111-1117.
- Ubilla A, Valdebenito I. 2011. Use of Antioxidants on Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) Sperm Diluent: Effects on Motility and Fertilizing Capability. Lat. Am. J. Aquat. Res., 39(2): 338-343.
- Upadhyay SN, Dhawan S, Talwar GP. 1993. Anti-fertility Effects of Neem (*Azadiracta indica*) Oil in Male Rats by Single Intravas Administration: an Alternate Approach to Vasectomy. J. Androl., 14(4): 375-381.
- Wani SA, Kumar P. 2018. Fenugreek: A Review on its Nutraceutical Properties and Utilization in Various Food Products. Saudi J. Biol. Sci., 17: 97-106.