Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 1, Spring 2018, p. 47-59

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۵۹-۴۷

بررسی اثر پودر و عصاره الکلی کرم‌خاکی (*Eisenia fetida*) بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم‌های کبدی و فراسنجه‌های خونی در خروس‌های آذربایجان غربی

مریم ربانی شکوه[۱]- محمد امیر کریمی ترشیزی[۲*]- علیرضا علیزاده[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۰۳

چکیده

در مطالعه حاضر اثرات آنتی‌اکسیدانی کرم‌خاکی (*Eisenia fetida*) به‌صورت برون‌تنی و درون‌تنی با طراحی دو آزمایش و با استفاده از ۲۰ قطعه خروس بومی آذربایجان غربی، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، با ۵ تیمار و ۴ تکرار، طی ۱۳ هفته بررسی شد. در آزمایش اول ماده خشک، چربی، پروتئین، خاکستر و الگوی اسید چرب و توان آنتی‌اکسیدانی کرم‌خاکی در شرایط برون‌تنی اندازه‌گیری و مشخص شد کرم‌خاکی حاوی ۲۶ نوع اسید چرب است که در این بین اسیدهای ایکوزاپنتاانوئیک (۱۴/۲۹ درصد)، استئاریک (۱۱/۸۳ درصد) و آراشیدونیک (۹/۵۰ درصد)، اسیدهای چرب غالب بودند. فنل کل کرم‌خاکی نسبتا زیاد و حدود ۱۶۹/۷۲ میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید در هر گرم عصاره بود. اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کرم‌خاکی ۲۴۲ میکرومول آهن در هر میلی‌گرم عصاره خشک بود. در آزمایش دوم اثر پودر کرم‌خاکی، در دو سطح ۱۰ و۲۰، و عصاره الکلی کرم‌خاکی، در دو سطح ۵/۶۵ و ۱۱/۳ گرم بر کیلوگرم جیره، بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون و شاخص‌های پراکسیداسیون خون، کبد و بیضه و آنزیم‌های سرمی کبد بررسی شد. نتایج حاکی از پایین بودن غلظت مالون‌دی‌آلدهید خون و کبد و بیضه خروس‌های تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد بود. در بین فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون، تنها مقدار کلسیم تحت تأثیر پودر کرم‌خاکی (سطح ۲) قرار گرفت و به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت پلاسمایی آنزیم‌های لاکتات‌دهیدروژناز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین‌فسفاتاز در تمام تیمارها نسبت به شاهد کاهش نشان داد. با اینحال غلظت آلانین‌آمینوترانسفراز تحت تأثیر قرار نگرفت. بطور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پودر یا عصاره‌الکلی کرم‌خاکی واجد اثرات آنتی اکسیدانی بوده و موجب حفاظت خون، بافت بیضه و کبد در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود و انتظار می رود به باروری جنس نر کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های کبدی، خروس بومی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کرم‌خاکی.

مقدمه

رادیکال‌های آزاد جزو مولکول‌های مشتق از اکسیژن هستند که در صورت فعالیت بیش از حد به‌عنوان اکسیدان‌های مضر در نظر گرفته می‌شوند. رادیکال‌های آزاد به دلیل داشتن الکترون‌های جفت نشده از لحاظ شیمیایی فعال و واکنش‌زا بوده و موجب آسیب ماکرومولکول‌های مختلف بدن جانداران از قبیل پروتئین، لیپید، کربوهیدرات و DNA می‌شود (۵۳). افزایش فعالیت رادیکال آزاد، متاثر از افزایش تولید آن و یا افت توان سیستم‌های حفاظتی آنتی‌اکسیدانی است (۴۱). رادیکال‌های آزادی که حاوی اکسیژن هستند را جزو گونه‌های اکسیژن واکنشگر یا ROS[۴] دسته‌بندی می‌کنند. گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن شامل: آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال پروکسیل (ROO°)، یون هیپوکلریک (ClO^-) و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل (OH°) می‌باشند (۱۴). اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشاهای بیولوژیک از جمله حساسترین اهداف اکسیدکننده‌ها هستند. اکسیداسیون این اسیدهای چرب سبب کاهش سیالیت غشاء و از بین

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- دانشیار گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳- استادیار پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل ، گروه جنین شناسی، تهران، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: karimitm@modares.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.v1397i1.58664

4- Reactive Oxygen Species

www.SID.ir

Archive of SID

رفتن ساختار و عملکرد آن می‌شود که در بروز بسیاری از بیماری‌ها نقش دارد. مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار یا کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد وجود دارد که یکی از آن‌ها سیستم آنتی‌اکسیدانی است (۱۳، ۱۸). آنتی‌اکسیدان‌ها بطور کلی، ترکیباتی هستند که ROS را از بین برده و یا تشکیل آن را متوقف و جلوی عمل آن را می‌گیرد؛ از این رو می‌توان از آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری و یا به حداقل رساندن تنش اکسیداتیو سود برد (۴۹).

بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده در صنعت، مانند هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT) و هیدروکسی آنیزول بوتیله (BHA)، مصنوعی هستند. در سالیان اخیر، اثرات سوء این نوع از آنتی‌اکسیدان‌ها بررسی شده است و اثرات سمی و سرطان‌زا بودن برخی از آن‌ها تایید شده است (۲۱، ۲۲ و ۴۲). از این‌رو تمایل زیادی در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به وجود آمده است. یکی از این منابع که مورد توجه واقع شده و تحقیقات گسترده‌ای پیرامون آن صورت گرفته است، کرم‌خاکی می‌باشد که از آن در تولید ورمی کمپوست استفاده صنعتی می‌شود (۴۴).

. این موجود واجد ویژگی‌های درمانی منحصر بفردی، از جمله اثرات ضدالتهابی، ضداکسیداتیو، ضدتومور و ضدباکتریایی است (۵، ۲۴). از آنجا که مواد سمی زیادی در محل زندگی کرم‌خاکی یافت می‌شود، لذا انتظار می‌رود که کرم‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی داشته باشند (۳۱).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کرم‌خاکی به ترکیبات فنلی آن نسبت داده می‌شود که نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد بازی می‌کنند چراکه ترکیبات فنلی دارای گروه عاملی هیدروکسیل هستند (۵). استفاده از عصاره کرم‌خاکی به‌طور معنی‌داری مانع فیبروز کبدی در موش می‌شود (۲۰). مواد موجود در بدن کرم‌خاکی ممکن است عاملی در از بین بردن تومور در شرایط برون‌تنی باشد (۴۷). در پژوهشی دیگر، اثر ضد زخم معده و آنتی‌اکسیدانی کرم‌خاکی *(Rattus norvegicus)* گزارش شد (۳۶). این محققان همچنین بیان داشتند که مصرف خوراکی پودر کرم‌خاکی می‌تواند کبد موش را به‌طور معنی‌داری در برابر الکل حفاظت کند (۳۷).

یکی از پیآمدهای پراکسیداسیون لیپیدی گسترده، تولید ROSها است که توانایی بارورسازی اسپرم را با مشکل روبرو می‌سازد (۱). سطوح بالای اسیدهای چرب سیرنشده در غشاء پلاسما و سیتوپلاسم اسپرم، این سلول را در برابر حمله ROS آسیب‌پذیر می‌سازد، از اینرو تولید بیش از حد ROS یکی از علل اصلی ناباروری است (۳). وجود آنتی‌اکسیدان وضعیت ثابتی از سطح ROS را در پلاسمای منی ایجاد می‌کند (۳۹).

بنابراین هدف تحقیق حاضر بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی کرم‌خاکی و اثرات آن بر سطح مالون‌دی‌آلدئید در خون، کبد و بیضه همچنین بررسی شاخص‌های آسیب کبدی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون خروس‌های بومی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول

تهیه و آماده سازی پودر کرم‌خاکی

کرم‌های خاکی گونه *Eisenia fetida* به صورت زنده از شرکت آمیزه طبیعت (تهران، ایران) تهیه شدند. پس از جداسازی آن‌ها از مواد بستری و شستشو، در مجاورت هوا و در سایه خشک و سپس آسیاب شدند. رطوبت و خاکستر نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از آون (در دمای ^{o}C ۱۰۱ به مدت ۲۴ ساعت) و کوره (دمای ^{o}C ۶۰۰) با ۳ تکرار اندازه‌گیری شدند. چربی خام با حلال پترولئوم بنزین[1] (۴۸) و پروتئین خام نیز به روش معمول تعیین شد (۴).

آنالیز اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی (GC)

استخراج اسیدهای چرب نمونه کرم‌خاکی با دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC unit, Unicam 4600,USA) و با بکارگیری روش Metcalf و همکاران (۳۰) انجام و نوع و غلظت اسیدهای چرب نمونه معین شد. دستگاه مجهز به آشکارساز یونیزه کننده شعله و ستون مویین با ابعاد ۳۰ متر در ۰/۲۲ میلی‌متر بود و از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای آون و ستون دستگاه نیز مطابق برنامه دمایی داده شده به این صورت تنظیم شده بود که زمان اولیه ۱۶۰درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه بود، طی مدت ۱۳ دقیقه دما از ۱۶۰ به ۱۸۰ درجه سلسیوس رسید و تا پایان کار در این دما ماند. کل زمان شناسایی ۳۰ دقیقه بود. دمای آشکارساز ۲۸۰ درجه سلسیوس، دمای تزریق ۲۴۰ درجه سلسیوس و فشار سر ستون psi ۲۰ بود. حجم نمونه تزریق شده نیز حدود ۰/۲ تا ۰/۳ میکرولیتر بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان ترکیبات فنلی تام

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از فنل تام و FRAP[2] انجام شد. مقادیر فنل تام نمونه‌های عصاره کرم‌خاکی با اندکی تغییر، با بکارگیری روش فولین–سیکالتو اندازه‌گیری شد، و با استفاده از منحنی استاندارد، بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره، گزارش شد (۲۹).

توان‌آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن (FRAP)

در این روش توان آنتی‌اکسیدانی براساس توانایی احیاء یون فریک (III) به یون فروس (II) سنجیده و نتایج برحسب میکرومول

1- Petroleum benzine (Merck, Germany)
2- Ferric Ion Reducing Antioxidant Power

www.SID.ir

Archive of SID

یون فروس در گرم عصاره گزارش شد (۷).

آزمایش دوم

تعداد ۲۰ قطعه خروس بالغ نژاد بومی ارومیه (در ۴۳ هفتگی) مورد تحقیق قرار گرفت. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی مخصوص مرغ مادر نگهداری شدند. مقدار خوراک دریافتی روزانه‌ی هر خروس ۱۰۰ گرم بود. در طول تحقیق خروس‌ها به‌صورت آزاد به آب (آبخوری پستانکی) دسترسی داشتند. برنامه نوری شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. آزمایش در مدت ۱۳ هفته و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارها به ترتیب عبارت بودند از: تیمار ۱، جیره شاهد؛ تیمارهای ۲ و ۳، جیره‌های حاوی ۱۰ و ۲۰ گرم پودر کرم خاکی در کیلوگرم خوراک؛ و تیمارهای ۴ و ۵، جیره‌های حاوی ۵/۶۵ و ۱۱/۳ گرم عصاره الکلی کرم‌خاکی در هر کیلوگرم خوراک. بلوک‌بندی براساس رکوردگیری اولیه خروس‌ها در مورد صفات حجم منی و غلظت اسپرماتوزوا در منی انجام شد.

نحوه تهیه عصاره الکلی کرم‌خاکی

برای تهیه عصاره الکلی، مقدار ۱۰۰۰ گرم پودر خشک کرم‌خاکی پس از خیساندن در ۱۰ لیتر الکل (اتانول ٪۸۰) به‌مدت ۲۴ ساعت، روی شیکر با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفته و سپس محلول با کاغذ واتمن صاف شد. محلول صاف شده با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۴ دور در دقیقه تغلیظ شد و سپس در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به‌طور کامل خشک شد. سپس راندمان عصاره‌گیری تعیین گردید (۱۹).

نمونه‌گیری برای بررسی فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون و اکسیداسیون در بافت کبد و بیضه

در پایان دوره (سن ۵۶ هفتگی) به منظور بررسی بیوشیمی پلاسما، از ورید بال همه خروس‌ها، با استفاده از سرنگ آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین خون‌گیری انجام شد و نمونه خون به میکروتیوب‌ها انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسما جدا گردید و تا زمان آزمایش در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما خون

غلظت پروتئین‌تام، آلبومین، اسیداوریک، گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، کلسیم و فسفر نمونه‌های پلاسما با کیت آزمایشگاهی شرکت پارس‌آزمون توسط اسپکتروفتومتر (Jenway Genova MK3, UK) تعیین شد. اندازه‌گیری هموگلوبین نیز با استفاده از کیت تجاری (زیست شیمی، ایران) و با روش سیانومت هموگلوبین روی نمونه‌های خون کامل انجام گردید (۱۶).

غلظت آنزیم‌های پلاسمای خون

فعالیت آنزیم‌های آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، آلانین‌آمینو ترانسفراز (ALT) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) موجود در نمونه‌های پلاسما به عنوان نشانگر آسیب غشاء سلولی ناشی از پراکسیداسیون به منظور مقایسه بین تیمارها با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی شرکت پارس‌آزمون ایران بوسیله دستگاه میکروپلیت ریدر (Awareness Technology Inc. Stat Fax 3200, Palm city, USA) در طول موج‌های ۳۴۰ و ۵۰۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم‌ها برحسب واحد در لیتر بیان شد.

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید خون

به این منظور از روش Rao و همکاران (۴۰) استفاده شد. در این روش میزان MDA با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش ۱۰۰µl از نمونه پلاسما به ۹۰۰µl آب مقطر اضافه شد، سپس ۵۰۰ µl معرف TBA به نمونه رقیق شده افزوده شد و به مدت ۱ ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب در طول موج ۵۳۴ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت کبد و بیضه

پس از کشتار و وزن‌کشی کبد و بیضه خروس‌های مورد آزمایش، به‌منظور سنجش میزان اکسیداسیون لیپیدی حاصل از اثر رادیکال-های آزاد با استفاده از تیوباربیتوریک اسید، غلظت MDA در بافت همگن شده کبد و بیضه اندازه‌گیری شد. این روش بر اساس مقدار جذب نوری کمپلکس صورتی رنگ حاصل از واکنش مولکول مالون-دی‌آلدئید با دو مولکول TBA استوار است (۹).

جهت آنالیز داده‌ها، رویه ANOVA در نرم افزار آماری SAS مورد استفاده قرار گرفت (۴۵) و برای مقایسه میانگین‌ها، آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ به‌کار گرفته شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول

مقدار ماده خشک ٪۹۱، پروتئین خام ٪۶۴/۲، چربی خام ٪۱/۷، خاکستر ٪۸/۷۵ در نمونه پودر کرم‌خاکی بدست آمد. همچنین راندمان عصاره‌گیری اتانولی ۵۶/۳ گرم به‌ازای هر۱۰۰ گرم پودر کرم‌خاکی محاسبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایشی (گرم/کیلوگرم)

Table 1- Composition of experimental diets (g/kg)

اقلام خوراکی Ingredients	جیره شاهد Control diet	پودر کرم خاکی Earthworm meal(10 g/kg)	پودر کرم خاکی Earthworm meal(20 g/kg)	عصاره الکلی کرم خاکی Ethanolic extract (5.65g/kg)	عصاره الکلی کرم خاکی Ethanolic extract (11.3g/kg)	Chemical Composition
ذرت Corn	691.75	691.75	691.75	691.75	691.75	ME=2800kcal/kg
سبوس گندم Wheat bran	139.6	139.6	139.6	139.6	139.6	CP=13 %
کنجاله سویا (۴۴٪) Soybean meal (44%)	65.2	65.2	65.2	65.2	65.2	Ca=1 %
گلوتن ذرت Corn gluten	30	20	10	30	30	AP=0.35 %
پودر کرم خاکی Earthworm meal	-	10	20	-	-	Met+Cys=0.49%
عصاره الکلی کرم خاکی Ethanolic extract	-	-	-	0.56	1.13	Met=0.24%
ماسه Sand	20	20	20	20	20	Thr=0.44 %
کربنات کلسیم $CaCO_3$	17.4	17.4	17.4	17.4	17.4	Lys=0.5 %
جو Barley	14.73	14.73	14.73	14.73	14.73	Na=0.15 %
دی کلسیم فسفات DCP	12.96	12.96	12.96	12.96	12.96	
نمک طعام Common salt	3	3	3	3	3	
مکمل ویتامینی Vit. Premix[1]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
مکمل معدنی Min. Premix[1]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
ال-لایزین هیدروکلراید l-Lysine HCl	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	

[1]Supplied per kg of diet: Mn, 100 mg; Fe, 60 mg; Zn, 80 mg; Cu, 8 mg; I, 1 mg; Se, 0.3 mg; Vit A, 10000 IU; Vit D_3, 2000 IU; Vit E, 20 IU; Vit K_3, 2 mg; Vit B_1, 2.5 mg; Vit B_2, 8 mg; Vit B_3, 40 mg; Vit B_5, 15 mg; Vit B_6, 5 mg; Biotin, 0.3 mg; Vit B_{12}, 0.02 mg; Folic Acid, 1.5 mg; Choline Chloride, 500 mg

محتوای فنل کل نمونه

مقدار فنل کل ۱۶۹/۷۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر گرم عصاره خشک کرم خاکی بدست آمد. فنل کل در برخی گیاهان دارویی از جمله موسیر ۴/۵±۱۳۹/۶۷، چای‌کوهی ۸/۱۴±۴۴/۵۳، سیاه‌دانه ۳/۰۵±۵۷/۳۳، آویشن‌شیرازی ۱۱/۰۶±۲۸۳/۳۴، بابونه ۶/۱۱±۱۸۶/۶۴ و بارهنگ ۱۵۴/۳۳ میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره خشک گزارش شده است (۳۲ و ۳۳).

ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی شناخته می‌شوند زیرا واجد گروه‌های هیدروکسیلی هستند که توانایی شکستن زنجیره اکسیداسیون را دارند. کرم‌خاکی از جمله موجوداتی است که به‌علت شرایط خاص محل زیست آن، دارای ترکیبات فنلی زیادی است. در آزمایشی برای بررسی توان آنتی‌اکسیدانی، کرم‌خاکی (*Lampito*

www.SID.ir

Archive of SID

mauritii) در معرض خاک آلوده بـه فلـزات سـنگین قـرار گرفتـه و گزارش شد که زنده‌مانی کرم‌خاکی در خاک آلوده به فلـزات سـنگین، مستقیماً به ویژگی آنتی‌اکسـیدانی ترکیبـات فنلـی آن‌هـا ارتبـاط دارد (۲۷). بررسی محتوای فنلی کرم‌خـاکی در مطالعـه Verma و Sobha (۵۱) نشان داد که به‌ازاء هـر میلـی‌گـرم پـروتئین کـرم‌خـاکی، ۸/۸۰ میکروگرم معادل اسید گالیک وجود دارد. ترکیبات فنلی متابولیت‌هـای ثانویه هستند و به‌عنوان مولکول‌هـای مهارکننـده رادیکـال‌هـای آزاد عمل می‌کنند (۲۳).

جدول ۲- غلظت و درصد اسیدهای چرب نمونه کرم خاکی

Table 2- Fatty acids concentration and percentage in earthworm sample

اسید چرب Fatty acid	غلظت Concentration (mg/g fresh EW)	٪
C8:0	0.007	0.204
C10:0	0.108	3.101
C12:0	0.140	4.012
C14:0	0.092	2.648
C14:1	0.123	3.539
C16:0	0.195	5.580
C16:1	0.141	4.041
C17:0	0.130	3.734
C17:1	0.038	1.085
C18:0	0.413	11.830
C18:1(n-6)C	0.244	6.997
C18:1(n-6)T	0.183	5.258
C18:1(n-7)	0.072	2.051
C18:2(n-6)C	0.238	6.821
C18:2(n-6)T	0.101	2.883
C18:3(n-3)ω6	0.021	0.616
C18:3(n-3)ω3	0.007	0.188
C20:0	0.139	3.974
C20:1	0.028	0.807
C20:2	0.037	1.071
C20:3	0.079	2.275
C21:0	0.068	1.954
C22:0	0.043	1.230
C20:4(n-6)	0.331	9.505
C20:5(n-3) EPA	0.498	14.289
C22:6(n-3) DHA	0.011	0.303

در پژوهش الدراجی و همکاران (۲) خمیر دو نوع کرم‌خاکی (کرم-خاکی قرمز یا *Lumbricus rubellus* و نوعی کـرم‌خـاکی آفریقـایی *Eudrilus eugeniae*) را از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ویتـامین C مقایسه کرده و اعلام داشتند که خمیر این دو نوع کرم‌خـاکی مقـادیر زیادی ترکیبات فنلی دارد (به ترتیـب ۲۴۷/۰ و ۲۲۰/۶ میلـی‌گـرم در لیتر) که باعث فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه آن‌ها می‌شود. بررسـی فنل‌کل روی عصاره استخراج شده از کـرم‌خـاکی (*Eisenia fetida*) در مطالعه حاضر نیز انجام شد که نتایج حضور ترکیبـات فنلـی را کـه می‌تواند مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد، تایید می‌کند.

مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن

این روش به طور مستقیم آنتی‌اکسیدان‌ها و یا احیاء کننده‌ها را در نمونه اندازه‌گیری می‌کند و رابطه خطی با غلظت آنتی‌اکسیدانی آن‌هـا دارد (۳۸). در این تحقیق مقدار احیای آهن ۲۴۲ میکرومـول آهـن در هر میلی‌گرم عصاره خشک کرم‌خاکی به‌دست آمد.

در تحقیقات احیـای آهـن در گیاهـان دارویـی مختلـف از جملـه خاکشـیر ۷/۵۷±۶۲۴، گشـنیز ۹±۲۳۲، شـنبلیله ۷/۶±۳۰۰، بابونـه ۸/۷±۳۲۰ میکرومول آهن در هر میلی‌گرم عصاره خشک بیـان شـده است (۳۲، ۳۳).

تنوع اسید چرب موجود در کرم‌خاکی اهمیت دارویـی و تغذیـه‌ای این جانور را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضـر عمـده‌تـرین اسـیدهای چرب موجود در کرم‌خاکی ایکوزاپنتانوئیک اسید (امگا-۳) (۱۴/۲۹٪)، استئاریک اسید (۱۱/۸۳٪)، ایکوزاتترانوئیک اسید (امگـا-۶) (۹/۵۰٪) می‌باشد. در این راستا گونیا و همکاران (۲۰۱۶) نیز الگوی اسید چرب کرم‌خاکی *Eisenia fetida* را تعیین کردند که در ایـن پـژوهش نیـز درصد این سه اسید چرب، به همراه اسید لینولئیک، از دیگر اسیدهای چرب بیشتر بود (۱۷). اسیدهای چرب امگا-۶ و امگا-۳ در مهره داران

www.SID.ir

Archive of SID

سنتز نمی‌شوند و بایستی از طریق جیره به شکل پیش‌سازهای اسید لینولنیک (C18:3n-3) و اسید لینولئیک (C18:2 n-6) و یا از مشتقات بلند زنجیر آن‌ها که در بافت‌های حیوانی یافت می‌شوند (۲۲-۲۰ کربن، ۴ باند دوگانه) تأمین شوند (۱۱).

از کرم‌های خاکی چندین اسید چرب نیز جدا شده است که مهم‌ترین آن‌ها اسید لوریک است که از نظر خواص ضدمیکروبی شناخته شده بوده و پیش‌ساز مونولورین می‌باشد. این ماده دارای ویژگی های ضد میکروبی بالقوه قوی بوده و برای مبارزه با ویروس‌ها، تعدادی باکتری‌های گرم‌مثبت، مخمرها، تک‌یاخته‌های مختلف بیماری‌زا موثر می‌باشد (۲۶). مقدار اسید چرب لوریک در نمونه مورد آزمایش حدود ۴ درصد بود.

اسید لینولئیک یکی دیگر از اسیدهای چرب سیرنشده موجود در کرم‌خاکی است که ارزش دارویی زیادی دارد و در بدن انسان به اسید گامالینولئیک و نهایتاً به پروستاگلندین‌ها تبدیل می‌شود که به تنظیم التهاب و فشارخون و عملکرد دستگاه گوارش و کلیه کمک می‌کند (۲۵، ۲۶).

آزمایش دوم

مالون‌دی‌آلدهید به عنوان نشانگر تنش اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه اکسیداتیو لیپیدها است و افزایش سطح آن در بافت نشان دهنده افزایش آسیب غشاء سلولی است (۵۰). میزان MDA تولید شده طی پراکسیداسیون لیپیدی سلول‌های کبد، خون و بیضه در تیمارهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمار شاهد و دیگر تیمارهای آزمایشی بود به این ترتیب که بیشترین مقدار MDA، مربوط به گروه شاهد بود که به‌طور معنی‌داری از دیگر تیمارهای آزمایشی بیشتر بود ($P<0/05$). محققین بیان کردند خوراندن عصاره کرم‌خاکی به موشهایی که کبد آن‌ها دچار التهاب شده بود سبب کاهش MDA بافت کبد در این موش‌ها شد، زیرا عصاره کرم‌خاکی اثر آنتی‌اکسیدانی در برابر الکل داشته و می‌تواند اثر حافظتی قابل توجهی روی بافت کبد داشته باشد (۳۷).

همچنین نشان داده شده است که مصرف پودر کرم‌خاکی (۵۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۴۲ روز در موش‌هایی که کبد آن‌ها در اثر مصرف الکل دچار التهاب شده بود، سبب کاهش MDA بافت کبد شد (۳۷).

در تحقیق دیگری پلی‌فنل‌های حاصل از چای سبز به جیره جوجه گوشتی که تحت تنش ناشی از القاء کورتیکوسترون بودند افزوده و مشخص شد پلی‌فنل‌ها اثر حفاظتی روی بافت کبد داشته و سبب کاهش MDA بافت کبد می‌شود (۱۵).

در بررسی حاضر میزان MDA در بافت بیضه نیز اندازه‌گیری شد. در بررسی حاضر میزان MDA در بافت بیضه اندازه‌گیری شد. نتایج موید این امر است که تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری اکسیداسیون لیپید بیشتری نسبت به سایر تیمارها دارد ($P<0/05$). یکی از نشانه‌های مهم تنش اکسیداتیو در سلول‌ها، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء است. چون سیالیت بالا و انعطاف پذیری در غشاء اسپرم پرندگان برای تحرک و لقاح تخمک ضروری می‌باشد، لذا غشاء اسپرم حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه است (۵۴). روند پراکسیداسیون چربی موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم شده و نهایتاً منجر به کاهش توان باروری اسپرم می‌شود (۴۳). با توجه به نتایج تحقیق حاضر ممکن است پودر و یا عصاره الکلی کرم‌خاکی سبب کاهش اکسیداسیون بافت بیضه خروس‌ها شده باشد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در پلاسمای خون خروس‌های مورد آزمایش نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (جدول۳). بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان اکسیداسیون چربی خون وجود داشت به‌طوری که در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها سطح MDA پلاسما بیشتر بود؛ بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P<0/05$). مالون‌دی‌آلدهید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است و در نتیجه پراکسیداسیون چربی، در بیشتر نمونه‌های بیولوژیکی شامل پلاسما، بافت‌ها و ادرار یافت می‌شود. بنابراین با اندازه‌گیری سطوح MDA می‌توان توسعه پراکسیداسیون چربی که در اثر فعالیت ROSها بوجود آمده است را تعیین نمود (۳۵). در پژوهش حاضر نیز ممکن است مکمل کردن پودر و عصاره الکلی کرم‌خاکی در جیره با از بین بردن رادیکال‌های آزاد سبب کاهش MDA پلاسمای خون خروس‌ها شده باشد.

برخی از فراسنجه‌های خونی از جمله گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، اسید اوریک، کلسیم، فسفر و پروتئین خون نیز در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۴). تجزیه آماری و میانگین‌های مربوط به اندازه‌گیری گلوکز و تری‌گلیسرید تفاوت معنی داری نشان نداد ($P>0/05$). در این راستا عید و همکاران (۱۵) به جیره جوجه‌هایی که تحت تأثیر کورتیکوسترون (هورمون تنش) قرار داشتند، مقادیر متفاوتی پلی‌فنل اضافه کردند، نتایج نشان داد که محتوای غلظت تری‌گلیسرید و نیز میزان هورمون‌های تنش موجود در پلاسما کاهش یافت. در مجموع این محققین به این نتیجه رسیدند که پلی‌فنل‌ها می‌توانند در شرایط تنش، چربی خون و تنش‌اکسیداتیو را کاهش دهند. یک از دلایل این امر این است که برخی پلی‌فنل‌ها اثر بازدارندگی بر جذب روده‌ای چربی دارند. همچنین سبب ایجاد تغییر در روند تشکیل میسل‌ها شده و بازجذب اسیدهای صفراوی را دستخوش تغییر می‌سازند (۸). البته باید توجه داشت که تاکنون تحقیقات بسیار کمی در مورد کرم خاکی و به ویژه محتوای پلی‌فنلی آن به انجام رسیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- اثر تیمارهای مختلف بر وزن بدن، کبد، بیضه و مقدار تولید مالون‌دی‌آلدهید در خون، کبد و بیضه[۱]

Table 3- Effects of different treatments on body, liver and testis weights and MDA of blood, liver, and testis[1]

	تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments					SEM	P-Value
	Control	EM[2] (10g/kg)	EM (20g/kg)	EE[3] (5.65g/kg)	EE (11.3g/kg)		
مالون‌دی‌آلدئید بیضه Testis MDA (µg/g)	0.06[a]	0.04[c]	0.05[b]	0.04[c]	0.03[c]	0.003	0.0001
وزن بیضه Testis weight (g)	32.59	31.46	32.05	37.37	36.8	0.86	0.1
وزن کبد Liver weight (g)	34.93	40.83	36.54	34.45	40.52	1.12	0.28
وزن بدن Body weight (g)	3630	3365	3302	3423	3602	51.96	0.18
مالون‌دی‌آلدئید کبد Liver MDA (µg/g)	0.57[a]	0.09[b]	0.14[b]	0.13[b]	0.28[b]	0.059	0.03
مالون‌دی‌آلدئید خون Blood MDA(µmol/L)	0.17[a]	0.08[b]	0.09[b]	0.07[b]	0.08[b]	0.009	0.0001

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[1] Means within columns with no common superscript differ significantly (P < 0.05). SEM: standard error means; MDA: malondialdehyde

[2] Earthworm Meal

[3] Ethanolic Extract

بررسی داده‌های مربوط به کلسترول خون در جدول ۴، عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد (P>۰/۰۵). البته در برخی پژوهش‌ها، از جمله پژوهش براوو (۱۰) اثر پلی‌فنل بر کاهش کلسترول خون گزارش شده است، این محقق اثر احتمالی پلی‌فنل‌ها بر کاهش مکانیسم انتقال معکوس کلسترول[۱] (که باعث انتقال کلسترول از بافت‌ها به کبد می‌شود) و کاهش جذب روده‌ای آن و حتی افزایش اسیدهای صفراوی را از جمله دلایل کاهش کلسترول بیان کردند. نتایج حاصل از آنالیز مقادیر پلاسمایی آلبومین و هموگلوبین خون نشان می‌دهد بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵). استفاده از پودر کرم‌خاکی در جیره موش‌هایی که دچار التهاب کبد بودند، سبب کاهش آلبومین پلاسمای خون به سطح نرمال گردید، همچنین کاهش هموگلوبین خون موش‌های آزمایشی در اثر التهاب نیز با مصرف کرم‌خاکی به حالت طبیعی برگشت (۵). در تحقیق حاضر غلظت پروتئین کل و اسید اوریک خون نیز مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که تأثیر معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

داده‌های بررسی کلسیم و فسفر پلاسما نیز در جدول ۴ ارائه شده و مشخص است که بیشترین غلظت کلسیم (بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر) مربوط به تیمار پودر کرم‌خاکی (سطح ۲) و کمترین میزان مربوط به تیمار عصاره کرم‌خاکی (سطح ۱) بود (P<۰/۰۵). اما بین تیمارهای آزمایشی از نظر غلظت فسفرخون تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

غلظت آنزیم های کبد

آنزیم‌های غیر عملکردی پلاسما شامل لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP)، به آنزیم‌های نشانگر وضعیت تخریب بافت معروفند که در نتیجه‌ی اکسیداسیون لیپید غشاء سلول‌ها و به دنبال آن تخریب بافت‌ها وارد پلاسما شده و در پلاسما تجمع می‌یابند (۵۲). افزایش سن، تنش (همچون تنش نگهداری طولانی مدت در قفس)، ROSها و ضعف سیستم ایمنی از جمله عواملی هستند که می‌توانند بافت کبدی را با مشکل روبرو سازند. در پایان آزمایش، فعالیت آنزیم‌های LDH، AST، ALT و ALP مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از ارزیابی اثر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم‌های کبدی پلاسما در جدول ۵ نشان داده شده است. مصرف جیره‌های حاوی پودر کرم‌خاکی و نیز عصاره کرم‌خاکی (سطح ۱)، در مقایسه با تیمار شاهد، سبب کاهش فعالیت آنزیم LDH شد (P<۰/۰۵). همچنین تمام جیره‌های حاوی پودر یا عصاره کرم‌خاکی نسبت به شاهد سبب کاهش معنی‌دار فعالیت AST شدند (P<۰/۰۵). میزان ALP پلاسما در گروه‌های آزمایشی نیز تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی مختلف قرار گرفت به این ترتیب که میزان این آنزیم در پلاسمای خون خروس‌هایی که پودر (سطح ۱) و دو سطح عصاره کرم‌خاکی مصرف کرده بودند، نسبت به گروه شاهد بطور معنی‌داری نشد (P>۰/۰۵).

1- Reverse cholesterol transport

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش یافت (P<۰/۰۵)، در این بین ALP در پلاسمای خروس‌های تیمار سطح ۱ عصاره الکلی به‌طور معنی‌داری از تمام گروه‌های دیگر کمتر بود (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در بررسی ALT پلاسما خون مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). آنزیم ALP از جمله آنزیم‌های سیتوپلاسمی است که پس از آسیب سلولی در گردش خون منتشر می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم مربوط به شدت آسیب سلولی است (۲۸). در مطالعه بالامورگان و همکاران (۵) نیز استفاده از پودر کرم‌خاکی در جیره موش، سبب کاهش معنی‌دار فعالیت ALP در کبد شد.

جدول ٤- اثر تیمارهای مختلف آزمایشی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)[۱]

Table 4- Effects of different treatments on biochemical parameters in blood plasma (mg/dl)[1]

	تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments					SEM	P-Value
	Control	EM[1] (10g/kg)	EM (20g/kg)	EE[2] (5.65g/kg)	EE (11.3g/kg)		
فسفر Phosphorus (mg/dl)	4.63	4.43	4.45	4.48	4.38	0.03	0.14
کلسیم Calcium (mg/dl)	8.16^{b}	8.68^{ab}	9.45^{a}	7.87^{b}	8.79^{ab}	0.17	0.02
هموگلوبین Hemoglobin (g/dl)	15.81	14.24	14.59	15.5	15.13	0.34	0.68
آلبومین Albumin (g/dl)	4.89	4.72	4.85	4.54	4.91	0.05	0.11
اسید اوریک Uric acid (mg/dl)	6.74	6.92	6.68	6.56	6.58	0.28	0.05
پروتئین تام Total protein (g/dl)	4.1	3.89	3.83	3.9	4.09	0.06	0.41
کلسترول Cholesterol (mg/dl)	144.9	149.1	146.2	140.1	150.4	1.56	0.32
تری‌گلیسیرید Triglyceride (mg/dl)	170.75	172.13	173	163.67	170.5	3.16	0.92
گلوکز Glucose (mg/dl)	153.2	149.2	153.8	155.8	144.1	1.81	0.16

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[1] Means within columns with no common superscript differ significantly (P < 0.05). SEM: standard error means; MDA: malondialdehyde
[2] Earthworm Meal
[3] Ethanolic Extract

جدول ٥- اثر جیره‌های آزمایشی بر غلظت آنزیم های کبدی پلاسمای خون (واحد در لیتر)[۱]

Table 5- Effects of experimental diets on liver enzymes content in blood plasma (u/l)[1]

	تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments					SEM	P-Value
	Control	EM[1] (10g/kg)	EM (20g/kg)	EE[2] (5.65g/kg)	EE (11.3g/kg)		
لاکتات دهیدروژناز LDH	213.98^{a}	176.75^{bc}	158.75^{c}	181.75^{bc}	203.40^{ab}	9.93	0.007
آلکالین‌فسفاتاز ALP	5.14^{a}	4.20^{ab}	2.21^{c}	3.69^{bc}	3.64^{bc}	0.42	0.02
آلانین‌آمینو ترانسفراز ALT	2.81	3.46	3.46	3.67	3.89	0.21	0.64
آسپارتات‌آمینوترانسفراز AST	11^{a}	68^{b}	78^{b}	67^{b}	72^{b}	4.44	0.002

[۱] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[1] Means within columns with no common superscript differ significantly (P < 0.05). SEM: standard error means; MDA: malondialdehyde
[2] Earthworm Meal
[3] Ethanolic Extract

www.SID.ir

Archive of SID

در آزمایش دیگری، این پژوهشگران (۶) با استفاده از پاراستامول، موش‌ها را دچار التهاب کبدی نموده و سپس به جیره آنها عصاره کرم خاکی افزودند، نتایج به دست آمده نشان دهنده کاهش فعالیت آنزیم-های ALP، AST و ALT پلاسما خون بود. نحوه عمل عصاره کرم-خاکی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان بدین گونه است که از یک طرف مانع تشکیل گروه‌های اکسیژن واکنش‌گر شده و یا آنها را مهار می‌کند و بنابراین جلوی آسیب سلول‌های کبدی را می‌گیرد و از طرف دیگر ژن مسئول سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز را در بافت کبد تنظیم کرده و فعالیت آنزیمی ALP، AST و ALT در پلاسما خون را کاهش می‌دهد (۱۲).

نتیجه‌گیری کلی

کرم‌خاکی به دلیل داشتن ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، افزودن پودر و عصاره کرم‌خاکی به جیره خروس‌ها اگرچه تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون نداشت، اما نتایج بررسی MDA خون، بافت کبد و بیضه مؤید این امر است که کرم‌خاکی واجد ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بوده و همچنین اثرات حفاظتی بر بافت کبد دارد. از آنجا که کرم‌خاکی منبع پروتئین باکیفیتی است و در داخل کشور تولید می‌شود، می‌توان از مزایای آنتی‌اکسیدانی آن در بهبود باروری خروس‌های گله مادر بهره‌برد. پودر کرم‌خاکی در قیاس با عصاره الکلی آن از مزایای هزینه کمتر، تهیه آسان‌تر و تامین مواد مغذی بیشتر بویژه پروتئین برخوردار است. پیشنهاد می‌شود در آزمایش‌های تکمیلی تأثیر آنتی‌اکسیدانی تغذیه از کرم‌خاکی بر باروری و صفات تولید مثلی خروس بررسی شود.

منابع

1- Agarwal, A., S. A. Prabakaran, and T. M. Said. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. Journal of Andrology, 26:654.
2- Aldarraji, Q. M., N. Halimoon, and N. M. Majid. 2013. Antioxidant activity and total phenolic content of earthworm paste of *Lumbricus rubellus* (red worm) and *Eudrilus eugenia* (African night crawler). Journal of Entomology and Nematology, 5(3): 33-37.
3- Alvarez, J. G., and B. T. Storey. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Molecular Reproduction and Development, 42: 334-346.
4- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edn. AOAC Int., Gaithersburg, MD.
5- Balamurugan, M., K. Parthasarathi., E. L. Cooper, and L. S. Ranganathan. 2007. Earthworm paste (*Lampito mauritii*, kinberg) alters inflammatory, oxidative, haematological and serum biochemical indices of inflamed rat. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 11: 77-90.
6- Balamurugan, M., K. Parthasarathi, L. S. Ranganathan, and E. L. Cooper. 2008. Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. Journal of Zhenjiang University Science B, 9(2): 141-147.
7- Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Journal of Analytical Biochemistry, 239:70-76.
8- Biswas, A. H., and M. Wakita. 2001. Effect of dietary Japanese green tea powder supplementation on feed utilization and carcass profiles in broilers. Journal of Poultry Science, 38:50-57.
9- Botsoglou, N. A., D. J. Fletouris, G. E. Papageorgiou, V. N. Vassilopoulos, A. J. Mantis, and A. G. Trakatellis. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. Agricultural and Food Chemistry, 42(9): 1931-1937.
10- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Review, 56:317–333.
11- Cook, H. W. 1996. Fatty Acid Desaturation and Chain Elongation in Eucaryotes, in Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Biomembranes (pp. 129-152). Amsterdam: Elsevier.
12- Crawford, D. R. 1999. Regulation of Mammalian Gene Expression by Reactive Oxygen Species. *In*: Gilbert D., Cotton C. (Eds.), Reactive Oxygen Species in Biological System. (pp. 155-171). New York: Plenum.
13- Cross, C. 1987. Oxygen radical and human disease. Annals of Internal Medicine, 107: 526-545.
14- Devasagayam, T. P. A., J. C. Tilak, K. K. Boloor, S. Sane Ketaki, S. Ghaskadbi Saroj, and R. D. Lele. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. Journal of Association of Physicians of India. 52: 796.
15- Eid, Y. Z., A. Ohtsuka, and K. Hayashi. 2003. Tea polyphenols reduce glucocorticoid-induced growth inhibition and oxidative stress in broiler chickens. British Poultry Science, 44:127-132.
16- Fairbanks, V. F., and G. G. Klee. 1994. Biochemical aspects of hematology in: textbook of clinical chemistry

www.SID.ir

Archive of SID

(2nd ed). (pp. 2020-2030). Philadelphia: WB Saunders Company.
17- Gunya, B., P. J. Masika, A. Hugo, and V. Muchenie. 2016. Nutrient composition and fatty acid profiles of oven-dried and freeze-dried earthworm *Eisenia foetida*. Journal of Food and Nutrition Research. 4(6):343.
18- Halliwell, B., and J. M. C. Gutterridge. 1989. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: An Overview Methods in Enzymology, 186: 1-85.
19- Hegazi, A. G., and F. K. Abdel-Hady. 2002. Effect of some honeybee products on immune response of chicken infected with virulent NDV. Egyptian propolis: II-Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. Zeitschrift fuer Naturforschung, (57c), 386-394.
20- Hong, C., L. Ya-Qin, L. Shun-Ying, Z. Zhi-Guo, and C. Ping-Sheng. 2004. Effects of earthworm extract on expression of TGF-_1, TIMP-1 and MMP-13 in rats with hepatic fibrosis. World Chinese Journal of Digestology, 12:2333-2337.
21- Jayapraksha, G. K., and B. Patil. 2007. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. Food Chemistry, 101:410-418.
22- Kang, H. J., and S. P. Chawla. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. Biotechnology, 97: 614-620.
23- Katalinic, V., S. S. Možina, D. Skroza, I. Generalić, H. Abramovič, and M. Miloš. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry, 119: 715-723.
24- Li, D. H., W. Tang, and Y. F. Yang. 2008. Functional expression of an earthworm fibrinolytic enzyme in *Escherichia coli*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24: 613-618.
25- Li, S. L. 1995. Research on *di long's* (earthworms) effect in lowering blood pressure. Journal of Information, 12 (3): 22-24.
26- Lopez, A., and R. Alis. 2005. Indigenous use of native earthworms and its fatty acids profile; Paper Presented at the Int. Symposium on 'Vermitechnologies for Developing Countries: Laguna, Philippines.
27- Maity, S., S. Roy., S. Chaudhury, and S. Bhattacharya. 2007. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. Environmental Pollution, 151(1):1-7.
28- Manna, S., D. Bhattacharyya, D. K. Basak, and T. K. Mandal. 2004. Single oral dose toxicity study of alpha-cypermethrin in rats. Indian Journal of Pharmacology, 36: 25-28.
29- McDonald, S., P. D. Prenzler, M. Antolovich, K. Robards, and E. R. Stadtman. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry, 73: 73-84.
30- Metcalf, L. C., A. A. Schmitz, and J. R. Pelka. 1996. Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis. Analytical Chemistry, 38:514-515.
31- Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda., M. Seiki, and M. Maruyama. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm *Lumricus rubellus*. Japanese Journal of Physiology, 41: 461-472.
32- Mirzaei, M., J. Mohammadi, N. Mirzaei, and A. Mirzaei. 2011. The antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 1(3):160-167 (In Persian).
33- Mortezaei, S., M. Rafieian, R. Ansari, and N. Shahin Fard. 2013. Compare of the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity of eight herbs. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 7(12):530-519 (In Persian).
34- Pandjaitan, N., L. R. Howard, T. Morelock, and M. I. Gil. 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. Journal of Agricultural Food Chemistry, 53: 8618 - 8623.
35- Placer, Z. A., L. L. Cushmann, and B. C. Johnson. 1966. Estimation of products of lipid peroxidation in biochemical systems. Analytical Biochemistry, 16, 359–364.
36- Prakash, M., M. Balamurugan, K. Parthasarathi, G. Gu-nasekaran, E. L. Cooper, and L. S. Ranganathan. 2007. Anti-ulceral and anti-oxidative properties of earthworm paste of *Lampito mauritii* (Kinberg) on *Rattus norvegicus*. European Review of Medical and Pharmacological Science, 11:9-15.
37- Prakash, M., G. Gunasekaran, and K. Elumalai. 2008. Effect of earthworm powder on antioxidant enzymes in alcohol induced hepatotoxic rats. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 12:237-243.
38- Prior, R. L., X. Wu, and K. Schaich. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural Food Chemistry; 53(8):3101–3113.
39- Purdi, P. H. 2006. A review on goat cryopreservation. Small Ruminant Research, 63:215-225.
40- Rao, B., J. C. Soufir, M. Martin, and G. David. 1989. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Research, 24(2):127−134.
41- Rao, G. M., P. Sumita, M. Roshni, and M. N. Ashtagimatt. 2005. Plasma antioxidant vitamins and lipid peroxidation products in pregnancy induced hypertension. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20(1):198-200.

www.SID.ir

Archive of SID

42- Rehman, Z. U. 2006. A natural source of antioxidant. Food Chemistry, 99:450-454.
43- Rosenstrauch, A., and M. Friedlander. 2007. Spermatozoa retention causes the normal reduction of fertility in aging roosters. Acta Microscopica, 16 (1-2):189-190.
44- Sadeghi, K., A. Taghizadeh, A. R. Hasani, and M. Elmi. 2017. Effects of application rate of poultry litter on chemical composition and in vitro gas production of rumen content in vermicomposting. Iranian Journal of Animal Science Research, 8(4): 636-645.
45- SAS Institute. 2003. SAS/STAT® User's guide, release 9.1 edition. SAS institute Inc., Cary, NC.
46- Scobey, M. J., P. Bielfeld, J. S. Krussel, and R. S. Jeyendran, 1995. Effect of milk-yolk on the fertilizing capacity of spermatozoa. Andrologia, 27: 229-31.
47- Shihara, K., and N. Nakajima. 2006. Stereoselective reduction of carbonyl compounds using the cell-free extract of the earthworm, *Lumbricus rubellus*, as a novel source of biocatalyst. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70: 3077-3080.
48- Sibbald, I. R., and M. S. Wolynetz. 1986. Measurement of lipids in chicken carcass dry matter. Poultry Science, 65:2299-2303.
49- Sikka, S. C., M. Rajasekaran, and W. J. G. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. Journal of Andrology, 16(6): 464–468.
50- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis, and M. Scoullos. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64:178–89.
51- Verma, M. K., and K. Sobha. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory properties of autolysed extract of the Indian earthworm *Pheretima posthuma* after preliminary purification-an *in vitro* study. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 4-4:888-898.
52- Willianson, E. M., D. T. Okpako, and F. J. Evans. 1996. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. John Wiley, England.
53- Young, I. S., and J. V. Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. Journal of Clinical Pathology, 54: 176-186.
54- Zaniboni, L., R. Rizzi, and S. Cerolini. 2006. Combined effect of DHA and a-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. Theriogenology, 65: 1813-1827.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 1, Spring 2018, p. 47-59

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۵۹-۴۷

Evaluation of the Effects of Earthworm (*Eisenia fetida*) Meal and Ethanol Extract on Antioxidant Status, Liver Enzymes and some Blood Parameters in Western Azarbaijan Native Roosters

M. Rabbani Shokouh[1]- M. A. Karimi Torshizi[2*]- A. R. Alizadeh[3]

Received: 07-09-2016
Accepted: 23-04-2017

Introduction Oxidative stress is responsible for several health compromising conditions in livestock, resulting low performance, metabolic diseases, suppression of immune responses and fertility problems in males. It is known that the fatty acid composition of sperm membranes, especially their unsaturated components, determine their biophysical characteristics such as fluidity and flexibility as appropriate for their specific functions, including sperm motility and fertilizing capacity. The high levels of unsaturated fatty acids in the cell membranes made them susceptible to oxidation. Usually, the natural anti-oxidant defense of the birds needs fortification by dietary supplementation of antioxidants. Althoughsynthetic antioxidants are available and very effective, but health concerns are associated with their consumption. Researchers are seeking natural antioxidants to control the oxidation stress in birds. Natural antioxidants are substantially of plant origin. Antioxidants originated from animal kingdom are interesting, because they are natural, and protein rich feed ingredient with potentially functional properties. The vermiculture industry is a new and attractive agricultural activity and its main product is vermicompost which is applied in farm lands as a natural fertilizer. Earthworms are harvested as co-product and have the several applications. The purpose of this study was to investigate the antioxidant properties of earthworm meal (EM) and ethanol extract (EE), and effect of feeding earthworm meal and the extract on some oxidative parameters of native roosters.

Materials and Methods In experiment 1, fresh earthworms (*Eisenia fetida*) were washed and air-dried in shadow and ground to produce the earthworm meal. Half of earthworm meals were soaked in 80 % (V/V) ethanol with continues shaking for 24 h. The extract was filtered and concentrated to produce the ethanol extract of earthworm meal. The proximate composition in content value of moisture, crude ash, crude protein, and crude fat was determined according to the methods of AOAC. The fatty acid profile of extracted lipid was determined by gas chromatography after methylation of fatty acids. The total phenolic compounds of earthworm meal were determined using folin ciocalteu method. Antioxidant activity of extract was measured by ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay. In experiment two, 20 preselected Western Azarbaijan native roosters (34 weeks of age) were randomly allocated to 5 treatments and 4 blocks. Each rooster considered as an experimental unit and received 0 g EM or EE, 10 or 20 g/kg EM, and 5.65 or 11.30 g/kg EE for 13 consecutive weeks. At the end of experiment blood samples were collected form brachial vein of roosters, and birds were killed. The tissue samples were collected from the liver and testis after recording the organ weights. The biochemical parameters of blood including phosphorus, calcium, hemoglobin, albumin, uric acid, glucose, total protein, cholesterol and triglyceride was determined using spectrophotometer and commercial diagnostic kits. The activity of liver enzymes (lactate dehydrogenase, aspartate amino transferase, alkaline phosphatase and alanine amino transferase) in plasma was determined using spectrophotometer and commercial diagnostic kits. The malondialdehyde concentration was measured in blood plasma, liver tissue, and testis tissue of roosters as an indicator of lipid peroxidation using thiobarbituric acid method.

Results and Discussion The results indicated that earthworm had 26 different fatty acids, which eicosapentanoic, stearic, and arachidonic acid had the highest percentages, respectively. The total phenolic compounds in earthworm were 169.72 mg/g of gallic acid equivalent. The results showed that FRAP was 242 µmol of Fe (II)/mg dry extract. The dry matter, crude fat, protein and ash of earthworm meal were determined 91, 1.7, 8.75 and 64.2 %, respectively.

1- Graduated M. Sc. Student, Department of Poultry Science, Faculty of Agricultural, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Associate Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agricultural, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3- Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
(*- Corresponding Author Email: karimitm@modares.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

The blood, liver and testis malondialdehyde concentration in all of earthworm and earthworm extract treated groups were significantly decreased ($P<0.05$). The plasma concentration of calcium was the only biochemical parameter that significantly altered ($P<0.05$) and increased by earthworm powder (20 g/kg). The liver enzymes activity, including aspartate amino transferase, lactate dehydrogenase, and alkaline phosphatase (but no alanine amino transferase) were decreased in all of treated groups ($P<0.05$). The use of earthworm meal has some advantages over the ethanol extract of earthworm such as lower cost, more availability and providing more nutrients especially protein to rooster feeds.

Conclusion: According to the results of these two experiments, it was concluded that earthworm meal and ethanol extract have antioxidant activity and are able to protect the blood, testis and liver against oxidative stress. The antioxidant property of earthworm meal and extract could benefit male reproduction performance.

Keywords: Antioxidant activity, Biochemical parameters of blood plasma, Earthworm, Liver enzymes, Rooster.

www.SID.ir