

"Research Paper"

Improving the Health Status of Pregnant Ewes and their Lambs under Heat Stress Conditions by Feeding Glutamine

Hadi Mohamadzadeh¹, Asadollah Teimouri Yansari² and Eissa Dirandeh³

1- Department of Animal Science, Faculty of animal Science and Fishery, University of Agriculture and Natural Resources Sari, (Corresponding author: hmohamadzadeh2003@gmail.com)

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of animal Science and Fishery, University of Agriculture and Natural Resources Sari

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of animal Science and Fishery, University of Agriculture and Natural Resources Sari

Received: 9 January, 2023 Accepted: 6 March, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Heat stress (HS) affects physiological, biochemical and production functions in livestock. By suppressing various components of the immune system, HS increases the susceptibility of livestock to various diseases. This tension has a negative effect on the health and production ability of livestock by disrupting the nervous-hormonal system and suppressing the immune system. The use of different nutritional solutions to improve the immune system of livestock in different stages of production has attracted a lot of attention. This research was conducted to evaluate the effects of glutamine supplementation and protein level on inflammatory indicators, immune system and blood parameters of pregnant Zel breed ewes during the transitional period and the immune response of their lambs during HS.

Material and Methods: 20 pregnant ewes with an average weight of 42 ± 1 kg and an age of 2.5 ± 1 years and multiparous were selected and randomly assigned to four experimental treatments. Experimental treatments included: 1) basal diet (equal metabolizable protein requirement) 2) basal diet with glutamine (1% diet) 3) diet with 10% more protein than requirement and 4) basal diet with 10% more protein with glutamine. Blood sampling was done weekly before morning feeding from all ewes using vacuum tubes containing heparin (Venojet) from the jugular vein. Blood parameters including albumin, total plasma protein, alkaline phosphatase and malondialdehyde were measured with relevant kits and with an automatic analyzer. Insulin, immunoglobulin G (IgG), interleukin 2 (IL-2), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10) were measured using ELISA kits. In order to evaluate the immune response and the state of general inflammation, the differential blood count profile was examined.

Results: One week before and after parturition and on the day of parturition, the amount of albumin, total protein, insulin and IgG increased with glutamine consumption ($P < 0.05$). Also, glutamine supplementation increased the concentration of IgG in lambs born from ewes ($P < 0.0001$). The effect of experimental treatments on alkaline phosphatase was not significant. Also, the consumption of glutamine supplement one week before parturition, one week after parturition and on the day of parturition decreased the concentration of malondialdehyde ($P = 0.0030$, $P = 0.0057$ and $P = 0.0301$, respectively). The number of white blood cells in one week before parturition and on the day of parturition increased significantly with the addition of glutamine ($P = 0.0015$ and $P = 0.0024$, respectively). Glutamine supplementation significantly reduced blood neutrophils ($P < 0.05$). However, blood lymphocyte was significantly increased ($P < 0.05$). On the day of parturition and one week after parturition, treatments increased the values of IL-2 ($P = 0.0216$ and $P = 0.0586$, respectively) and IL-10 ($P = 0.0573$ and $P = 0.0019$, respectively). While the amount of IL-6 on the day of parturition and one week after parturition was significantly reduced by consuming glutamine and adding the level of metabolizable protein ($P = 0.0079$ and $P = 0.0027$, respectively).

Conclusion The results of this experiment showed that glutamine supplementation improves the health status of pregnant ewes under HS and their lambs.

Keywords: Glutamine, Heat Stress, Immune system, Inflammatory Indicators, Pregnant Ewes



"مقاله پژوهشی"

بهبود وضعیت سلامت میش‌های آبستن و بره‌های آن‌ها در شرایط تنش گرمایی با تغذیه گلوتامین

هادی محمدزاده^۱، اسدالله تیموری یانسری^۲ و عیسی دیرنده^۳

۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم دامی و شیلات، گروه علوم دامی، ساری، ایران، (نویسنده مسئول: hmohamadzadeh2003@gmail.com)

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم دامی و شیلات، ساری، ایران

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم دامی و شیلات، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

صفحه: ۲۷ تا ۴۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تنش گرمایی کارکردهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تولیدی را در دام‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد. تنش گرمایی با سرکوب اجزای مختلف سیستم ایمنی، حساسیت دام به بیماری‌های مختلف را افزایش می‌دهد. این تنش از راه اختلال در سیستم عصبی-هورمونی و سرکوب سیستم ایمنی، بر سلامت و قابلیت تولید دام‌ها تأثیر منفی می‌گذارد. بهره‌گیری از راه‌کارهای مختلف تغذیه‌ای برای بهبود سیستم ایمنی دام‌ها در گام‌های مختلف تولید، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات مکمل گلوتامین و سطح پروتئین بر شاخص‌های التهابی، سیستم ایمنی و فراسنجه‌های خونی میش‌های آبستن نژاد زل دوره انتقالی و پاسخ ایمنی بره‌های آن‌ها در طی تنش گرمایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۲۰ رأس میش آبستن با میانگین وزن 42 ± 1 کیلوگرم و سن 1 ± 2 سال و چند شکم زایش (۱ تا ۳ زایش) انتخاب و به‌طور تصادفی به چهار تیمار آزمایشی اختصاص داده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) جیره پایه (پروتئین قابل متابولیسم برابر احتیاجات)، ۲) جیره پایه همراه با گلوتامین (یک درصد جیره)، ۳) جیره دارای ۱۰ درصد پروتئین بیشتر از احتیاجات و ۴) جیره دارای ۱۰ درصد پروتئین بالاتر همراه با گلوتامین بود. خون‌گیری به‌صورت هفتگی پیش از تغذیه صبح از همه میش‌ها به‌وسیله لوله‌های خلاء دارای هپارین (نونجکت) از سیاهرگ گردنی انجام شد. فراسنجه‌های خونی شامل آلبومین، پروتئین کل پلاسما، الکالین فسفاتاز و مالون دی‌الدهید با کیت‌های مربوطه و با دستگاه اتونالایزر اندازه‌گیری شد. انسولین، ایمونوگلوبولین G، اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱۰ با استفاده از کیت‌های الایزا اندازه‌گیری شدند. جهت ارزیابی پاسخ ایمنی و وضعیت التهاب عمومی، پروفایل شمارش تفریقی خون بررسی شد.

یافته‌ها: یک هفته قبل و پس از زایمان و در روز زایمان، با مصرف گلوتامین مقدار آلبومین، پروتئین کل، انسولین و ایمونوگلوبولین G افزایش یافت ($p < 0.05$). همچنین مکمل گلوتامین غلظت ایمونوگلوبولین G بره‌های متولد شده از میش‌ها را افزایش داد ($p < 0.001$). اثر تیمارهای آزمایشی بر الکالین فسفاتاز معنی‌دار نبود. همچنین مصرف مکمل گلوتامین در یک هفته قبل از زایمان، یک هفته پس از زایمان و در روز زایمان باعث کاهش غلظت مالون دی‌الدهید شد (به‌ترتیب $p = 0.003$ ، $p = 0.057$ و $p = 0.0301$). تعداد گلبول‌های سفید خون در یک هفته قبل از زایمان و در روز زایمان با افزودن گلوتامین به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (به‌ترتیب $p = 0.0015$ و $p = 0.0024$). مکمل گلوتامین به‌طور قابل توجهی نوتروفیل‌های خون را کاهش داد ($p < 0.05$). با این حال، لنفوسیت خون به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ($p < 0.05$). در روز زایمان و یک هفته پس از زایمان، تیمارها مقادیر اینترلوکین ۲ (به‌ترتیب $p = 0.0216$ و $p = 0.0586$) و اینترلوکین ۱۰ (به‌ترتیب $p = 0.0573$ و $p = 0.0019$) را افزایش دادند. در حالی که میزان اینترلوکین ۶ در روز زایمان و یک هفته پس از زایمان، با مصرف گلوتامین و افزودن سطح پروتئین قابل متابولیسم به‌طور قابل توجهی کاهش یافت (به‌ترتیب $p = 0.0079$ و $p = 0.0027$).

نتیجه‌گیری: نتایج این آزمایش نشان داد که مصرف مکمل گلوتامین باعث بهبود وضعیت سلامت میش‌های آبستن تحت استرس گرمایی و بره‌های آن‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنش گرمایی، گلوتامین، سیستم ایمنی، شاخص‌های التهابی، میش آبستن

مقدمه

معنی‌دار در غلظت کل پروتئین و افزایش در غلظت پروتئین شوک حرارتی^۱ در بزها در طی تنش گرمایی گزارش شد که ممکن است ناشی از افزایش در حجم پلاسما در نتیجه شوک گرمایی باشد که می‌تواند سبب کاهش در غلظت کل پروتئین پلاسما گردد (۱۴). طولانی شدن مواجهه با آفتاب کل پروتئین پلاسما، آلبومین و گلوبولین را افزایش داد که این ممکن است ناشی از انقباض عروق و کاهش حجم پلاسما در طی تنش گرمایی باشد (۲۲).

تنش گرمایی و درجه حرارت بالای بدن می‌تواند به سد اپیتلیوم روده آسیب برساند. آسیب اپیتلیوم روده منجر به التهاب موضعی می‌شود، که بیشتر سبب اختلال اتصالات محکم می‌شود. در نهایت، تنش گرمایی نفوذپذیری به محتوای لومینال از جمله به باکتری، اجزای باکتریایی و سمومی مانند اندوتوکسین‌ها را افزایش می‌دهد که منجر به افزایش غلظت لیپو پلی ساکراید^۲ در خون باب کبدی و عمومی می‌شود (۴۲). نشأت محتویات لومینال به خون باب کبدی و در

نشخوارکنندگان کوچک (گوسفند و بز) در معرض انواع مختلف عوامل تنش‌زا، یعنی تنش فیزیکی، تغذیه‌ای، شیمیایی، فیزیولوژیک و تنش گرمایی قرار دارند. در میان همه، تنش گرمایی در حال حاضر با توجه به تغییرات اقلیمی نگران‌کننده‌ترین است. تنش گرمایی سبب تولید نوعی از پاسخ‌های پیچیده فیزیولوژیک در بدن می‌شود. دمای محیطی بالا به‌طور بالقوه چندین عارضه فیزیولوژیک دارد که منجر به زیان اقتصادی زیادی در صنعت پرورش گوسفند و بز می‌شود که شامل اختلالات عملکردی تولید مثل، ضعف سیستم ایمنی، بروز التهاب، عدم تعادل الکترولیتی، کاهش مصرف غذا و کاهش کیفیت لاشه می‌باشد. همچنین سبب کاهش تولید شیر، باروری ضعیف، نرخ بره‌زایی پایین‌تر، افزایش چربی، کاهش توده عضلانی و نهایتاً بیماری و مرگ و میر می‌شود (۶). تنش گرمایی سبب اختلال در واکنش‌های آنزیمی، ترشحات هورمونی و متابولیت‌های خون می‌شود. کاهش

اسیدآمینه محدودکننده است (۲۹). نشخوارکنندگان در تابستان به دلیل کمبود بافر شکمبه ناشی از تنش گرمایی، افزایش سرعت تنفس، آلكالوز تنفسی و غلظت پایین بی کربنات خون، در معرض خطر بیشتری برای اسیدوز هستند (۲۷). اسیدوز شکمبه به خودی خود می تواند عملکرد سد روده را مختل کند. در اسیدوز متابولیکی کلیه ها گلوتامین خون را به منظور تولید NH_3 حذف کرده و H^+ به شکل NH_4^+ دفع می شود، و بدین ترتیب یون بی کربنات تولید می شود. بنابراین برای حذف این بار اسیدی نیاز است تا گلوتامین به آسانی در دسترس کلیه ها قرار گیرد. قابلیت دسترسی گلوتامین با دفع آمونیاک محدود می شود، بنابراین گلوتامین در کنترل اسیدوز متابولیک نیز اهمیت دارد (۲۷).

شناسایی راهبردهای مدیریت تغذیه ای برای کاهش فوری حساسیت به تنش گرمایی بدون تأثیر منفی بر صفات تولیدی و سلامت دام بسیار ارزشمند خواهد بود. تاکنون توجه کمتری به مدیریت تنش گرمایی و اثرات نامطلوب تنش گرمایی در گوسفندان و بزها شده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثرات افزودن اسید آمینه گلوتامین و سطح پروتئین قابل متابولیسم به عنوان ابزاری برای کاهش اثرات مضر تنش گرمایی بر سیستم ایمنی و شاخص های التهابی در دوره انتقال در میش دشتی آبستن و پاسخ های ایمنی بره های متولد شده می باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش ۲۰ رأس میش نژاد زل، همزمان سازی شده فعلی با روش اسفنج گذاری داخل واژنی و تلقیح شده همزمان، با سنین مشابه (۲ تا ۳ سال) به مدت ۲۱ روز در سه هفته پایانی آبستنی تحت تأثیر تنش گرمایی و چهار تیمار آزمایشی قرار گرفتند و اثر آن بر عملکرد سیستم ایمنی و شاخص های التهابی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش با دو سطح پروتئین قابل متابولیسم (برابر و ۱۰ درصد بیشتر از احتیاجات انجمن تحقیقات ملی (۳۹)) و دو سطح مکمل گلوتامین (صفر و یک درصد جیره) اجرا شد. گلوتامین به شکل L- گلوتامین به عنوان مکمل به صورت پودر مورد استفاده قرار گرفت. برای محافظت گلوتامین از تجزیه در شکمبه، گلوتامین با فرمالدهید یک درصد اسپری شد و برای ۷۲ ساعت در دمای اتاق خشک شد و باقیمانده فرمالدهید تبخیر شد (۵۱). احتیاجات انرژی قابل متابولیسم و پروتئین برای نگهداری و آبستنی با معادلات Cannas و همکاران (۲۰۰۴) برآورد شد (۱۰). آزمایش در مرداد ماه هنگامی که طی روز دمای محیط از ۳۰ درجه کاسته نخواهد شد (تحت تنش گرمایی) انجام شده است. متغیرهای محیطی دما و رطوبت نسبی در طی دوره آزمایش اندازه گیری و مقدار شاخص دمایی- رطوبتی (THI) مطابق معادله یوسف (۱۹۸۵) به شرح زیر محاسبه شد (۱۶):

$$\text{THI} = \text{Tdb} + (0.36 \times \text{Tdp}) + 41.2$$

که در این رابطه (Tdb) دمای خشک و (Tdp) دمای نقطه شبنم است. متغیرهای حرارتی محیطی دما، رطوبت نسبی در طول دوره مطالعه دارای محدوده ۲۴/۵ تا ۳۵/۵ درجه سانتی گراد و ۷۴/۱ تا ۸۴/۰ درصد است. دامها در قفس های

نهایت گردش خون عمومی سبب پاسخ التهابی می شود که می تواند اثرات مضر تنش گرمایی بر دام را افزایش دهد. تنش گرمایی می تواند منجر به تولید سیتوکین های پیش التهابی مانند اینترلوکین^۱ یا فاکتور نکروز دهنده ی تومور آلفا^۲ در گردش خون شود که التهاب را افزایش می دهد و در نهایت منجر به مقاومت به انسولین می شود (۴۲). سیتوکین ها، پپتیدها یا پروتئین هایی هستند که توسط سلول های سیستم ایمنی تولید و رها می شوند و واسطه ی تولید پاسخ های ایمنی هستند. در حالت کلی سیتوکین ها به دو دسته ی بزرگ پیش و ضد التهابی تقسیم می شوند. سیتوکین های پیش التهابی در ایجاد و پیشرفت التهاب دخیل هستند. سیتوکین هایی مانند اینترلوکین های ۶، ۱۸ و 1β از جمله سیتوکین های پیش التهابی هستند. سیتوکین های ضد التهابی در پاسخ به التهاب ترشح می شوند و عامل محدود کننده و معکوس کننده ی فرایند پیشرونده ی التهاب هستند. سیتوکین هایی مانند اینترلوکین های ۲، ۶ و ۱۰ در این دسته از سیتوکین ها قرار می گیرند (۳۲). پاسخ سلولی به افزایش نفوذپذیری روده طی تنش گرمایی، شامل فعال سازی عوامل شوک گرمایی، افزایش بیان پروتئین های شوک گرمایی، افزایش اکسیداسیون گلوکز و اسید آمینه، کاهش سوخت و ساز اسیدهای چرب، فعال سازی غدد و سیستم ایمنی از راه تراوش پروتئین شوک گرمایی می باشد (۱۳).

تنش گرمایی عملکرد سیستم ایمنی حیوان را تغییر و آن ها را به بیماری های عفونی حساس می کند. سیگنال تنش عمدتاً از طریق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- آدرنال عمل کرده و پاسخ ایمنی را تضعیف می کند. در سیستم ایمنی، در حالی که تکثیر لنفوسیت ها وابسته به گلوتامین است، غلظت های درون سلولی آن پایین است (در مقابل بافت های دیگر، همچون ماهیچه و کبد) (۱۱). در گوسفند، چالش اندوتوکسین باعث افزایش جریان پلاسمایی گلوتامین می شود، که به دنبال آن غلظت پلاسمایی کاهش می یابد (۴۷). در یک پژوهش پاسخ ها به چالش ۲۴ ساعته ناشی از تزریق لیپو پلی ساکراید اشرفیالکی (تزریق درون رگی دو نانوگرم در دقیقه به ازای هر کیلوگرم وزن زنده) در گوسفند ره گیری شد. تغییرات سریع در غلظت های اسیدآمینه در پلاسما بین ساعت ۶ و ۲۰ به اثبات رسید. تحت این شرایط غلظت گلوتامین پلاسما تا ۲۴ درصد کاهش یافت (۱۱).

گلوتامین به عنوان فراوان ترین اسیدآمینه موجود در خون دارای نقش های آنابولیکی و تحریکی متفاوتی همچون ساخت پروتئین ها، افزایش تعادل نیتروژنی، تحریک سیستم ایمنی، اثرات آنابولیکی و ضد کاتابولیکی بر روی عضلات، تنظیم و تعدیل گلوکز از مسیر گلوکونئوز، تولید اسیدهای آمینه شاخه دار، راه اندازی مسیرهای ترانس آمیناسیون و دامیناسیون و محرک ساخت پروتئین می باشد (۴۴). ثابت شده است که گلوتامین در بیوسنتز اسید نوکلئیک به منظور حمایت از تکثیر سلولی ضروری است (۴۴). در گوسفند، گلوتامین اثر حفاظتی خود را در مقابل اکسیداسیون کبدی اسید آمینه، به ویژه برای متیونین اعمال می کند. بدین ترتیب گلوتامین نقش آنابولیک خود را اعمال می کند زیرا متیونین در اغلب خوراک ها اولین

نتایج و بحث فراسنجه‌های خون

اثرات جیره‌های با سطوح مختلف پروتئین قابل متابولیسم و گلوتامین بر آلبومین، پروتئین کل و آلکالین فسفاتاز خون در جدول ۲ نشان داده شده است. اثرات تیمارها بر آلبومین خون در سه هفته، دو هفته و یک هفته مانده به زایش تفاوت‌های معنی‌داری را نشان نداد، ولی به‌طور کلی سطح آلبومین خون در گروه تغذیه شده با تیمارهای دارای سطوح بالاتر پروتئین و گلوتامین بیشترین مقدار بود و تیمار شاهد دارای کمترین سطح آلبومین بود. در روز زایش، سطح آلبومین خون در سطوح مختلف پروتئین تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی مکمل گلوتامین به‌طور معنی‌داری آن را افزایش داد و بیشترین مقدار آلبومین در تیمارهای دارای گلوتامین و گلوتامین به اضافه سطح بالاتر پروتئین مشاهده شد ($P=0.0024$).

در یک هفته پس از زایش، اثر تیمارها بر آلبومین معنی‌دار بود. به‌طوری که مصرف گلوتامین باعث افزایش غلظت آلبومین خون شد ($P<0.0001$). همچنین افزایش سطح پروتئین تأثیر معنی‌داری بر افزایش آلبومین داشت ($P=0.0004$). در یک هفته پس از زایش، بیشترین مقدار آلبومین در تیمار دارای گلوتامین و سطح بالاتر پروتئین مشاهده شد. در اغلب مطالعات انجام گرفته، پروتئین کل در حیوانات تحت تأثیر تنش گرمایی افزایش یافته است (۱ و ۴۳). در حالی که Helal و همکاران (۲۰۱۰)، با مطالعه‌ای که بر نژاد بز بلدی تحت تنش گرمایی انجام دادند کاهش در پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین را مشاهده کردند (۲۲). در برخی دیگر از مطالعات انجام شده با جیره‌های با پروتئین قابل متابولیسم^۱ بالا پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند (۳). در حالی که، Houdijk و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند جیره‌های با پروتئین قابل متابولیسم بالا (۱۳۰ در مقابل ۸۵ درصد احتیاجات) مقدار پروتئین کل و آلبومین را به‌طور معنی‌داری در ۳ هفته پایانی آبستنی افزایش دادند، ولی مقدار گلوبولین تغییری نکرد (۲۴).

غلظت آلبومین از عوامل اصلی در حفظ کارکردهایی همچون تنظیم فشار اسمزی، جابجایی مواد مغذی و آنزیم‌ها است. با توجه به نقش سم‌زدایی آلبومین و توانایی باند شدن با اسیدهای چرب غیر استریفیه^۲ علاوه بر بیلی روبین، غلظت بیشتر آلبومین در گاوهای تغذیه شده با مکمل گلوتامین ممکن است در کاهش التهاب در دوره پیش از زایش مؤثر باشد (۵۲). آلکالین فسفاتاز عملکردهای چند گانه عمومی در جذب چربی، حفاظت از عملکرد سد روده ای، تعیین ترکیب میکروبیوتا روده‌ای از طریق توانایی آن در دی فسفوریلات لیپو پلی‌ساکارید، مینراله کردن زیستی، تسهیل انتقال اسیدهای چرب بلند زنجیر، فسفات و کلسیم به داخل سلول، نقش پیش فعال‌سازی در مقابله با حمله اندوتوکسین باکتریایی، سنتز نوروترانسمیترها، تنظیم رشد و آپوپتوز در جنین را دارد (۹). در خصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز در هفته‌های سوم تا یک هفته پس از زایش در میان تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

انفرادی نگهداری و طی دو هفته به جایگاه و جیره عادت‌دهی شدند. جیره‌های آزمایشی براساس نرم افزار SRNS ورژن ۱.۹.۶۲۹۰ تنظیم و به‌صورت کاملاً مخلوط دو بار در روز در حد اشتها و به فاصله‌ی ۱۲ ساعت (۶:۰۰ صبح و ۶:۰۰ عصر) در اختیار دام‌ها قرار گرفت، همچنین آب به‌صورت آزاد همواره در اختیار دام‌ها قرار گرفت (جدول ۱). ترکیب شیمیایی اقلام خوراکی و جیره‌ها شامل درصد ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، عصاره اتری (۵)، لیاف نامحلول در شوینده خنثی و لیاف نامحلول در شوینده اسیدی (۵۳)، با استفاده از آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت اندازه‌گیری شدند (جدول ۱). خون‌گیری به‌صورت هفتگی پیش از تغذیه صبح از همه میش‌ها به‌وسیله لوله‌های خلاء دارای هپارین (ونوجکت) با سرسوزن ۲۰ در حدود پنج میلی‌لیتر از سیاهرگ گردنی انجام شد و بلافاصله به‌داخل یخ منتقل شده تا نمونه‌های خون به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شوند. نمونه‌های خون در ۳۵۰۰ دور برای ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای به‌دست آوردن پلاسما سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های پلاسما جمع‌آوری شده تا زمان آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. فراسنجه‌های خونی شامل آلبومین و پروتئین کل پلاسما، آلکالین فسفاتاز و مالون دی آلدید با کیت‌های مربوطه و با آنالیزر اتوماتیک اندازه‌گیری شدند. (۲۳). انسولین با استفاده از کیت‌های الایزا در دسترس تجاری و بر اساس پروتکل کیت (کیت‌های کمپانی رندوکس انگلستان) اندازه‌گیری شد. جهت ارزیابی پاسخ ایمنی و وضعیت التهاب عمومی، پس از تهیه گسترش خون و رنگ‌آمیزی شمارش تفریقی گلبول‌های سفید به صورت درصد انجام گرفت (۳۰). همچنین غلظت سیتوکین‌ها شامل اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱۰ با استفاده از کیت‌های الایزا مطابق با روش Caroprese و همکاران (۲۰۱۲) اندازه‌گیری شدند (۱۱). همچنین از کیت‌های الایزا مطابق با روش Caroprese و همکاران (۲۰۱۲) برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین G استفاده شد (۱۱).

این آزمایش به‌روش فاکتوریل ۲ در ۲ و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد.

سطوح فاکتور اول:

۱. برابر احتیاجات پروتئین انجمن ملی تحقیقات

(۲۰۰۷)

۲. ۱۰ درصد بیشتر از احتیاجات پروتئین انجمن ملی

تحقیقات (۲۰۰۷)

سطوح فاکتور دوم:

۱. بدون مکمل گلوتامین

۲. با مکمل گلوتامین (یک درصد جیره و یا ۰/۲ گرم

به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز)

مدل آماری آزمایش:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{(ij)} + \varepsilon_{(ijk)}$$

به‌طوری که: Y_{ijk} ارزش هر مشاهده در آزمایش؛ μ میانگین؛ A_i اثر فاکتور A؛ B_j اثر فاکتور B؛ $AB_{(ij)}$ اثر متقابل دو فاکتور A و B و $\varepsilon_{(ijk)}$ اثر خطای آزمایشی است. آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد (۴۵) و همچنین مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد (۱۷).

حالی که افزایش سطح پروتئین تأثیر معنی داری بر افزایش انسولین نشان نداد. در روز زایش نیز سطح انسولین با افزایش سطح پروتئین و مکمل گلوتامین نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش یافت ($P=0/0060$). به طوری که کمترین مقدار تیمار شاهد و بیشترین مقدار در تیمار دارای گلوتامین و سطح بالاتر پروتئین مشاهده شد. در یک هفته پس از زایش مصرف گلوتامین انسولین خون را افزایش داد ($P<0/0001$).

اثرات تیمارها بر هورمون انسولین در سه هفته و دو هفته مانده به زایش، تفاوت‌های معنی داری را نشان نداد (جدول ۳). ولی به طور کلی سطح انسولین خون در گروه تغذیه شده با تیمارهای دارای سطوح بالاتر پروتئین و گلوتامین بیشترین مقدار بود و تیمار شاهد دارای کمترین سطح انسولین بود. در یک هفته مانده به زایش، سطح انسولین خون در تیمار ۲ بیشترین و در تیمار شاهد کمترین مقدار بود ($P=0/0259$).

جدول ۱- درصد مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی میش آبستن

Table 1. Percentage of food ingredients and chemical composition of experimental diets for fattening lambs

جیره پایه با پروتئین در سطح احتیاجات Basic ration with protein at the level of needs	جیره با ۱۰ درصد پروتئین بیشتر از سطح احتیاجات Diet with 10% more protein than the level of needs	مواد خوراکی (درصد ماده خشک) Ingredients (% of DM)
23.50	25.30	یونجه خشک (Alfalfa hay)
22.59	20.88	کاه گندم (Wheat straw)
22.14	21.69	دانه جو (Barley grain)
22.14	19.43	دانه ذرت (Corn grain)
2.71	3.61	کنجاله سویا (Soybean meal)
5.51	7.68	سوس گندم (Wheat bran)
0.45	0.45	کربنات کلسیم (Calcium Carbonate)
0.45	0.45	مکمل معدنی و ویتامینی ^۱ (Mineral and Vitamin premix)
0.50	0.50	نمک (Salt)
		ترکیب شیمیایی (درصد)
89.81	90.07	ماده خشک (Dry matter)
11.07	11.95	پروتئین خام (Crude protein)
3.63	3.19	چربی خام (Ether extract)
8.95	8.32	خاکستر (Ash)
45.54	46.01	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (Neutral detergent fiber)
20.88	21.90	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (Acid detergent fiber)
30.81	30.53	کربوهیدرات غیر الیافی (Non fiber carbohydrates)
2.298	2.300	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری بر کیلوگرم) (Metabolizable energy (Mcal/kg))
2.54	2.54	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در روز) (Metabolizable energy (Mcal/day))
85.00	94.00	پروتئین قابل متابولیسم (گرم در روز) (Metabolizable protein (g/d))

^۱ یک کیلوگرم مکمل معدنی و ویتامینی دام شامل: ویتامین A (۵۰۰۰۰ واحد)، ویتامین D₃ (۱۰۰۰۰۰ واحد)، ویتامین E (۱۰۰ میلی گرم)، کلسیم (۱۹۶۰۰۰ میلی گرم)، فسفر (۹۰۰۰۰ میلی گرم)، سدیم (۷۱۰۰۰ میلی گرم)، آهن (۳۰۰۰ میلی گرم)، منگنز (۲۰۰۰ میلی گرم)، منیزیم (۲۰۰۰ میلی گرم)، مس (۳۰۰ میلی گرم)، روی (۳۰۰۰ میلی گرم)، کبالت (۱۰۰ میلی گرم)، ید (۱۰۰ میلی گرم)، سلنیم (۱ میلی گرم)

^۱One kilogram of Mineral and Vitamin mix composition: vitamin A (500000 IU), Vitamin D₃ (100000 IU), Vitamin E (100 mg), Calcium (196000 mg), Phosphor (90000 mg), sodium (71000 mg), Iron (3000 mg), Manganese (2000 mg), Magnesium (2000 mg), Copper (300 mg), Zinc (3000 mg), Cobalt (100 mg), Iodine (100 mg), Selenium (1 mg)

جدول ۲- اثر سطح پروتئین و مکمل گلوتامین بر برخی از فراسنجه‌های خونی میش‌های آبستن در وضعیت تنش گرمایی

Table 2. Effect of protein level and glutamine supplementation on some blood parameters of pregnant ewes in heat stress condition

احتمال معنی‌داری (P-value)				تیمارها (Treatments)				سطح پروتئین (Protein level)	
سطح پروتئین × گلوتامین (Protein level) (× Glutamine)	گلوتامین (Glutamine)	سطح پروتئین (Protein Level)	تیمار (Treatment)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	۱۰ درصد بالاتر (10 percent higher)	سطح پایه (Basal Level)	سطح پروتئین (Protein level)	سطح گلوتامین (درصد جیره) (Glutamine Level) %	
					یک (One)	صفر (Zero)	یک (One)	صفر (Zero)	(diet)
آلبومین (گرم در دسی لیتر) (Albumin (g/dl))									
0.5580	0.6384	0.5580	0.8111	0.172	3.25	3.30	3.27	3.05	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.6597	0.1680	0.3298	0.3761	0.196	3.67	3.45	3.55	3.12	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.7121	0.2790	0.5405	0.6222	0.157	3.75	3.50	3.65	3.40	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.4327	0.0024	0.2262	0.0120	0.046	4.30 ^a	3.80 ^b	4.07 ^{ab}	3.75 ^b	روز زایش (day of parturition)
0.0958	<0.0001	0.0004	<0.0001	0.037	4.55 ^a	4.05 ^b	4.25 ^b	3.40 ^c	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
پروتئین کل (گرم در دسی لیتر) (Total Protein (g/dl))									
0.5806	0.9195	0.4837	0.8352	0.937	7.32	7.55	7.25	6.92	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.9237	0.1675	0.1680	0.2803	1.045	8.50	7.85	7.80	7.00	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
1.0000	0.2047	0.5707	0.5629	0.735	8.35	7.77	8.10	7.52	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.4230	0.0009	0.2681	0.0055	0.204	9.62 ^a	8.45 ^b	9.17 ^a	8.37 ^b	روز زایش (day of parturition)
0.0271	<0.0001	0.0008	<0.0001	0.174	9.95 ^a	9.20 ^b	9.55 ^{ab}	7.75 ^c	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر) (Alkaline phosphatase (U/L))									
0.6008	0.4874	0.8608	0.8402	11.165	61.00	54.00	59.00	58.00	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.6413	0.7662	0.9661	0.9540	11.507	61.50	66.00	64.00	63.00	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.9656	0.6368	0.8294	0.9613	11.354	65.50	68.50	64.50	67.00	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.3620	0.9235	0.6328	0.7674	7.649	54.75	50.75	53.00	56.25	روز زایش (day of parturition)
0.2062	0.6456	0.8777	0.5823	6.360	64.00	69.75	67.75	65.00	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)

در هر سطر اعداد با حروف مشابه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ندارند.

In each row, the numbers with the same letters are not significantly different at the 0.05 level.

اکسیداتیو هستند که سطح رادیکال‌های آزاد در آن‌ها افزایش می‌یابد (۳۵). پراکسیداسیون چربی پدیده به‌شدت مخربی است و زمانی که گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) و رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه در غشای زیستی حمله می‌کنند به وقوع می‌پیوندد. مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون چربی است (۲۰). در مطالعه‌ای مهار پراکسیداسیون چربی به صورت تولید مالون دی آلدئید پایین‌تر در میش‌های تغذیه شده با بتائین مشاهده شد. مکمل بتائین در اواخر آبستنی مالون دی آلدئید را کاهش داد (۴۶).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل است که در طی متابولیسم اکسیداتیو در دوره آبستنی تولید می‌شود (۳۵). گلوکاتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز بخشی از سیستم دفاعی آنتی اکسیداتیو هستند که بافت‌ها را در مقابل تنش اکسیداتیو حفظ می‌کنند. سطح آنتی اکسیداتیو مناسب در طی پیش و پس از آبستنی برای کاهش مرگ جنین و بهبود زنده‌مانی بره‌های تازه متولد شده حیاتی است (۳۵). گلوکاتمین رونویسی ژن‌های مربوط به واکنش‌های آنتی اکسیداتیو در سلول‌های مختلف را تنظیم می‌کند (۵۴). به‌نظر می‌رسد که افزایش دسترسی به گلوکاتمین در روده و عبوری کردن آن برای جلوگیری از تخمیر آن در شکمبه می‌تواند اثر محافظتی بر اکسیداسیون متیونین و فیل‌آل‌آنین در کبد داشته باشد. واضح است که افزایش دسترسی متیونین می‌تواند سطوح فیزیولوژیکی سیستمین را افزایش داده و سطح گروه‌های سولفیدریل (SH) را در پلاسما بالا ببرد. همچنین گلوکاتمین در ساختار گلوکاتایون پراکسیداز که یکی از عناصر مهم سازنده سیستم آنتی اکسیداتیو است نقش اساسی دارد. گلوکاتایون به‌طور عمده به صورت *de novo* در کبد از گلوکاتامات، گلیسین و سیستمین ساخته می‌شود. گلوکاتمین به عنوان پیش‌ساز گلوکاتامات و با جلوگیری کردن از اکسیداسیون متیونین می‌تواند اثرات مثبتی بر افزایش سیستمین داشته باشد (۵۱).

ایمونوگلوبولین G

اثرات تیمارها بر ایمونوگلوبولین G خون در ۲۱ روز مانده به زایش، تفاوت‌های معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۴). در حالی که دو هفته مانده به زایش، اثرات تیمارها معنی‌دار بود (P=۰/۰۴۴۷) به‌گونه‌ای که سطح ایمونوگلوبولین G خون در گروه تغذیه‌شده با تیمارهای دارای سطوح بالاتر پروتئین و گلوکاتمین بیشترین مقدار بود و تیمار شاهد دارای کمترین سطح ایمونوگلوبولین G بود. یک هفته قبل از زایش، سطح ایمونوگلوبولین G خون در سطوح مختلف پروتئین تفاوت نداشت ولی مکمل گلوکاتمین آن را افزایش داد و بیشترین مقدار ایمونوگلوبولین G در تیمارهای ۲ و ۴ مشاهده شد (P=۰/۰۰۰۲). در روز زایش، اثرات تیمارها بر ایمونوگلوبولین G خون میش‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱). همچنین اثر سطح پروتئین و گلوکاتمین بر ایمونوگلوبولین G معنی‌دار بود.

در یک هفته پس از زایش، بیشترین مقدار انسولین در تیمار دارای گلوکاتمین و سطح بالاتر پروتئین و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد مشاهده شد.

افزایش تقاضای انرژی همراه با کاهش مصرف خوراک در دوره خشکی شروع می‌شود که به‌دنبال آن بسیج چربی از ذخایر بدنی به شکل اسیدهای چرب غیر استریفیه برای تأمین احتیاجات انرژی اتفاق می‌افتد (۱۹). مقاومت به انسولین همراه با کاهش غلظت انسولین پلاسما در دوره پیش از زایش منجر به بالا رفتن غلظت اسیدهای چرب غیر استریفیه پلاسما و ذخیره چربی به داخل کبد می‌تواند سبب بروز عارضه کبد چرب و کتوزیس گردد (۱۹).

در طی دوره توازن منفی انرژی غلظت گلوکز، انسولین و فاکتور ۱ رشد مشابه انسولین کاهش می‌یابد (۱۹). Sporleder (۱۹۹۸) گزارش کرد که حساسیت به انسولین در گوسفند در اواخر آبستنی با کاهش نرخ تغییر و تبدیل گلوکز و کاهش جذب (Intake) از طریق ماهیچه و بافت چربی کاهش می‌یابد (۵۰). به‌نظر می‌رسد مکمل‌سازی میش‌ها با گلوکاتمین محافظت شده تولید اسیدهای آمینه گلوکوژنیک به‌منظور فراهم کردن گلوکز در اواخر آبستنی را افزایش می‌دهد. افزایش غلظت گلوکاتمین پلاسما می‌تواند فعالیت ژن پروتئین کیناز mTOR را افزایش دهد. این پروتئین رشد، تمایز، زنده‌مانی و حرکت سلول و سنتز پروتئین درون سلولی را تنظیم می‌کند (۵۵). بنابراین افزایش غلظت خارج سلولی گلوکاتمین می‌تواند ساخت پروتئین را تحریک کرده و از تجزیه پروتئین عضلات بدن جلوگیری نماید (۵۴). همچنین گلوکاتمین ممکن است افزایش تولید و تجمع پروتئین در بافت‌های بدن و رشد دام را از طریق تحریک ترشح هورمون‌های آنابولیکی مانند انسولین و جلوگیری از تولید گلوکوکورتیکوئیدها اعمال کند (۵۵).

اثرات تیمارها بر مالون دی آلدئید در سه هفته و دو هفته مانده به زایش، تفاوت‌های معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳). در یک هفته مانده به زایش، سطح مالون دی آلدئید خون در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت (P=۰/۰۲۰۲). در حالی که افزایش سطح پروتئین و اثر متقابل سطح پروتئین و گلوکاتمین اثر معنی‌داری بر افزایش مالون دی آلدئید نشان ندادند. در روز زایش، سطح مالون دی آلدئید خون در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت (P=۰/۰۱۲۳). به‌طوری که بیشترین مقدار مربوط به تیمار شاهد و کمترین مقدار مربوط به تیمار دارای گلوکاتمین و سطح بالاتر پروتئین بود. در یک هفته پس از زایش نیز اثر تیمارها بر مالون دی آلدئید معنی‌دار بود (P=۰/۰۲۱۷). مکمل‌سازی گلوکاتمین مالون دی آلدئید خون را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P=۰/۰۰۵۷). در حالی که افزایش سطح پروتئین تأثیر معنی‌داری بر کاهش مالون دی آلدئید نشان نداد. در یک هفته پس از زایش، بیشترین مقدار مالون دی آلدئید در تیمار شاهد و کمترین مقدار در تیمار دارای گلوکاتمین و سطح بالاتر پروتئین مشاهده شد.

در طی آبستنی، هم مادر و هم جنین در معرض تنش

جدول ۳- اثر سطح پروتئین و مکمل گلوتامین بر برخی از فراسنجه‌های خونی میش‌های آبستن در وضعیت تنش گرمایی

Table 3. Effect of protein level and glutamine supplementation on some blood parameters of pregnant ewes in heat stress condition

سطح معنی‌داری (P-value)					تیمارها (Treatments)				سطح پروتئین (Protein level) سطح گلوتامین (درصد جیره) (% diet)(Glutamine Level)
Protein) سطح پروتئین × گلوتامین (level × Glutamine)	گلوتامین (Glutamine)	سطح پروتئین (Protein Level)	تیمار (Treatment)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	۱۰ درصد بالاتر (10 percent higher)		سطح پایه (Basal Level)		
					یک (One)	صفر (Zero)	یک (One)	صفر (Zero)	
انسولین (میکرو واحد در میلی لیتر) (Insulin (μIU/ml))									
0.7967	0.2903	0.6439	0.6854	0.225	2.67	3.00	2.62	2.82	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.4085	0.6529	0.8466	0.8049	0.143	2.50	2.25	2.37	2.45	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.0614	0.0176	0.2520	0.0259	0.084	2.60 ^a	2.50 ^a	2.72 ^a	2.02 ^b	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.0060	<0.0001	0.0004	<0.0001	0.119	3.60 ^a	3.00 ^b	3.35 ^{ab}	1.60 ^c	روز زایش (day of parturition)
0.0011	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.182	3.75 ^a	3.30 ^a	3.52 ^a	1.25 ^b	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
مالون دی آلدئید (نانومول در میلی لیتر) (Malondialdehyde (nmol/ml))									
0.5679	0.4270	0.8183	0.7840	0.181	2.50	2.80	2.57	2.62	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.8066	0.4672	0.9349	0.8868	0.089	2.57	2.50	2.60	2.45	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.9432	0.0030	0.4392	0.0202	0.218	2.17 ^c	2.80 ^{ab}	2.30 ^{bc}	2.95 ^a	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.5608	0.0301	0.4045	0.0123	0.141	1.52 ^b	2.10 ^{ab}	1.80 ^{ab}	2.15 ^a	روز زایش (day of parturition)
0.7274	0.0057	0.1266	0.0217	0.322	1.35 ^b	1.87 ^{ab}	1.57 ^b	2.22 ^a	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)

در هر سطر اعداد با حروف مشابه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ندارند.

In each row, the numbers with the same letters are not significantly different at the 0.05 level.

بر توانایی گوساله در جذب ایمونوگلوبولین G از آغاز اثر منفی داشته باشد (۲). تنش گرمایی، هورمون‌های گرمایز متابولیسم و سرکوب‌گر سیستم ایمنی همچون هورمون رشد و گلوکوکورتیکوئیدها را کاهش می‌دهد (۱۳).

بره‌های تازه متولد شده دارای کمبود گاما گلوبولین می‌باشند. زیرا هیچ آنتی‌بادی از طریق جفت از مادر به جنین منتقل نمی‌شود. بنابراین، کاملاً وابسته به ایمنی غیرفعال به دست آمده از طریق مادر بعد از تولد می‌باشند که این ایمنی از طریق مصرف آغاز به‌دست می‌آید. ایمونوگلوبولین‌های آغاز به‌طور ویژه ایمونوگلوبولین G توانایی جذب از روده نوزادان را دارند که به این ترتیب مولکول‌های ایمونوگلوبولین بدون محدودیت عبور کرده و ایمنی غیرفعال بره‌های تازه متولد شده را فراهم می‌کند (۸). بنابراین ضروریست در اواخر آبستنی مقادیر کافی پروتئین از طریق جیره برای تولید آغاز با کیفیت بالا فراهم شود. تغذیه گوسفند آبستنی کمتر از احتیاجاتش می‌تواند اثرات مخربی بر جنین و بره‌های تازه متولد شده و ذخیره چربی جنین که مورد استفاده بعد از تولد می‌باشد، تکامل و بازسازی پستان و تولید آغاز و شیر بگذارد (۱۸). در طی دو ماه پایانی آبستنی ۸۰ درصد رشد جنین اتفاق می‌افتد که منجر به افزایش معنی‌دار احتیاجات مواد مغذی در میش می‌گردد (۸). بنابراین، تغذیه مراحل پایانی آبستنی در گوسفند و بز یکی از فاکتورهای خیلی مهم مؤثر بر کیفیت بره پس از تولد است. در این آزمایش با افزودن مکمل گلوتامین و افزایش سطح پروتئین قابل متابولیسم نتایج قابل انتظار به‌دست آمد که در توافق با نتایج پژوهش Boucher (۲۰۱۴) بود.

Boucher (۲۰۱۴) گزارش کرد که احتیاجات مواد مغذی میش‌ها در طی اواخر آبستنی به‌علت افزایش رشد جنین به شدت افزایش می‌یابد (۸). موافق با این آزمایش Ocak و همکاران (۲۰۰۵) اظهار داشتند، در صورت تأمین مقادیر کافی پروتئین جیره در اواخر آبستنی میش‌ها، آغاز با کیفیت بالا تولید می‌شود (۴۰). در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که غلظت ایمونوگلوبولین G آغاز در میش‌های تغذیه شده با پودر ماهی بالاترین است. در حالی که غلظت ایمونوگلوبولین G قبل از زایمان تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت (۲۶). غلظت ایمونوگلوبولین G سرم پس از زایمان در میش‌های تغذیه شده با پودر ماهی نسبت به دیگر میش‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و تیمار شاهد کمترین مقدار را داشت (۲۶).

O, Doherty و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که مکمل‌سازی جیره میش‌ها با منابع پروتئینی همچون کنجاله سویا در اواخر آبستنی تولید آغاز را تا ۱۸ ساعت پس از زایش افزایش می‌دهد (۴۱). در پژوهشی دیگر، مکمل‌سازی جیره میش‌ها با ترکیبی از پودر ماهی و سویای اکسترو شده غلظت ایمونوگلوبولین G را افزایش می‌دهد، که می‌تواند ناشی از بهبود پروفایل اسیدهای آمینه جیره باشد. ایمونوگلوبولین G عمده‌ترین ایمونوگلوبولین در آغاز می‌باشد و مسئول پاکسازی پاتوژن‌ها و حفاظت از نوزادان می‌باشد (۴۰).

(به‌ترتیب $P=0.0053$ و $P<0.0001$). یک هفته پس از زایش، سطح ایمونوگلوبولین G خون با افزایش سطح پروتئین و مکمل گلوتامین نسبت به تیمار شاهد (تیمار ۱) افزایش یافت ($P=0.0007$).

ایمونوگلوبولین G آغاز بدست آمده از میش‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<0.0001$). همچنین اثر سطح گلوتامین و سطح پروتئین بر ایمونوگلوبولین G آغاز میش‌ها معنی‌دار بود (به‌ترتیب $P<0.0001$ و $P=0.0366$). اثرات تیمارها بر ایمونوگلوبولین G خون بره‌ها یک هفته پس از زایش معنی‌دار بود ($P<0.0001$). به‌طوری که بره‌های متولد شده از میش‌های تیمار دارای گلوتامین و سطح بالاتر پروتئین دارای بیشترین مقدار ایمونوگلوبولین G در خون بودند. مکمل‌سازی گلوتامین در جیره میش‌ها ایمونوگلوبولین G خون بره‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P<0.0001$). در حالی که افزایش سطح پروتئین تأثیر معنی‌داری بر افزایش ایمونوگلوبولین G بره‌ها نشان نداد. زمانی که دمای محیطی و رطوبت بالا می‌رود، سیستم غدد درون‌ریز گاو به سمت تعدیل آن گرایش پیدا می‌کند که برای این منظور اتلاف حرارتی افزایش می‌یابد. به‌ویژه کورتیزول و پرولاکتین به‌عنوان هورمون‌های مؤثر بر سیستم ایمنی می‌باشد که با تنش گرمایی افزایش می‌یابد (۱۳). Collier و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که پرولاکتین و کورتیزول مؤثر بر ژن‌های مسئول پاسخ ایمنی می‌باشند، به خصوص پروتئین شوک گرمایی که می‌تواند اثر منفی دماهای شدید بر سطح سلول را محدود کند (۱۳). بنابراین به دنبال تنش گرمایی عملکرد ایمنی به علت بر هم‌کنش‌های بین سیستم اندوکراین و ایمنی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تنش گرمایی به‌طور مستقیم بر عملکرد ایمنی طی دوره خشکی گاوها و متعاقباً پس از زایش تأثیر دارد. به عنوان مثال؛ عملکرد ایمنی اکتسابی همچون ظرفیت تکثیر لنفوسیت‌ها مستقیماً با تنش گرمایی سرکوب می‌شود. همچنین شواهد نشان می‌دهند که تنش گرمایی مستقیماً تولید آنتی‌بادی را کاهش می‌دهد (۳۳).

تنش گرمایی گاوها در انتهای دوره آبستنی، سبب می‌شود غلظت ایمونوگلوبولین گوساله‌ها در طول یک ماه اول زندگی کاهش یابد که همراه با اثرات منفی بر سلامتی و زنده ماندن گوساله‌ها است (۲). مطالعات متعدد کاهش در غلظت‌ها ایمونوگلوبولین G را نشان داد زیرا جذب ایمونوگلوبولین G از کلوستروم ضعیف‌تر شد (۳۳). بنابراین به نظر می‌رسد تنش گرمایی توانایی جذب ایمونوگلوبولین G را کاهش می‌دهد که می‌تواند به علت بسته شدن سریعتر منافذ روده ای باشد (۲). تنش گرمایی شدید غلظت ایمونوگلوبولین G و ایمونوگلوبولین A را در آغاز گاوهای پس از زایش نخست، به طرز چشمگیری کاهش داد. کاهش حرکت ایمونوگلوبولین G از جریان خون به سمت پستان گاو در شرایط تنش گرمایی، منجر به اختلال در واکنش ایمنی پلاسموسیت‌های غده‌ی پستان در فرایند ساخت ایمونوگلوبولین A می‌شود (۳۳). تنش گرمایی خیلی شدید می‌تواند بر توانایی گاو در تولید آغاز با کیفیت بالا و همچنین

جدول ۴- اثر سطح پروتئین و مکمل گلوتامین بر ایمونوگلوبولین G میش‌های آبستن، بره‌های متولد شده و آغوز در وضعیت تنش گرمایی

Table 4. Effect of protein level and glutamine supplementation on immunoglobulin G of pregnant ewes, born lambs and colostrum in heat stress condition

سطح معنی‌داری (P-value)					تیمارها (Treatments)				
سطح پروتئین × گلوتامین (Protein × Glutamine level)	گلوتامین (Glutamine)	سطح پروتئین (Protein Level)	تیمار (Treatment)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	۱۰ درصد بالاتر (10 percent higher)		سطح پایه (Basal Level)		سطح پروتئین (Protein level)
					یک (One)	صفر (Zero)	یک (One)	صفر (Zero)	سطح گلوتامین (درصد جیره) (% diet)(Glutamine Level)
IgG میش آبستن (نانوگرم در میلی لیتر) (pregnant ewe IgG (ng/ml))									
0.2726	0.4638	0.6136	0.5584	0.1760	3.22	3.62	3.36	3.27	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.4390	0.0593	0.0312	0.0447	0.285	4.56 ^a	4.22 ^a	4.13 ^{ab}	3.36 ^b	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.3026	<0.0001	0.2619	0.0002	0.159	6.10 ^a	4.98 ^b	6.08 ^a	4.54 ^b	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.0243	<0.0001	0.0053	<0.0001	0.176	7.76 ^a	6.58 ^b	7.59 ^a	5.33 ^c	روز زایش (day of parturition)
0.0446	0.0003	0.0788	0.0007	0.385	7.71 ^a	6.81 ^b	7.81 ^a	5.52 ^c	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
IgG بره های متولد شده (نانوگرم در میلی لیتر) (IgG of born lambs (ng/ml))									
0.4480	<0.0001	0.8454	<0.0001	0.161	5.20 ^a	3.45 ^b	5.08 ^a	3.65 ^b	یک هفته بعد از تولد (A week after birth)
IgG آغوز (نانوگرم در میلی لیتر) (Colostrum IgG (ng/ml))									
0.2029	<0.0001	0.0366	<0.0001	0.048	4.76 ^a	3.51 ^c	4.35 ^b	3.40 ^c	تا ۱۲ ساعت پس از زایش Up to 12 hours after parturition

در هر سطر اعداد با حروف مشابه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ندارند.

In each row, the numbers with the same letters are not significantly different at the 0.05 level.

گلبول‌های سفید خون

ال گلوتامین در تمایز سلول‌های B به سلول‌های تولید کننده آنتی‌بادی نقش دارد، با افزایش سطح گلوتامین تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن افزایش می‌یابد؛ که با نتایج پژوهش حاضر هماهنگ است. از آنجایی که بیان ایمونوگلوبین‌های G و A وابسته به سلول T یاریگر هستند و گلوتامین تعداد سلول‌های Th را افزایش می‌دهد، بنابراین انتظار بر این است که گلوتامین غلظت ایمونوگلوبین‌های G و A را افزایش دهد (۵۴).

گاوه‌های شیری پرتولید به‌ویژه در دوره انتقالی بیش از یک کیلوگرم پروتئین شیر در روز تولید می‌کنند که بیش از ۳۰ درصد جریان پروتئینی پلاسما است (۷). توازن منفی انرژی و پروتئین در طی دوره انتقالی در گاوه‌های شیری سبب می‌شود که گاوها شرایط التهابی را تجربه کنند و پاسخ‌های ایمنی عمومی همچون ایمنی ذاتی (فاگوسیتوز) و اکتسابی (ترشح ایمونوگلوبین) و پاسخ فاز حاد فعال می‌شود (۴). احتیاجات اسیدهای آمینه برای ساخت پروتئین به‌ویژه گلوتامین و فنیل آلانین در پاسخ فاز حاد افزایش می‌یابد (۷).

در طی دوره انتقالی، معمولاً سرکوب سیستم ایمنی اتفاق می‌افتد و دام‌ها حساسیت بیشتری به برخی از بیماری‌ها نشان می‌دهند. تعدادی از اجزا و عملکرد سیستم دفاعی میزبان همچون عملکرد نوتروفیل‌ها، حساسیت لنفوسیت‌ها به تحریک میتوز، پاسخ‌های آنتی‌بادی و تولید سیتوکین‌ها توسط سلول‌های ایمنی در طی این دوره تغییر می‌کنند (۴۸). عملکرد ناقص نوتروفیل پیش از زایمان منجر به وقوع ورم پستان، عفونت رحمی و جفت ماندگی در گاوه‌های شیری می‌شود (۲۱). با افزایش استفاده از NADPH در تنش اکسیداتیو، توانایی نوتروفیل‌ها برای تخریب میکروب‌ها کاهش می‌یابد و سیستم ایمنی سرکوب می‌شود (۲۱).

اثرات تیمارها بر تعداد گلبول‌های سفید خون در سه هفته و دو هفته قبل از زایش تفاوت‌های معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۵). در حالی که یک هفته مانده به زایش، اثرات تیمارها معنی‌دار بود ($P=0/0118$) به‌گونه‌ای که تعداد گلبول‌های سفید خون در گروه تغذیه‌شده با تیمار دارای سطوح بالاتر پروتئین و گلوتامین بیشترین و در تیمار شاهد دارای کمترین تعداد بود. در روز زایش، اثرات تیمارها بر گلبول‌های سفید خون میش‌ها معنی‌دار بود ($P=0/0173$). اثر سطح پروتئین و گلوتامین بر درصد نوتروفیل در سه هفته و دو هفته قبل از زایش معنی‌دار نبود. در حالی که یک هفته مانده به زایش اثرات تیمارها معنی‌دار بود ($P=0/0013$). به‌گونه‌ای که سطح نوتروفیل خون در تیمار دارای ۱ درصد گلوتامین کمترین مقدار و در تیمار شاهد دارای بیشترین سطح نوتروفیل بود. یک هفته قبل از زایش، سطح نوتروفیل خون در سطوح مختلف پروتئین تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی مکمل گلوتامین آن را کاهش داد ($P=0/0003$). در روز زایش، بیشترین مقدار نوتروفیل در تیمار شاهد و کمترین مقدار نوتروفیل در تیمار دارای ۱ درصد گلوتامین مشاهده شد ($P=0/0005$). همچنین اثر سطح گلوتامین و اثرات متقابل بر نوتروفیل میش‌ها معنی‌دار بود (به‌ترتیب $P=0/0001$ و

$P=0/0013$). در یک هفته پس از زایش نیز اثر تیمارها بر سطح نوتروفیل معنی‌دار بود ($P=0/0005$). مکمل‌سازی گلوتامین نوتروفیل خون را کاهش داد ($P=0/0001$).

اثرات تیمارها بر درصد لنفوسیت خون در سه هفته و دو هفته مانده به زایش تفاوت‌های معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۵). در حالی که در یک هفته مانده به زایش، سطح لنفوسیت خون در گروه تغذیه‌شده با مکمل گلوتامین بیشترین مقدار بود و تیمار شاهد دارای کمترین سطح لنفوسیت بود ($P<0/0001$). در روز زایش، سطح لنفوسیت خون در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت ($P=0/0001$). در حالی که افزایش سطح پروتئین تأثیر معنی‌داری بر افزایش لنفوسیت نشان نداد، ولی مکمل‌سازی گلوتامین و اثرات متقابل سطح پروتئین و گلوتامین به‌طور معنی‌داری سهم لنفوسیت در گلبول‌های سفید را افزایش داد (به‌ترتیب $P<0/0001$ و $P=0/0045$). در یک هفته پس از زایش، سهم لنفوسیت با افزایش سطح پروتئین و مکمل گلوتامین نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (به‌ترتیب $P=0/0045$ و $P=0/0003$). به‌طوری که کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد و بیشترین مقدار مربوط به تیمار دارای گلوتامین و سطح بالاتر پروتئین بود. این نتایج موافق با مطالعات Wu و همکاران (۲۰۲۲) می‌باشد. آنها بیان کردند که مکمل‌سازی گلوتامین در جیره بره‌های پرواری وزن طحال، تیموس و روده کوچک (اندام‌های ایمنی‌زا) را افزایش داد. همچنین تکثیر و فعالیت لنفوسیت‌های B و T و تعداد کل گلبول‌های سفید خون نیز افزایش یافت (۵۵). سهم ائوزنوفیل‌ها در گلبول‌های سفید خون در دوره‌های قبل از زایش، روز زایش و پس از زایش به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت.

تنش ممکن است اثرهای دو جانبه بر پاسخ ایمنی داشته باشد. تنش کوتاه مدت ممکن است تعدیل‌کننده و یا افزایش‌دهنده پاسخ ایمنی باشد، اما تنش بلند مدت می‌تواند سرکوب‌کننده ایمنی باشد. بنابراین، پاسخ ایمنی یک جانور به تنش به نوع تنش ایجاد شده وابسته است (کوتاه مدت در برابر بلند مدت). در تنش کوتاه مدت، هورمون‌های مرتبط با آغاز پاسخ سیستم ایمنی با شیوه‌ای که بالقوه برای مقابله با تهاجم عوامل بیماری‌زا و به دنبال آن عفونت آماده می‌شوند، آزاد می‌شوند، اما در تنش بلند مدت اثر هورمون‌های تنش بر سیستم ایمنی، دیگر اولیه و مقدماتی نیست، بلکه از نوع سرکوب‌کننده است که ابتدا در سطح سلولی و در نهایت در کل سیستم ایمنی بدن رخ می‌دهد (۵۷).

تنش گرمایی اثرات منفی بر مهاجرت لکوسیت‌ها به داخل غده پستانی دارد. زمانی که گاوه‌های شیری در معرض دما و رطوبت بالا قرار می‌گیرند (THI بالا)، تعداد لکوسیت‌ها کاهش می‌یابد. همچنین سیتوکین‌های در چرخه شامل فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور آلفا و اینترلوکین ۱۰ نیز کاهش می‌یابد (۵۷). میش‌های شیرده تحت تنش گرمایی تعداد لکوسیت کمتری دارند و بار میکروبی در شیرشان افزایش می‌یابد با قرارگیری دام در معرض دمای محیطی بالا، هم اندام‌های لیمفوییدی اولیه و هم اندام‌های لیمفوییدی ثانویه دچار

حیاتی از جمله گلوآتایون (GSH) و متابولیسم آن در شرایط مطلوب نقش اساسی دارند. نوتروفیل‌ها از پروتئین‌های ساختاری استفاده می‌کنند که دارای کروماتین و عوامل ضد میکروبی موسوم به تله‌های خارج سلولی نوتروفیل (NET) هستند.

به علاوه، گلوتامین توسط ماکروفاژها برای تولید آرژنین و به تبع آن، ساخت نیتریک اکساید از راه فعالیت آنزیم لاکتاند ساخت نیتریک اکساید (iNOS) با استفاده از NADPH، به عنوان منبع انرژی استفاده می‌شود. نیتریک اکساید یک واسطه قدرتمند در ایمنی ذاتی و اکتسابی است (۱۵). در نوتروفیل، گلوتامین با فعالیت NADPH اکسیداز تولید سوپر اکسید را تقویت می‌کند. پژوهش‌های متعدد نشان داده است که متابولیسم گلوتامین نقش مهمی در فعال شدن لنفوسیت‌ها دارد. برای انجام فعالیت سریع تکثیر تا مقداری مشخص، فعالیت لنفوسیت‌ها از فسفوریلاسیون اکسیداتیو به گلیکولیز (هوازی) و گلوتامینولیز تغییر می‌کند و بنابراین، به طور قابل توجهی مصرف گلوتامین و گلوکز را بالا می‌برند. متابولیت‌های مختلف چرخه کربس، که در طی متابولیسم گلوتامین و گلوکز تولید می‌شوند، مانند سیترات، فومارات و سوکسینات، در کنترل التهاب و ایمنی در هر دو ایمنی اکتسابی و ذاتی شرکت می‌کنند (۳۱).

شاخص‌های التهابی

التهاب یکی از نشانه‌ها و اولین پاسخ سیستم ایمنی بدن به عفونت است. التهاب موضعی که در محل عفونت ایجاد می‌شود، پاسخ فاز حاد را ایجاد می‌کند. این امر با انتشار سیتوکین‌های التهابی، به ویژه اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶ و فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور آلفا از ماکروفاژ یا مونوسیت‌های خون در محل ضایعات التهابی یا عفونت ایجاد می‌شود. عفونت‌های باکتریایی می‌توانند پاسخ التهابی را با اتصال به گیرنده‌های سیستم ایمنی ذاتی ایجاد کنند (۳۴). سیتوکین‌ها تنظیم کننده‌های اصلی پاسخ التهابی هستند. گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن به عنوان مولکول‌های پیام‌دهی که سبب تولید سیتوکین می‌شود، از راه فعال سازی مسیر NF- κ B عمل می‌کند. علاوه بر این، پیام‌دهی التهابی نیز توسط لیپو پلی‌ساکاریدها فعال می‌شود (۳۴). در جریان التهاب، میانجی‌های مختلفی توسط سلول‌های سیستم ایمنی، همانند سیتوکین‌های پیش التهابی مانند فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور آلفا و اینترلوکین ۶ ترشح می‌شود که باعث تشدید پاسخ ایمنی می‌گردد.

در این پژوهش اثر افزودن گلوتامین و سطح پروتئین بر اینترلوکین ۲، ۶ و ۱۰ در سه و دو هفته پیش از زایش معنی‌دار نبود (جدول ۶). همچنین در یک هفته پیش از زایش اثرات تیمارها بر اینترلوکین ۲ و ۶ معنی‌دار نبود در حالی که اینترلوکین ۱۰ به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P=0/0428$). در روز زایش و یک هفته پس از زایش مقدار اینترلوکین ۲ به طور معنی‌داری با افزودن گلوتامین به جیره افزایش یافت (به ترتیب $P=0/0132$ و $P=0/0138$). به طوری که تیمار شاهد کمترین مقدار و تیمار دارای گلوتامین و سطح بالاتر پروتئین بیشترین مقدار اینترلوکین ۲ را داشتند.

کاهش وزن می‌شوند، الگوی لکوسیت‌های گردش خون اثر منفی می‌پذیرد، سلول‌های T⁺CD4 و T⁺CD8 در خون کاهش می‌یابند، همچنین، کاهش پاسخ‌های آنتی‌بادی نیز مشاهده شده است (۳۵).

مطالعات *in vitro* نشان داده است که گلوتامین می‌تواند حدود ۳۸ درصد انرژی قابل متابولیسم برای ماکروفاژها را فراهم کند (۳۶). شواهد دیگر نشان می‌دهند که پاسخ تکثیر لنفوسیت‌های خرگوش، موش و انسان به میتوژنر بستگی به دسترسی گلوتامین دارد (۱۲).

پاسخ سلول‌های خونی به پروتئین قابل متابولیسم چندان مورد بررسی قرار نگرفته است. Houdijk و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که افزایش غلظت پروتئین قابل متابولیسم (از ۸۵ به ۱۳۰ درصد احتیاجات) در طی اواخر آبستنی ایمنی بر علیه پارازیت‌ها را افزایش داد (۲۴). Nonnecke و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند زمانی که در گوساله‌های شیرخوار از جایگزین شیر با ۳۰ درصد پروتئین خام و ۲۰ درصد چربی خام به میزان ۲/۴ درصد وزن بدن استفاده کردند، هیچ تفاوت معنی‌داری در تعداد کل لکوسیت‌های خون و جمعیت لکوسیت‌های تک هسته‌ای و ایمونوگلوبولین M مشاهده نکردند (۳۸).

پژوهش‌های بیشماری نشان داد که تنش اکسیداتیو ناشی از تنش گرما، می‌تواند سبب آسیب DNA، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و التهاب شود (۳۵، ۳۷، ۴۸ و ۵۱). لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها مقدار بالای استفاده از گلوتامین را دارند. برای لنفوسیت‌ها، گلوتامین جهت تکثیر سلولی و برای ماکروفاژها، جهت ساخت mRNA به منظور تولید پروتئین‌های ترشحی، پیام‌رسان‌های پپتیدی و گیرنده‌های پروتئینی مورد نیاز می‌باشد. گلوتامین پیش‌ساز شناخته شده در ساخت پورین و پیریمیدین است که به سرعت مورد نیاز است وقتی که لنفوسیت‌ها یا ماکروفاژها فعال می‌شوند. در گوسفند، چالش اندوتوکسین، جریان پلاسما می‌تواند گلوتامین را افزایش می‌دهد. در همان زمان، هر دو انباشت گلوتامین و مقدار جزئی ساخت پروتئین درون لنفوسیت‌ها افزایش می‌یابد (۲۹).

پژوهش‌های آزمایشگاهی و *in vivo* مشخص کرده‌اند که گلوتامین یک ماده مغذی اساسی برای تکثیر لنفوسیت‌ها و تولید سیتوکین‌ها، فعالیت‌های ترشحی و فاگوسیتیک ماکروفاژ و کشتن باکتری‌ها توسط نوتروفیل است (۴۷). گلوتامین یک محرک ایمنی قوی است و محرومیت گلوتامین سبب کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها، وادار کردن بیان مارکرهای فعال‌سازی در لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها، تأثیر بر تولید سیتوکین‌ها و تحریک مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود.

گلوکز منبع اصلی برای وجود و تولید ROS و اندوسیتوز برای نوتروفیل‌ها است. به هر حال، به عنوان یک متابولیت انرژی، گلوکز تنها منبع انرژی این سلول‌ها نیست. جالب اینجاست که نوتروفیل‌ها نسبت به سایر لکوسیت‌ها مانند لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها از گلوتامین بیشتری استفاده می‌کنند (۱۱). در نوتروفیل‌ها، بیشتر گلوتامین از راه چرخه کربس به آسپاراتات، گلوتامات و لاکتات تبدیل می‌شود. گلوتامین و گلوتامات برای عملکرد مناسب لکوسیت‌ها و تولید ترکیبات

جدول ۵- اثر سطح پروتئین و مکمل گلوتامین بر انواع گلبول های سفید خون میش های آبستن در وضعیت تنش گرمایی

Table 5. Effect of protein level and glutamine supplementation on the types of white blood cells of pregnant ewes in heat stress condition

سطح معنی‌داری (P-value)					تیمارها (Treatments)				سطح پروتئین (Protein level) سطح گلوتامین (درصد جیره) (Glutamine Level) % (diet)
سطح پروتئین × گلوتامین (Protein × Glutamine level)	گلوتامین (Glutamine)	سطح پروتئین (Protein Level)	تیمار (Treatment)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	۱۰ درصد بالاتر (10 percent higher)		سطح پایه (Basal Level)		
					یک (One)	صفر (Zero)	یک (One)	صفر (Zero)	
گلبول های سفید (۱۰ ^۶ /μL) (White blood cells (103/μl))									
0.9499	0.3349	0.7858	0.7805	1.367	7.37	6.82	7.57	6.95	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.9297	0.1271	0.9018	0.4680	1.926	8.15	7.07	8.30	7.10	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.9311	0.0015	0.6260	0.0118	0.721	9.37 ^a	7.67 ^b	9.20 ^a	7.42 ^b	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.4859	0.0024	0.9115	0.0173	0.436	10.05 ^a	9.02 ^b	10.25 ^a	8.75 ^b	روز زایش (day of parturition)
0.5288	0.1037	0.8207	0.3544	1.164	9.60	9.00	9.82	8.52	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
نوتروفیل (درصد) (Neutrophil (%))									
0.3180	0.6956	0.9374	0.7436	3.119	65.50	66.50	67.00	64.75	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.5363	0.0803	0.1866	0.1670	1.963	62.00	63.25	62.75	65.25	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.0682	0.0003	0.6640	0.0013	1.745	60.00 ^b	63.50 ^a	58.25 ^b	66.25 ^a	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.0313	0.0001	0.3488	0.0005	2.051	55.50 ^c	58.75 ^b	54.00 ^c	62.25 ^a	روز زایش (day of parturition)
0.4317	0.0001	0.0214	0.0005	2.157	53.25 ^c	59.00 ^b	55.50 ^{bc}	63.25 ^a	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
لنفوسیت (درصد) (lymphocyte (%))									
0.3487	0.7141	0.9414	0.7790	3.332	32.75	31.75	31.25	33.50	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.4910	0.1808	0.2593	0.3170	2.111	35.75	35.00	35.25	33.00	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.0210	<0.0001	0.4500	<0.0001	1.600	36.50 ^b	31.50 ^c	39.25 ^a	30.00 ^c	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.0045	<0.0001	0.1219	0.0001	1.652	40.50 ^{ab}	38.50 ^b	42.00 ^a	34.25 ^c	روز زایش (day of parturition)
0.3620	0.0003	0.0421	0.0010	2.637	43.25 ^a	37.75 ^b	41.50 ^{ab}	33.50 ^c	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
ائوزنوفیل (درصد) (Eosinophil (%))									
1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.583	1.75	1.75	1.75	1.75	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
1.0000	0.5390	1.0000	0.9383	0.625	1.75	1.50	1.75	1.50	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.8775	0.6451	0.6451	0.9231	2.520	3.75	4.00	3.25	3.75	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
1.0000	0.4035	1.0000	0.8598	1.333	3.00	3.50	3.00	3.50	روز زایش (day of parturition)
0.6774	1.0000	0.6774	0.9458	1.375	3.50	3.25	3.00	3.25	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)

در هر سطر اعداد با حروف مشابه با یکدیگر تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ ندارند.

In each row, the numbers with the same letters are not significantly different at the 0.05 level.

جدول ۶- اثر سطح پروتئین و مکمل گلوتامین بر فراسنجه‌های التهابی میش‌های آبستن در وضعیت تنش گرمایی

Table 6. Effect of protein level and glutamine supplementation on inflammatory parameters of pregnant ewes in heat stress condition

سطح معنی‌داری (P-value)					تیمارها (Treatments)				سطح پروتئین (Protein level) سطح گلوتامین (درصد جیره) (Glutamine Level) % (diet)
سطح پروتئین × گلوتامین Protein level) (× Glutamine	گلوتامین (Glutamine)	سطح پروتئین (Protein Level)	تیمار (Treatment)	خطای استاندارد میانگین (SEM)	۱۰ درصد بالاتر (10 percent higher)		سطح پایه (Basal Level)		
					یک (ONE)	صفر (Zero)	یک (ONE)	صفر (Zero)	
اینترلوکین ۲ (نانوگرم در لیتر) (IL2 (ng/L))									
0.2390	0.8180	0.3853	0.5169	4.347	28.63	25.43	23.98	26.16	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.2602	0.3790	0.1423	0.2489	4.490	25.79	21.09	19.61	20.21	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.7166	0.0916	0.5288	0.3173	4.856	24.34	18.98	21.86	18.31	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.2107	0.0132	0.0716	0.0216	2.837	19.79 ^a	13.79 ^b	15.11 ^b	12.87 ^b	روز زایش (day of parturition)
0.4987	0.0138	0.3278	0.0586	3.217	23.97 ^a	16.42 ^a	20.35 ^{ab}	15.74 ^b	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
اینترلوکین ۶ (نانوگرم در لیتر) (IL6 (ng/L))									
0.8930	0.3695	0.5817	0.7535	12.010	56.32	51.55	53.75	47.32	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.5928	0.3392	0.9824	0.7346	11.101	57.82	49.25	54.90	52.42	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.5502	0.6643	0.7967	0.8840	8.539	58.30	57.57	56.80	61.32	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.0352	0.0065	0.1290	0.0079	6.993	64.20 ^b	67.40 ^b	61.60 ^b	81.40 ^a	روز زایش (day of parturition)
0.1319	0.0014	0.0330	0.0027	7.639	46.42 ^b	56.05 ^b	49.45 ^b	71.42 ^a	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)
اینترلوکین ۱۰ (نانوگرم در لیتر) (IL10 (ng/L))									
0.9713	0.3816	0.7301	0.8129	10.900	109.90	114.65	107.77	112.92	سه هفته قبل از زایش (3 weeks before parturition)
0.2938	0.0958	0.3649	0.2032	10.565	115.92	112.17	116.75	101.40	دو هفته قبل از زایش (2 weeks before parturition)
0.0665	0.0211	0.9941	0.0428	13.230	105.50 ^{ab}	101.30 ^{ab}	118.90 ^a	88.00 ^b	یک هفته قبل از زایش (1 weeks before parturition)
0.2375	0.0164	0.4544	0.0573	8.827	93.42 ^a	86.60 ^{ab}	95.50 ^a	77.70 ^b	روز زایش (day of parturition)
0.8154	0.0002	0.4510	0.0019	9.530	103.85 ^a	77.90 ^b	106.42 ^a	82.75 ^b	یک هفته بعد از زایش (1 weeks after parturition)

در هر سطر اعداد با حروف مشابه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ندارند.

In each row, the numbers with the same letters are not significantly different at the 0.05 level.

هفته پس از زایش با افزودن گلوتامین به طور معنی داری افزایش یافت (به ترتیب $P=0/0211$, $P=0/0164$ و $P=0/0002$) به طوری که تیمار شاهد کمترین و تیمار دارای ۱ درصد گلوتامین بیشترین سطح اینترلوکین ۱۰ را دارا بودند. سطح پروتئین و اثرات متقابل آن با گلوتامین بر اینترلوکین ۱۰ تأثیر معنی داری نداشت. تولید اینترلوکین ۱۰ از ماکروفاژها وابسته به حضور گلوتامین می باشد. بیان آنتی ژن ماکروفاژ مشتق شده از منوسیت و همچنین عملکرد آن تحت تأثیر گلوتامین قرار می گیرد (*in vitro*) (۴۹). نتایج به دست آمده از این آزمایش نیز تأیید کننده یافته های پیشین است. اینترلوکین ۱۰ سیتوکینی با چند عملکرد در تنظیم سیستم ایمنی و التهاب است. این اینترلوکین موجب کاهش بیان سیتوکین های لنفوسیت T کمک کننده (Th1) می شود. اینترلوکین ۱۰ همچنین موجب افزایش تکثیر و بقای لنفوسیت های B و تولید آنتی بادی می شود. اینترلوکین ۱۰ می تواند فعالیت NF-kB را مسدود کند (۵۷).

نتیجه گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن سطح پروتئین قابل متابولیسم و افزودن اسید آمینه گلوتامین، صرف نظر از هزینه های تغذیه ای، به عنوان ابزاری برای کاهش اثرات مضر تنش گرمایی بر وضعیت سلامت میش های آبستن زل و بره های آن ها عمل می کند.

مطالعات Kew و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که تغذیه گلوتامین پاسخ اینترلوکین ۲ در موش را بهبود بخشید (۲۵). مقدار اینترلوکین ۶ در روز زایش و یک هفته پس از زایش با افزودن گلوتامین به طور معنی داری کاهش یافت (به ترتیب $P=0/0065$ و $P=0/0014$). به طوری که کمترین و بیشترین مقدار اینترلوکین ۶ به ترتیب در تیمار دارای گلوتامین و سطح بالاتر پروتئین و یک مشاهده شد. همچنین با افزایش سطح پروتئین قابل متابولیسم مقدار اینترلوکین ۱۰ در یک هفته پس از زایش به طور معنی داری کاهش یافت ($P=0/0330$). Lin و همکاران (۲۰۰۵) توضیح دادند که سطح گلوتامین پلاسما همبستگی منفی با تولید اینترلوکین ۶ در بیماران تحت جراحی دارد. استفاده از گلوتامین توازن نیتروژن را بهبود بخشیده و اینترلوکین ۶ پلاسما را کاهش می دهد و بنابراین یک همبستگی منفی بین توازن مثبت نیتروژن و اینترلوکین ۶ پلاسما وجود دارد (۲۸). در مطالعه ای دیگر سنتز و ترشح اینترلوکین ۱ β و اینترلوکین ۶ در ماکروفاژهای احشایی خرگوش در معرض لیپو پلی ساکاریدها با افزودن گلوتامین افزایش می یابد (۵۶). اینترلوکین ۶ در برخی موارد اثرات ضدالتهابی دارد و باعث رهایی پروتئین های مرحله ای حاد از سلول های کبدی همانند CRP می شود. از طرفی دیگر بررسی ها نشان می دهد که به طور مستقیم در بیان ژن فاکتور نکروز دهنده ۱ تومور آلفا نقش ایفا می کند (۲۸). تولید اینترلوکین ۱۰ یک هفته پس از زایش، روز زایش و یک

منابع

1. Al-Eissa, M.S., S. Alkahtani, S.A. Al-Farraj, S.A. Alarifi, B. Al-Dahmash and H. Al-Yahya. 2012. Seasonal variation effects on the composition of blood in Nubian ibex (*Capra nubiana*) in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11: 1283-1286.
2. Ahmed, B.M.S., A.P.A. Monteiro, U. Younas, T.O. Asar, J-D. Liu, J. Hayen, S. Tao and G.E. Dahl. 2015. Maternal heat stress affects calf passive immunity: Effects on intestinal cell apoptosis. *Journal of Dairy Science*, 98 (Suppl. 2): 713. Abstract W268.
3. Amanlou, H., A. Karimi, E. Mahjoubi and C. Milis. 2011. Effects of supplementation with digestible undegradable protein in late pregnancy on ewe colostrum production and lamb output to weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95: 616-622.
4. Ametaj, B.N., B.J. Bradford, G. Boebe, R.A. Nafikov, Y. Lu, J.W. Young and D.C. Beitz. 2005. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 85: 165-175.
5. AOAC. 2005. Official method of Analysis. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC. Arumugam, R, Horowitz, E, Noland, RC, Lu, D, Fleenor, D, Freemark, M. 2010. Regulation of islet beta-cell pyruvate metabolism: interactions of prolactin, glucose, and dexamethasone. *Endocrinology*, 151: 3074-3083.
6. Baumgard, L.H. and R.P. Rhoads. 2013. Effects of heat stress on post-absorptive metabolism and energetics. *Annual Review of Animal Bioscience*, 1: 311-337.
7. Bequette, B.J., J.A. Metcalf, D. Wray-Cahen, F.R.C. Backwell, J.D. Sutton, M.A. Lomax, J.C. MacRae and G.E. Lobley. 1996. Leucine and protein metabolism in the lactating dairy cow mammary gland: responses to supplemental dietary crude protein intake. *Journal of Dairy Research*, 63: 209-222.
8. Boucher, Z. 2014. Breed and diet effects on ewe colostrum quality, lamb birth weight and the transfer of passive immunity. A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements. MS Thesis. Charles Sturt Univ., Wagga, Australia.
9. Buchet R., J.L. Millan and D Magne. 2013. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. pp: 27-51 in *Phosphatase Modulators*. J. Millan, Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey.
10. Cannas, A., L.O. Tedeschi, D.G. Fox, A.N. Pell and P.G. Van Soest. 2004. A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. *Journal of Animal Science*, 82:149-169.

11. Caroprese, M., M. Albenzio, R. Marino, A. Santillo and A. Sevi. 2012. Immune response and milk production of dairy cows fed graded levels of rumen-protected glutamine. *Research Veterinary Science*, 93: 202-209.
12. Chang W.K., K.D Yang and M.F. Shaio. 1999b. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clinical and Experimental Immunology*, 117: 482-488.
13. Collier, R.J., J.L. Collier, R.P. Rhoads and L.H. Baumgard. 2008. Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *Journal of Dairy Science*, 91: 445-454.
14. Dangi, S.S., M. Gupta, D. Maurya, V.P. Yadav, R.P. Panda, G. Singh, N.H. Mohan, S.K. Bhure, B.C. Das, S. Bag, R.K. Mahapatra and M. Sarkar. 2012. Expression Profile of HSP genes during different seasons in goats (*Capra hircus*). *Tropical Animal Health and Production*, 44: 1905-1912.
15. Delgado, R., R. Abad-Guamán, N. Nicodemus, A. Diaz-Perales, J. García, R. Carabano and D. Menoyo. 2019. Effect of pre- and post-weaning dietary supplementation with arginine and glutamine on rabbit performance and intestinal health. *BMC Veterinary Research*, 15:199.
16. Dikmen S. and P.J. Hansen. 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science*, 92:109-116.
17. Duncan, D.B. 1955. Multiple ranges and multiple "F" test. *Biometrics*, 11: 1-12.
18. Gao, F., X.Z. Hou, Y.C. Liu, S.Q. Wu and C.J. Ao. 2008. Effect of maternal under-nutrition during late pregnancy on lamb birth weight. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 21:371-375.
19. Gordon, J.L., S.T. LeBlanc and T.F. Duffield. 2013. Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics North America- Food Animal Practice*, 29: 433-445.
20. Halliwell B. and S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 715-724.
21. Hammon, D.S., I.M. Evjen, T.R. Dhiman and J.P. Goff. 2006. Neutrophil function and energy status in Holsteins cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113: 21-29.
22. Helal A., A.L.S. Hashem, M.S. Abdel- Fattah and H.M. El- Shaer. 2010. Effects of heat stress on coat characteristics and physiological responses of Balady and Damascus goats in Sinai, Egypt. *Amer. Euras. Journal of Agriculture and Environmental Science*, 7: 60-69.
23. Huntington, G.B., C.K. Reynolds and B.H. Stroud. 1989. Techniques for measuring blood flow in splanchnic tissues of cattle. *Journal of Dairy Science*, 72: 1583-1595.
24. Houdijk, J.G.M., I. Kyriazakis, F. Jackson, J.F. Huntley and R.L. Coop. 2000. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 91:43-62.
25. Kew, S., S. Wells, P. Yaqoob, F.A. Wallace, E.A. Miles and P.C. Calder. 1999. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *Journal of Nutrition*, 129: 1524-1531.
26. Koushki, R., H. Mansoori Yarahmadi, M. Khaldari, J. Fakhraei and K. Karkoodi. 2019. Milk Yield and Blood Metabolite Profile in Late Pregnancy in Lori Ewes Receiving Diets Containing Undegradable Protein Sources. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(4):643-650.
27. Krause, K.M., R. Garrett and G.R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds. *Animal Feed Science Technology*, 126: 215-236.
28. Lin, M.T., S.P. Kung, S.L. Yeh, K.Y. Liaw, M.Y. Wang, M.L. Kuo, P.H. Lee and W.J. Chen 2005. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition attenuates plasma interleukin-6 in surgical patients with lower disease severity. *World Journal of Gastroenterology*, 11(39): 6197-6201.
29. Loble, G.E., S.O. Hoskin and C.J. McNeil. 2001. Glutamine in Animal Science and Production. *Journal of Nutrition*, 131: 2525-2531.
30. Lucas, A.M. and C. Jamroz. 1961. *Atlas of Avian Hematology*. Atlas of Avian Hematology. Agriculture Monograph 25. USDA, Washington, DC. 362 p.
31. Mills, E.L., B. Kelly and L.A. O'Neill. 2017. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nature Immunology*, 18: 488.
32. Mogharnasi, M., A.A. D. Gaeini and Sheikholeslami Vatani. Comparing the Effects of Two Training Methods of Aerobic and Anaerobic on some Pre-Inflammatory Cytokines in Adult Male Rats. 2009. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 11: 191-198.
33. Monteiro, A.P.A., S. Tao, I.M. Thompson and G.E. Dahl. 2014. Effect of heat stress during late gestation on immune function and growth performance of calves: isolation of altered colostral and calf factors. *Journal of Dairy Science*, 97: 6426-6439.
34. Montilla, R. and I. Sandra. 2013. The effects of heat stress in redox balance and inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. *Graduate Theses and Dissertations*. 13583.
35. Mutinati, M., M. Piccinno, M. Roncetti, D. Campanile, A. Rizzo and R. Sciorsci. 2013. Oxidative stress during pregnancy in the sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 48: 353-357.
36. Newsholme, E.A. and Parry-Billings, M. 1990. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14: 63S-67S.

37. Nisar, A., M. Sultana and H. Ashraf. 2013. Oxidative stress-threat to animal health and production. *International Journal of Livestock Research*, 3: 76-83.
38. Nonnecke, B.J., M.R. Foote, J.M. Smith, B.A. Pesch and M.E. Van Am-burgh. 2003. Composition and functional capacity of blood mononuclear leukocyte populations from neonatal calves on standard and intensified milk replacer diets. *Journal of Dairy Science*, 86: 3592-3604.
39. NRC. 2007. Nutrient requirements of small ruminants sheep, goats, cervids, and new world camelids. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
40. Ocak, N., M.A. Cam and M. Kuran. 2005. The effect of high dietary protein levels during late gestation on colostrum yield and lamb survival rate in singleton-bearing ewes. *Small Ruminant Research*, 56: 89-94.
41. O'Doherty, J.V., P. Nowakowski and T.F. Crosby. 1998. The effects of feeding grass silage and molasses sugar beet pulp separately or as an ensiled mixture to twin bearing ewes. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 130: 217-227.
42. Pearce, S.C., V. Mani, R.L. Boddicker, J.S. Johnson, T.E. Weber, J.W. Ross, R.P. Rhoads, L.H. Baumgard and N.K. Gabler. 2013b. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. *Plos One*, 8: E70215.
43. Ribeiro, M.N., N.L. Ribeiro, R. Bozzi and R.G. Costa. 2018. Physiological and biochemical blood variables of goats subjected to heat stress. *Journal of Applied Animal Research*, 46 (1):1036-1041.
44. Roth E. 2008. Nonnutritive Effects of Glutamine. *Journal of Nutrition*, 138: 2025S-2031S. 2011.
45. SAS (2003). SAS Users Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
46. Sahraei, H.R., A. Kiani, A. Azarfar and H. Khamisabadi. 2020. Effect of Late Gestational Betaine Supplementation on Intermediate Metabolites, Homocysteine and Lipid Peroxidation in Pregnant Ewes and Their Offspring. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 10(3): 483-489.
47. Shah, A.M., Z. Wang and J. Ma. 2020. Glutamine Metabolism and its role in immunity, a Comprehensive Review. *Animals*, 10: 326.
48. Sordillo, L.M. and S.L. Aitken. 2009. Impact of Oxidative Stress on the Health and Immune Function of Dairy Cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128: 104-109.
49. Spittler, A., S. Winkler, P. Gotzinger, R. Oehler, M. Willheim, C. Tempfer, G. Weigel, R. Fugger, G. Boltz-Nitulescu and E. Roth. 1995. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood*, 86: 1564-1569.
50. Sporleder, H.P. 1998. Insulin stimulated glucose metabolism in sheep in different states of reproduction the role of potassium and calcium. MS Thesis. University of Veterinary Medicine Hanover, Hanover, Germany.
51. Tanha, T., H. Amanlou, M. Chamani, Y. Ebrahimnezhad, R. Salamatdost, N. Maheri and M. Fathi. 2013. Impact of glutamine on glutathione peroxidase activity (GPX) and total antioxidant status (TAS) during transition period in Holstein dairy cows. *Journal of Cell and Animal Biology*, 5: 206-214.
52. Van der Vusse, G.J. 2009. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24: 300-307.
53. Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lews. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch poly sacharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
54. Wu, G., F.W. Bazer, R.C. Burghardt, G.A. Johnson, S.W. Kim, X.L. Li, M.C. Satterfield and T.E. Spencer. 2010. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. *Journal of Animal Science*, 88: E195-E204.
55. Wu, Q.J., C. Wang, L.L. Zhu, S.Q. Wang, L. Zhao, Z.Y. Xing, B.L. Zhang, W.H. Jia, Y. Ma and Y.Q. Wang. 2022. Effects of glutamine on growth performance and immune function of high- concentrate fattening Hu lambs. *Small Ruminant Research*, 216: 106-113.
56. Yassad, A., A. Husson, A. Bion and A. Lavoigne. 2000. Synthesis of interleukin 1beta and interleukin 6 by stimulated rat peritoneal macrophages: modulation by glutamine. *Cytokine*, 12: 1288-1291.
57. Zhang, F.J., X.G. Weng, J.F. Wang, D. Zhou, W. Zhang, C.C. Zhai, Y.X. Hou and Zhu Y.H. 2014. Effects of temperature-humidity index and chromium supplementation on antioxidant capacity, heat shock protein 72 and cytokine responses of lactating cows. *Journal of Animal Science*, 92: 3026-3034.