Animal Production Research

Vol. 12, No. 1, 2023 (25-37)
doi: 10.22124/AR.2023.21822.1690
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER OPEN ACCESS

Effect of adding a phytogenic-rich herbal mixture to diet on the expression pattern of some insulin hormone metabolism-related candidate genes of heat-stressed fattening Afshari-Shal lambs

F. Hashemzadeh[1], F. Rafeie[2*], A. Hadipour[3], M. H. Rezadoust[2]

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Former Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 07-09-2022 – Revised: 03-02-2023 – Accepted: 04-02-2023 – Available online: 19-02-2023)

Introduction: Heat stress can compromise sheep's productive performance and growing lambs are considered to be one of the most susceptible groups to heat stress. Exposure to heat stress increases inflammatory cytokines secretion and impairs insulin signaling in muscle which may underlie poor growth responses. Therefore, enhancing insulin sensitivity through the addition of insulin-sensitizing dietary additives may improve animal performance during heat stress. Phytogenics, compounds with antioxidant, antimicrobial, and metabolic enhancing effects, have been used in animal nutrition to enhance performance and prevent diseases in stress-related conditions. It has been reported that supplementing a phytogenic-rich herbal mixture containing clove, rosemary, cinnamon, and turmeric improved the antioxidant status and enhanced insulin sensitivity of transition dairy cows. It has been indicated that the duodenal infusion of quercetin increased insulin secretion and insulin sensitivity. Possible mechanisms responsible for the insulin-sensitizing activity of herbal plants include increasing insulin receptors or enhancing receptor sensitivity to insulin, increasing *PPARy* activity, increasing glycogen synthase activity, modulating inflammatory cytokine expression, stimulating fatty acid oxidation as well as increasing antioxidant status. The objective of this study was to investigate the effects of a phytogenic-rich herbal mixture (PRHM) supplementation on gene expression of insulin-related genes in the muscle of feedlot lambs experiencing severe heat stress conditions.

Materials and methods: Eighteen 11-12-month-old growing male Afshari×Chaal lambs (41.2 ± 3.04 kg) were housed in individual stalls (1.2 × 1 m, with individual feed troughs) on wooden slatted flooring, located within an indoor animal facility with a natural and artificial lighting system for 16 h/d. Lambs were randomly allocated to one of three experimental diets for a 48-day feeding period. The treatments included control diet without PRHM (0%PRHM), diet supplemented with 1% PRHM (1%PRHM), and diet supplemented with 2% PRHM (2%PRHM). The PRHM was added to the basal diet and mixed thoroughly. Diets formulated to meet nutritional requirements for maintenance and growth and offered twice daily at 0700 and 1700 h. The lambs had free access to feed and water during the experiment. The main ingredients of the basal diet were alfalfa hay, ground corn, wheat bran, beet pulp, soybean meal, and soy oil. The herbal mixture consisted of 50% rosemary leaves (*Rosemarinus officinalis*), 20% cinnamon barks (*Cinnamomum zeylanicum*), 20% turmeric roots (*Curcuma longa*), and 10% clove buds (*Eugenia caryophyllata Thunb.*). The total phenolic content of the PRHM was 89.6 g tannic acid equivalent per kg. The daily climate data, such as daily mean temperature and relative humidity, were recorded using a digital thermo-hygrometer (Testo 608-H1, Germany). At the end of the study, all lambs were transported to a local abattoir where they were slaughtered after 12-h feed withdrawal according to Halal method. Post-slaughter, longissimus lumborum muscle samples between the 12th and the 13th rib of the right side

* Corresponding author: farjad.rafeie@guilan.ac.ir

CC BY

of carcass were collected as quickly as possible (i.e., within 3–5 min). For expression analysis of Insulin receptor (*INSR*), Insulin receptor substrate 1 (*IRS1*), glucose transporter 1 (*GLUT1*), glucose transporter 4 (*GLUT4*), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (*PPARγ*) genes, total RNA was isolated from the sheep muscle tissue using the SinaPure RNA according to the manufacturer's instructions. The quantity and integrity of isolated RNA were determined for each sample by using both NanoDrop (260/280 ratio) and 1% agarose gel electrophoresis. cDNA was synthesized with RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's instructions. Forward and reverse primers were designed for five genes and GAPDH as reference gene by Oligo 7. The real-time PCR was done in 25 µL containing 1x BIORON GreenHot Master Mix (BIORON, Germany), 1 µL cDNA, 0.3 µM of each forward and reverse primers and nuclease-free water to reach final volume. Real-time PCR was performed on Bio-Rad CFX96 as follows; Initial denaturation 2 min at 94 °C, followed by 39 cycles of denaturation 20 sec at 94 °C, annealing 25 sec at annealing temperature, extension 20 sec at 72 °C following by melting curve analysis from 65 °C to 95 °C with 0.5 °C increase per each step. Relative gene expression was determined based on Livak method (2-ΔΔCT). All data were analyzed using the MIXED procedure of SAS. Model included the effect of the treatment as the fixed effect and lambs within treatments as a random effect. The significance level was declared at $P<0.05$.

Results and discussion: The results showed that the gene expressions of *INSR* ($P<0.01$) and *GLUT4* ($P<0.01$) in muscle tissue were linearly upregulated in lambs supplemented with increasing levels of herbal mixture. A quadratic effect of herbal mixture supplementation was found on gene expression of *IRS1* such that lambs fed a 2% mixture had the highest gene expression. Moreover, both supplementation levels of 1 and 2% mixture equally increased *GLUT1* gene expression ($P<0.01$) compared to control lambs. In contrast to the other genes, *PPARγ* gene expression was quadratically ($P<0.01$) downregulated by mixture supplementation such that the lowest gene expression was observed in lambs receiving a 2% mixture. Although there is some evidence suggesting that PRHM supplementation has modulatory effects on insulin resistance in transition dairy cows, to our knowledge, there is currently no published data investigating the effects of PRHM supplementation on mRNA expression of genes related to insulin and glucose metabolism in lambs' skeletal muscle. Our results may suggest that PRHM supplementation enhanced insulin sensitivity and glucose uptake in the skeletal muscle of heat-stressed lambs. In agreement with our results, it has been found that cinnamaldehyde promotes gene expression of *IRS-1* and *GLUT4* genes in muscle cells, which the latter gene is affected by activating the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha. In addition, greater *GLUT1* gene expression might be indicative of improved insulin-independent glucose uptake, besides enhanced insulin-dependent glucose transporter, *GLUT4* gene.

Conclusions: The results showed that the mixture of medicinal plants including cinnamon, turmeric, rosemary, and clove affected the expression of genes related to insulin metabolism and increased the efficiency of glucose utilization.

Keywords: Feedlot lamb, Insulin-related genes expression, Heat stress, Herbal mixture

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This work was supported by a grant from the University of Guilan (grant no. 1799074/27p).

Acknowledgments: The authors would like to thank the Navid Morgh Guilan Animal Husbandry Co. and Central and Biotechnology laboratories of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Guilan for providing the required facilities to conduct this study.

How to cite this article:

Hashemzadeh, F., Rafeie, F., Hadipour, A., & Rezadoust M. H. (2023). Effect of adding a phytogenic-rich herbal mixture to diet on the expression pattern of some insulin hormone metabolism-related candidate genes of heat-stressed fattening Afshari-Shal lambs. *Animal Production Research*, *12*(1): 25-37. doi: 10.22124/AR.2023.22904.1722

تحقیقات تولیدات دامی

سال دوازدهم/شماره اول/بهار ۱۴۰۲ (۳۷-۲۵)

Animal Production Research

مقاله پژوهشی

اثر افزودن مخلوطی از گیاهان دارویی حاوی ترکیبات فیتوژنیک بر الگوی بیان برخی از ژن‌های کاندیدا مرتبط با سوخت و ساز هورمون انسولین در جیره بره‌های پرواری آمیخته افشاری-شال در شرایط تنش گرمایی

فرزاد هاشم‌زاده[۱]، فرجاد رفیعی[۲]*، امیر هادی‌پور[۳]، محمدحسین رضادوست[۲]

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانش‌آموخته مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۶ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۵)

چکیده

در پژوهش حاضر، مخلوطی از گیاهان دارویی غنی از ترکیبات فیتوژنیک به جیره بره‌های پرواری در شرایط تنش گرمایی افزوده شد و سپس تاثیر آن بر الگوی بیان ژن‌های کاندیدا مرتبط با سوخت و ساز هورمون انسولین و حاملین گلوکز در بافت عضلانی بررسی شد. بدین منظور و در گام اول، از تعداد ۱۸ راس بره نر در قالب سه گروه تیمار تغذیه‌ای (جیره پایه و افزودن یک و دو درصد مخلوط گیاهان دارویی (دارچین، زردچوبه، رزماری و میخک + جیره پایه)) استفاده شد. متعاقباً شاخص‌های دما و رطوبت نیز حاکی از آن بود که بره‌ها در شرایط تنش گرمایی قرار دارند. در پایان آزمایش، بره‌های تیمار آزمایشی، ذبح شده و از بافت عضلانی نمونه‌برداری شد. در گام دوم با انجام آزمایش مولکولی، سطح بیان ژن‌های کاندیدای جایگاه‌های ژنی گیرنده انسولین (*INSR*)، سوبسترای گیرنده انسولین ۱ (*IRS1*)، حامل گلوکز ایزوتایپ ۱ (*GLUT1*)، حامل گلوکز ایزوتایپ ۴ (*GLUT4*) و گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسی‌زوم گاما (*PPARγ*) ماهیچه‌ای سنجیده شد. در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که در پاسخ به سطوح افزایشی مکمل گیاهان دارویی، بیان ژن‌های *INSR* و *GLUT4* با تابعیت خطی افزایش یافت ($P<۰/۰۱$). علاوه بر این، سطوح یک و دو درصد گیاه دارویی، به‌طور برابر، بیان ژن *GLUT1* را در مقایسه با شاهد، افزایش دادند ($P<۰/۰۱$). بر خلاف سایر ژن‌ها، بیان ژن *PPARγ* با روند تابعیت درجه دوم به وسیله مکمل گیاهان دارویی کاهش یافت ($P<۰/۰۱$)، به‌طوری که کمترین سطح بیان ژن در تیمار دارای دو درصد مکمل مشاهده شد. به‌عنوان جمع‌بندی، نتایج این پژوهش نشان داد که مخلوط گیاهان دارویی مورد استفاده بر الگوهای سطح بیان ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز هورمون انسولین بره‌های پرواری در شرایط تنش گرمایی تاثیر معنی‌داری داشته و کارآیی استفاده از گلوکز را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: بره پرواری، بیان ژن مرتبط با انسولین، تنش گرمایی، مخلوط گیاهان دارویی

* نویسندهٔ مسئول: farjad.rafeie@guilan.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2023.22904.1722

مقدمه

تنش گرمایی تاثیر مخربی بر رشد بره‌های پرواری دارد و با توجه به تغییرات اقلیمی به سمت تشدید گرمایش زمین، حفظ ثبات در صنعت تولید گوشت با چالش‌هایی روبرو خواهد شد (Bagath *et al.*, 2019). از منظر فیزیولوژیکی، بره‌های در حال رشد، از حساس‌ترین دام‌ها به تنش گرمایی هستند و دام‌های پرواری در شرایط تنش گرمایی، مصرف خوراک، رشد و بهره‌وری اندکی دارند (Belhadj Slimen *et al.*, 2019)، که به‌طور غیرمستقیم با اختلالات متابولیکی شامل تنش اکسیداتیو، التهاب و ترشح نامناسب هورمون‌ها در ارتباط است (Rhoads *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2014). علاوه بر این، یافته های پیشین حاکی از آن است که تنش گرمایی، ترشح برخی ترکیبات سایتوکین‌های پیش‌التهابی را افزایش می‌دهد که متعاقباً ممکن است سیگنال‌دهی هورمون انسولین در بافت عضلانی را مختل نموده و منجر به کاهش رشد و عملکرد دام‌های پرواری شود. بنابراین، در شرایط تنش گرمایی، بهبود حساسیت به انسولین با تغذیه افزودنی‌های خوراکی بهبوددهنده آن نظیر عنصر کروم (Soltan, 2010) یا لیپوییک اسید (Diesel *et al.*, 2007)، منجر به افزایش رشد و بهره‌وری می‌شود (Rhoads *et al.*, 2013). اشاره به این نکته نیز ضروری است که با افزایش نگرانی در مورد رفاه حیوانات و آگاهی مصرف-کنندگان از مسائل امنیت و کیفیت مواد غذایی، توجه به تعدیل پاسخ‌های مربوط به تنش گرمایی برای بهبود عملکرد حیوانات و ارزش غذایی گوشت آنها افزایش یافته است.

در نشخوارکنندگان، سوخت و ساز هورمون انسولین می-تواند از جنبه‌های مختلفی مهم باشد. برخی بافت‌های بدن نشخوارکنندگان شیرده در دوره‌هایی نظیر نزدیکی زمان زایش و یا در بازه اوج شیردهی ممکن است علایمی از مقاومت به انسولین را از خود نشان دهند که ممکن است با برخی مشکلات متابولیکی از جمله بیماری‌های متابولیکی کبد چرب و کتوز و یا برخی مشکلات تولیدمثلی همراه باشد (Oliveira *et al.,* 2016). در نشخوارکنندگان در حال رشد نیز مقاومت انسولینی ممکن است با کاهش راندمان انرژی همراه باشد (Eddouks *et al.,* 2014). بنابراین، در دام‌های نشخوارکننده، ارزیابی جنبه‌های مختلف سوخت و ساز گلوکز و انسولین و بهبود مقاومت انسولینی می‌تواند با بهبود تولید و افزایش بهره‌وری در دام همراه باشد.

با این چالش‌ها و انگیزه‌های تحقیقاتی مطرح شده، گیاهان دارویی با آثار ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابت و بهبوددهنده آن، ضد آرتریت، محافظت از سیستم عصبی، ضد سرطان و التیام‌دهنده زخم‌ها، سبب بهبودی سلامت در انسان‌ها (Briskin, 2000) و دام‌ها (Oh *et al.*, 2017) می‌شوند. نتایج تحقیقات متعدد پیشین حاکی از آن است که عصاره برخی از گیاهان دارویی دارای آثار شبه هورمون انسولین و یا تقویت‌کننده آن هستند. تاکنون بیش از ۲۰۰ ماده موثره گیاهی خالص توانسته‌اند سوخت و ساز گلوکز را تحت تأثیر قرار داده و تا حدی مقاومت انسولین را کاهش دهند (Khan *et al.*, 1990; Broadhurst *et al.*, 2000). این آثار نه تنها ناشی از کاهش مقاومت انسولینی هستند، بلکه به دلیل بهبود سوخت و ساز چربی، وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن و عملکرد بهینه مویرگ‌ها هستند (Broadhurst *et al.*, 2000). با بررسی ۴۹ عصاره گیاهی، مشخص شد که دارچین، میخک، چای سبز و سیاه از قوی‌ترین ترکیبات موثر بر سوخت و ساز گلوکز هستند (Broadhurst, 1997). این یافته‌های علمی گزارش شده، آغازی بر مجموعه‌ای از تحقیقات جدید هستند که به بررسی آثار گیاهان مختلف دارویی بر سوخت و ساز گلوکز از جنبه‌های مختلف پرداخته‌اند و همچنان ادامه دارند. در تحقیق انجام شده روی موش، افزودن عصاره آبی گیاه دارچین در جیره، مصرف گلوکز به وسیله عضلات را با پاسخ وابسته به دوز، بیشتر نمود. بخشی از پاسخ مشاهده شده در این پژوهش، ساز و کارهای مشاهده شده به افزایش سیگنال‌دهی انسولین در عضلات اسکلتی هستند (Qin *et al.*, 2003). تأثیر استفاده طولانی‌مدت از ترکیبات گیاهی فیتوژنیک بر آنزیم‌های کلیدی سوخت و ساز کربوهیدرات در شرایط مقاومت به انسولین نشان داد که فعالیت آنزیم‌ها و بیان ژن‌های مرتبط به حالت طبیعی بازگشته و پاسخی مشابه گلی‌بن‌کلامید ایجاد نمود. همچنین نشان داده شده است که سینامالدهید، ماده موثره غالب اسانس گیاه دارچین، جابجایی پروتئین حامل گلوکز ایزوتایپ ۴ را افزایش داده و جابجایی گلوکز از غشای سلول‌های بافت عضلانی را بیشتر نموده است (Anand *et al.*, 2010). همچنین گزارش شده است که که عصاره اُلئورزین و گیاه زردچوبه با فعال نمودن گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر

پراکسی‌زوم‌های نوع گاما، آثار ضد دیابت و کاهنده گلوکز در موش‌های مبتلا به دیابت داشتند (Honda *et al*., 2006). علاوه بر گیاه دارچین و زردچوبه، پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که عصاره اتانولی رزماری (BakIrel *et al*., 2008; Ibarra *et al*., 2011) و عصاره جوانه گیاه میخک (Kuroda *et al*., 2012) توانسته‌اند مقدار گلوکز خون را در خرگوش و موش‌های سالم و مبتلا به دیابت، به حد طبیعی خود بازگردانند و پاسخی مشابه با پیوگلیتازون نشان دهند. علی‌رغم موارد ذکر شده، پژوهش‌هایی که به بررسی تاثیر افزودنی‌های فیتوژنیک بر سوخت و ساز انسولین در نشخوارکنندگان پرداخته باشند، بسیار کم بوده و نیاز به پژوهش‌های بیشتر در این زمینه مشهود است. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، بررسی آثار افزودن مخلوطی از گیاهان دارویی با آثار بالقوه آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی قوی و افزاینده حساسیت هورمون انسولین بر سطح بیان ژن‌های کاندیدای مرتبط با سوخت و ساز انسولین و گلوکز در عضلات بوده است.

مواد و روش‌ها

زمان و محل انجام پژوهش: پژوهش حاضر طی ماه‌های مرداد و شهریور سال ۱۳۹۵ به مدت نُه هفته (یک هفته دوره عادت‌پذیری و هشت هفته دوره آزمایش) در یک گوسفندداری منطبق بر سیستم پرورشی متمرکز وابسته به شرکت نوید مرغ گیلان واقع در کیلومتر سه جاده شهرک صنعتی رشت انجام شد. این گوسفندداری برای تأمین هوا، مجهز به پنجره‌های ورودی هوا و هواکش‌های با قطر ۱۴۰ و ۹۰ سانتی‌متری بود. بستر دام‌ها به‌صورت فنس‌های چوبی بوده و امکان عبور ادرار و مدفوع دام از آن وجود داشت، به‌طوری که عملاً دام‌ها ارتباط مستقیمی با کود دفعی خود نداشتند. تامین نور به‌صورت طبیعی و مصنوعی به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با شدت ۱۲۰ لوکس در روز صورت گرفت. همچنین آب تازه و سالم به‌صورت آزادانه در اختیار دام‌ها قرار داشت.

مشخصات دام ها و تیمارهای آزمایشی: برای انجام این آزمایش در مجموع از تعداد ۱۸ رأس بره نر آمیخته افشاری-شال سالم و تقریباً مشابه از نظر وزنی (۳/۰۴ ± ۴۱/۲ کیلوگرم) و سنی (۱۲-۱۱ ماه) انتخاب شدند. کلیه دام‌ها یک ماه قبل از انجام پژوهش نسبت به وجود انگل‌های داخلی و خارجی مطابق دستور دامپزشک، انگل‌زدایی شده و در طول دوره آزمایش نسبت به استفاده از هرگونه آنتی‌بیوتیک، کوکسیدیواستات یا ضدانگل اجتناب شد. دام‌ها قبل از انجام پژوهش، پس از ۱۲ ساعت گرسنگی توزین شده و سپس در سه گروه شش تایی با حداکثر یکنواختی ممکن از نظر وزنی توزیع شده و به‌صورت انفرادی نگهداری شدند. تیمارها شامل گروه شاهد (جیره پایه)، تیمار یک (جیره پایه همراه با یک درصد پودر مخلوط گیاهان دارویی) و تیمار دو (جیره پایه همراه با دو درصد پودر مخلوط گیاهان دارویی) بودند. ترکیب پودر مخلوط گیاهان دارویی مورد استفاده در تیمارهای آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است. به‌منظور عادت‌پذیری دام‌ها به شرایط آزمایش و جیره‌های غذایی، یک هفته زمان در نظر گرفته شده و پس از آن، هشت هفته رکوردگیری صورت گرفت.

جیره‌های غذایی پایه بر اساس احتیاجات بره‌های نر یک-ساله با متوسط وزن ۳۵ تا ۴۰ کیلوگرم و متوسط افزایش وزن روزانه ۲۵۰ گرم در روز تنظیم شد (NRC, 2007). اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی در جدول ۲ ارائه شده است. نمونه‌های خوراک قبل از تنظیم جیره‌های غذایی برای اندازه‌گیری میزان ماده خشک، پروتئین خام، عصاره اتری و خاکستر با استفاده از روش‌های استاندارد (AOAC, 2002) و همچنین بخش دیواره سلولی نیز با استفاده از دستورالعمل آزمایشگاهی آمیلاز مقاوم به حرارت اندازه گیری شدند (Van Soest *et al*., 1991) و سپس از داده‌های به‌دست آمده برای تنظیم جیره‌ها استفاده شد. جیره‌های غذایی در دو وعده صبح (ساعت ۷:۰۰) و عصر (ساعت ۱۷:۰۰) و به‌صورت آزاد و گروهی عرضه می‌شد.

جدول ۱- ترکیب گیاهان دارویی مورد استفاده در مخلوط
Table 1. Composition of herbal plants used in the mixture

Herbal plants	Concentrations (%)
Rosemary	50
Turmeric	20
Cinnamon	20
Clove bud	10

جدول ۲- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی (بر اساس ماده خشک)

Table 2. Dietary ingredients and nutrient composition (DM basis) of experimental diets

Ingredients (% of DM)	Value
Alfalfa hay	23.4
Ground corn	41.1
Wheat bran	7.0
Beet pulp	5.0
Soybean meal	13.5
Soy oil	4.0
Mineral and vitamin premix[1]	1.0
Sodium bicarbonate	0.6
Monocalcium phosphate	1.0
Calcium carbonate	0.7
Magnesium oxide	0.2
Salt	0.5
Chemical composition, % of DM	
Digestible energy (Mcal/kg DM)	3400
CP	16.3
NDF	21.5
ADF	13.0
Calcium	1.3
Phosphorus	0.6

[1] Composition: 50 g/kg of Ca, 11 g/kg of Mg, 5 g/kg of Mn, 15 g/kg of Zn, 3 g/kg of Cu, 0.15 g/kg of I, 0.05 g/kg of Co, 1,800,000 IU/kg of vitamin A, 200,000 IU/kg of vitamin D, and 15,000 IU/kg of vitamin E, 0.25 g/kg butylated hydroxytoluene as a synthetic antioxidant. Minerals and vitamins were separately packaged and used on equal proportion.

جیره‌های غذایی به‌صورت جیره‌های کاملاً مخلوط (TMR) آماده‌سازی شدند. خوراک در حد اشتها یعنی به نحوی که حدود پنج تا ۱۰ درصد خوراک مصرفی روز قبل در آخور باقی بماند، تغذیه شد.

جمع آوری اطلاعات آب و هوایی و محاسبه شاخص دما و رطوبت: اطلاعات روزانه آب و هوایی، شامل میانگین دما و رطوبت به‌صورت روزانه با استفاده از یک دما و رطوبت سنج دیجیتالی (Testo 608-H1, Germany) ثبت شد. این ابزار در داخل گوسفندداری و در ارتفاع ۱/۲ متری از سطح زمین نصب شد. شاخص دما و رطوبت (THI) با رابطه زیر محاسبه شد (Marai *et al*., 2007)، که در این رابطه، T، دما و RH، رطوبت نسبی است:

$$THI = T-(0.31-0.0031\times RH)\times(T - 14.4)$$

نمونه‌برداری و جمع‌آوری اطلاعات عملکرد: برای اندازه‌گیری افزایش وزن، یک هفته قبل از شروع دوره اصلی آزمایش و در طول مدت انجام آن، بره‌ها توزین شدند. بدین‌منظور، در پایان هر دوره چهار هفته‌ای (۲۸ و ۵۶ روزگی) و قبل از وعده غذایی صبح، کلیه دام‌ها به‌صورت انفرادی توزین شدند. کلیه وزن‌کشی‌ها با استفاده از یک دستگاه باسکول ۲۰۰ کیلوگرمی با دقت ۱۰۰ گرم انجام شد. در پایان آزمایش، بره‌ها به روش حلال در کشتارگاه صنعتی سراوان رشت ذبح شدند. از تمامی لاشه‌ها به سرعت و بلافاصله پس از کشتار، نمونه‌های بافت ماهیچه اخذ شده و بلافاصله در مجاورت نیتروژن مایع منجمد شده و سپس به فریزر ۸۰ ºC - منتقل شدند. به بره‌ها به مدت ۱۲ ساعت قبل از کشتار، گرسنگی داده شده بود ولی به آب دسترسی آزاد داشتند.

استخراج RNA و Real-time PCR : جهت استخراج RNA از نمونه‌های بافت ماهیچه، از کیت استخراج RNA تجاری SinaPure RNA (سیناکلون، ایران) استفاده شد. مراحل استخراج طبق پروتکل توصیه‌های کیت اجرا شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از Nanodrop 2000 (Thermo Scientific، آمریکا) و انجام الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific، آمریکا) و بر اساس پروتکل ارائه شده در کیت صورت گرفت.

آغازگرهای اختصاصی برای جایگاه‌های ژنی گیرنده انسولین (*INSR*)، سوبسترای گیرنده انسولین یک (*IRS1*)، حامل گلوکز ایزوتایپ ۱ (*GLUT1*)، حامل گلوکز ایزوتایپ ۴ (*GLUT4*) و گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسی‌زوم گاما (*PPARγ*) ماهیچه‌ای و نیز ژن مرجع *GAPDH* با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 (Rychlik, 2007) طراحی شد (جدول ۳). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌هنگام (Real-time PCR)

با استفاده از کیت تجاری BIORON GreenHot Master Mix حاوی رنگ سایبر گرین در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکروگرم cDNA الگو، GreenHot Master Mix با غلظت ۱x، هر کدام از آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو با غلظت ۰/۳ میکرومولار و آب دو بار تقطیر سترون برای رساندن مخلوط به حجم نهایی صورت گرفت. همچنین برنامه زمان-بندی شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت دو دقیقه، ۳۹ گام چرخه‌ای هر کدام شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ °C به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای اتصال (جدول ۳) به مدت ۲۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه و سرانجام، تجزیه منحنی ذوب در دمای ۶۵ °C تا ۹۵ °C با دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad CFX96 اجرا شد. کارآیی کلیه تکثیرها محاسبه شده و مقادیر بین ۹۰ تا ۱۱۰ درصد به عنوان کارآیی مناسب در نظر گرفته شد. مقادیر r^2 نیز بین ۰/۹۹۴ تا ۱/۰۰۰ به‌دست آمد (Schmittgen and Livak, 2008).

جدول ۳- جزئیات پرایمرهای مورد استفاده برای انجام Real-time PCR کمّی

Table 3. Details of primers used for quantitative real-time PCR

Genes	Primer sequence (5′-3′)	Amplicon Size (bp)	T_a
Insulin receptor (*INSR*)	F: GCTCGCGCCTCTTCTTTAAT R: TGTCGTCTTTGTTCAGCACG	204	59
Insulin receptor substrate 1 (*IRS1*)	F: GCAAGACCATCAGCTTCGTG R: GTCTCATGCATGTTCTGGGC	190	59
Glucose transporter 1 (*GLUT1*)	F: TGTCCTACCTGAGCATCGTG R: AGGAGCACGGTGAAGATGAT	232	58
Glucose transporter 4 (*GLUT4*)	F: GCATCTTTGAGTCAGCAGGG R: AGAAGCAGAGCCACAGTCAT	184	59
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (*PPARγ*)	F: TTGCTGTGGGGATGTCTCAT R: TGTCGTCTTTCCCGTCAAGA	215	58
References Gene (*GAPDH*)	F: GTCGGAGTGAACGGATTTGG R: CATTGATGACGAGCTTCCCG	196	59

محاسبات و تجزیه و تحلیل آماری: کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1 (SAS, 2001) انجام شد. برای کمّی‌سازی نسبی اطلاعات حاصل از آزمایش بیان ژن تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد بر مبنای روش لایوک (Livak and Schmittgen, 2001) از فرمول‌نویسی در نرم افزار Microsoft Excel 2013 استفاده شد. برای تجزیه بیان ژن-های بافت ماهیچه‌ای از رویه Mixed نرم افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. مدل آماری شامل اثر تیمار به عنوان اثر ثابت و بره‌ها در داخل تیمار به عنوان اثر تصادفی بود. سطح معنی‌داری نیز پنج درصد در نظر گرفته شده و نتایج در قالب میانگین حداقل مربعات گزارش شد.

نتایج

میانگین حداکثر، حداقل و میانگین THI در دوره آزمایشی به ترتیب ۲/۶۵ ± ۳۵/۵، ۱/۴۲ ± ۱۹/۷، ۱/۵۳ ± ۲۵/۹ و میانگین رطوبت نسبی برابر با ۷۵/۰ درصد بود. الگوی روزانه THI در طول دوره آزمایشی در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که در پاسخ به سطوح افزایشی مکمل مخلوط گیاهان دارویی، بیان ژن‌های گیرنده انسولین (*INSR*) و حامل گلوکز ایزوتایپ ۴ (*GLUT4*) با تابعیت از نوع خطی تحت تاثیر قرار گرفتند. سطح بیان ژن *INSR* در سطح یک و دو درصد مخلوط گیاهان دارویی به ترتیب ۱/۸۳ و ۴/۱۷ برابر تیمار شاهد و بیان ژن *GLUT4* در سطوح یک و دو درصد مخلوط گیاهان دارویی به ترتیب ۲/۶۶ و ۵/۲۱ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. افزودن مخلوطی از گیاهان دارویی به جیره به‌صورت تابعیت درجه دوم، بیان ژن سوبسترای گیرنده انسولین یک (*IRS1*) را افزایش داد، به‌طوری که بیان این ژن در تیمار حاوی دو درصد مخلوط گیاهان دارویی نسبت به تیمار شاهد، ۳/۶۲ برابر بیشتر بود و بین تیمار یک درصد و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. علاوه بر این، هر دو سطح یک و دو درصد مکمل مخلوط گیاهان دارویی، به‌طور مساوی بیان ژن حامل گلوکز ایزوتایپ ۱ (*GLUT1*) را در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۲/۵۱ و ۲/۶۲ برابر افزایش دادند (P<۰/۰۱) (شکل ۲).

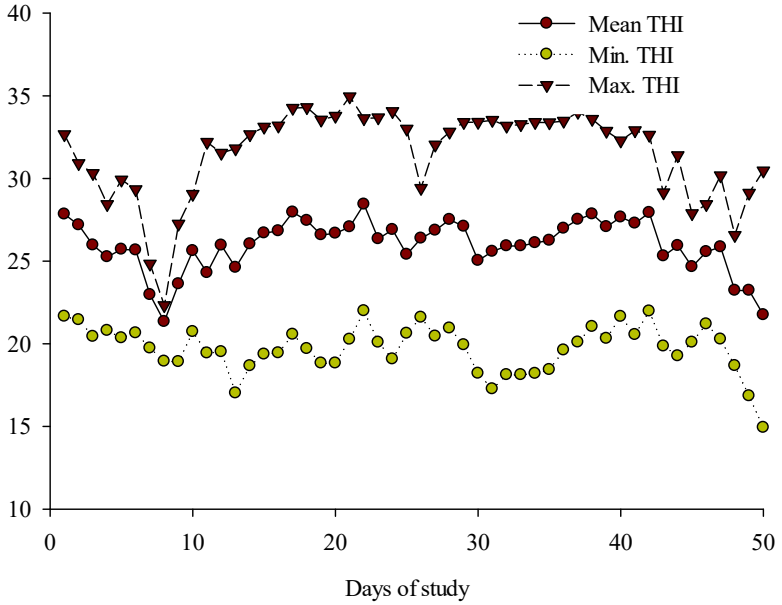

Fig. 1. Maximum, minimum and mean temperature-humidity index (THI) during the experimental period. The categories of THI for heat stress of sheep were assigned based on the study by Marai *et al.* (2007): thermal neutral (<22.2), moderate heat stress (22.2 ≤ THI ≤ 23.3), severe heat stress (23.3 ≤ THI ≤ 25.6), and extremely severe heat stress (THI ≥ 25.6).

شکل ۱- حداکثر، حداقل و میانگین شاخص دما-رطوبت (THI) طی دوره آزمایش. دسته‌های THI برای تنش گرمایی گوسفند از مطالعه Mari *et al.* (2007) اقتباس شده است: خنثی دمایی (دارای THI کمتر از ۲۲/۲)، تنش گرمایی متوسط (THI از ۲۲/۲ تا ۲۳/۳)، تنش گرمایی شدید (THI از ۲۳/۳ تا ۲۵/۶) و تنش گرمایی بسیار شدید (دارای THI بزرگتر از ۲۵/۶).

بر خلاف سایر ژن‌ها، بیان ژن گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پروکسی‌زوم گاما (*PPARγ*) به صورت تابعیت درجه دوم (P<۰/۰۱) به وسیله مخلوط گیاهان دارویی کاهش یافت، به‌طوری که سطح یک درصد از مخلوط گیاهان دارویی تغییری در بیان این ژن ایجاد نکرد، ولی در سطح دو درصد، بیان ژن به میزان ۰/۶۹ برابر نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت.

بحث

نتایج مطالعات و مرور منابع پیشین حاکی از آن است که گیاهان دارویی قادر به بهبود حساسیت به انسولین در آزمایشات درون‌تنی هستند و این محصولات بهبود فعالیت انسولین را از راه چندین مسیر، هدف قرار می‌دهند که از مهمترین آنها می‌توان به تقویت استفاده از گلوکز به وسیله ماهیچه‌ها و سلول‌های چربی با تنظیم فعالیت و بیان آنزیم-های کلیدی و انتقال‌دهنده‌های گلوکز، اشاره نمود (Eddouks *et al.,* 2014). علاوه بر این، نتایج نشان داده است که بسیاری از گیاهان دارویی از راه تحریک مسیرهای سیگنال‌دهی انسولین، حساسیت به انسولین را بهبود بخشیدند (Eddouks *et al.,* 2014). با توجه به بررسی منابع صورت گرفته، اطلاعات در زمینه تاثیر گیاهان دارویی بر بیان ژن‌های مربوط به سوخت و ساز گلوکز و انسولین در دام‌های پرواری بسیار کم است. در تحقیقی گزارش شده است که تشدید مقاومت انسولینی در گوساله‌های پرواری، راندمان استفاده از انرژی را کاهش داده است (Joy *et al.,* 2017). بنابراین، به نظر می‌رسد تغییر بیان ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز گلوکز و انسولین و متعاقباً تغییر در سوخت و ساز گلوکز با پاسخ‌های عملکردی بره‌های پرواری در ارتباط باشد.

در پژوهشی دیگر، تاثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد دام، وزن لاشه، برخی متابولیت‌های خونی و قدرت آنتی-اکسیدانی خون، عضلات و کبد بره‌ها در شرایط تنش گرمایی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد که مکمل

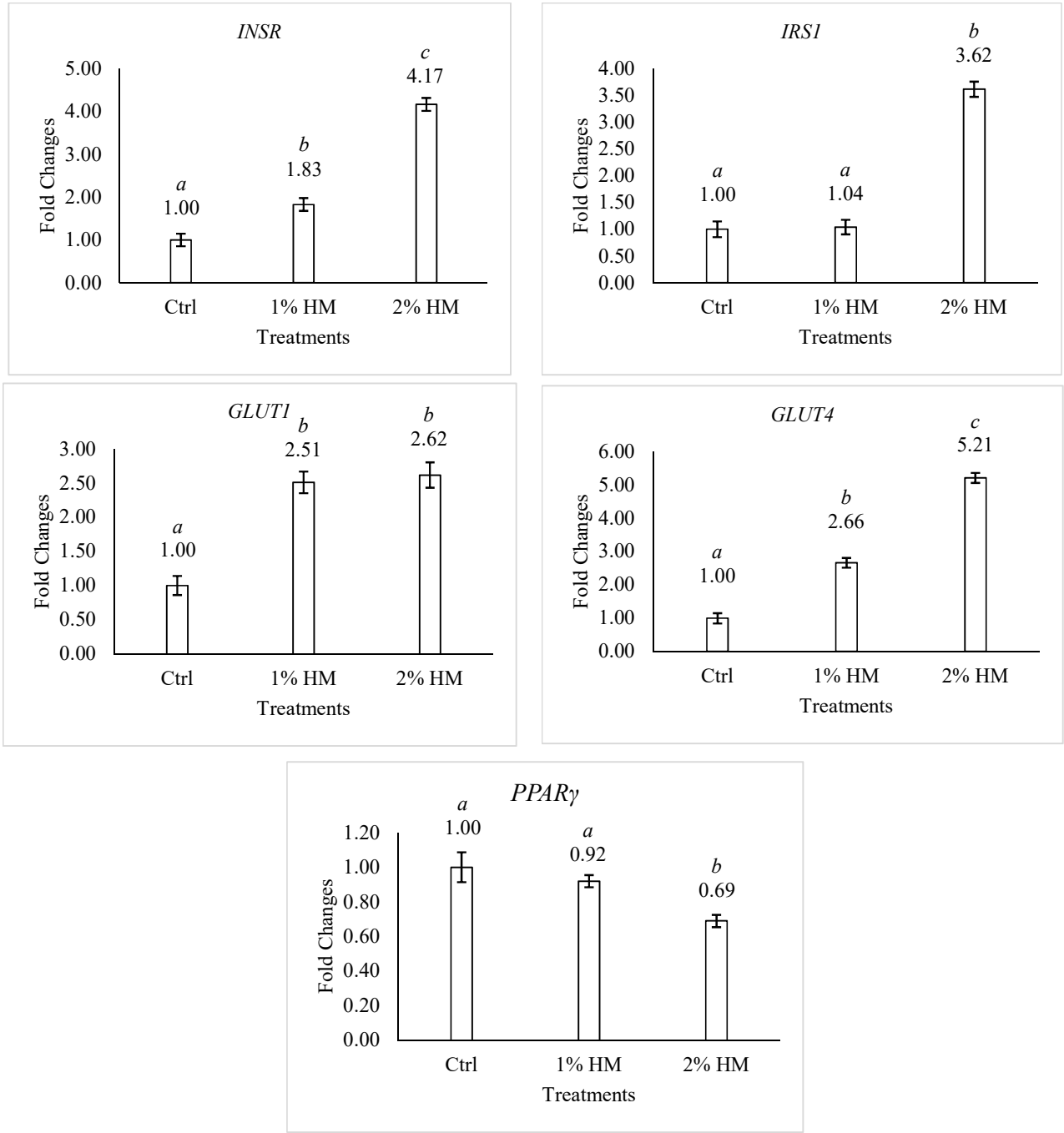

Fig. 2. Effects of herbal mixture supplementation on the expression of genes related to insulin receptors (*INSR* and *IRS1*), glucose uptake (*GLUT1* and *GLUT4*) and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (*PPARγ*) in skeletal muscle of heat-stressed fattening lambs. Bars with different letters in each figure are different ($P<0.05$). HM: Herbal mixture.

شکل ۲- آثار مکمل‌سازی مخلوط گیاهی بر بیان ژن‌های مرتبط با گیرنده‌های انسولین (*INSR* و *IRS1*)، حامل گلوکز (*GLUT1* و *GLUT4*) و *PPARγ* در عضله اسکلتی بره‌های پرواری در شرایط تنش گرمایی. حروف متفاوت روی هر ستون دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($P<۰/۰۵$). HM: مخلوط گیاهی.

کردن مخلوط گیاهان دارویی شامل دارچین، زردچوبه، رزماری و میخک (به ترتیب با نسبت‌های ۲۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰ درصد مکمل) در سطح دو درصد ماده خشک جیره، مصرف خوراک را در کل دوره آزمایشی به میزان ۱۸ درصد و افزایش وزن روزانه بره های پرواری را از روز ۲۹ تا ۴۸ آزمایش تقریباً ۴۸ درصد بهبود داد و همچنین درصد وزن لاشه بره‌های مورد تنش را افزایش داد (Hashemzadeh *et al*., 2022). همچنین مکمل گیاهان دارویی، فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز را که شاخصی از بهبود عملکرد کبد می باشد بهبود داد. از طرفی هر دو سطح افزودنی گیاهان دارویی سطح مالوندی‌آلدهید سرم را کاهش داده و سطح یک درصد افزودنی نیز سطح مالوندی‌آلدهید کبدی را کاهش داده و سطح دو درصد نیز قدرت آنتی‌اکسیدانی کبدی را بهبود داد (Hashemzadeh *et al*., 2022).

طبق طبقه‌بندی شاخص دمایی-رطوبتی، شاخص زیر ۲۲/۲ به‌عنوان شرایط خنثی دمایی، شاخص بین ۲۲/۲ و ۲۳/۳ به‌عنوان تنش متوسط، شاخص بین ۲۳/۳ و ۲۵/۶ به‌عنوان تنش گرمایی شدید و شاخص بیش از ۲۵/۶ به‌عنوان تنش گرمایی بسیار شدید در نظر گرفته می‌شود (Marai *et al*., 2007). بنابراین، بره‌ها در آزمایش حاضر در بیشتر ساعات روز در شرایط تنش گرمایی شدید تا بسیار شدید قرار داشتند. در یک پژوهش برون‌تنی نشان داده شد که در سلول‌های ماهیچه‌ای جدا شده از بره‌های زیر تنش حرارتی، ظرفیت اکسیداسیون گلوکز تحریک شده با انسولین مختل شده و سوخت و ساز گلوکز ناکارآمد می‌شود (Swanson *et al*., 2020). این پژوهشگران نشان دادند که که تنش گرمایی در شرایط درون‌تنی، رشد را کاهش داده و سوخت و ساز و رفاه دام را متاثر می‌نماید. همچنین نشان داده شد که احتمالاً برخی از عوامل همچون سطوح بالای هورمون-های تنش‌زا مانند کاتکولامین‌ها و اختلال سوخت و ساز گلوکز در این امر دخیل بوده‌اند (Swanson *et al*., 2020). از طرفی، تنش گرمایی می‌تواند واکنش‌های پیش التهابی و تنش‌های اکسیداتیو را القا نماید (Chauhan *et al*., 2020). بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که تنش گرمایی می‌تواند از مسیرهای مختلف متابولیکی بر کیفیت و کمیت تولیدات دامی تاثیرگذار بوده و در نهایت، دامپروری پایدار را تهدید نماید و خسارات اقتصادی زیادی را به دنبال داشته باشد (Chauhan *et al*., 2020). همچنین با افزایش نگرانی عمومی در مورد رفاه حیوانات و آگاهی مصرف‌کنندگان از ایمنی مواد غذایی، توجه به بهبود پاسخ‌های مربوط به تنش گرمایی برای بهبود عملکرد حیوانات و ارزش غذایی گوشت آنها افزایش یافته است.

ژن *INSR*، پروتئینی را کُد می‌کند که یک گیرنده غشایی از دسته گیرنده‌های تیروزین کیناز بوده و به وسیله انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین یک (IGF-I) و دو (IGF-II) تحریک می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن *INSR* در هر دو سطح افزودنی گیاه دارویی و *IRS1* در سطح دو درصد مکمل گیاه دارویی افزایش یافته است. نشان داده شده است که سطح بیان *IRS1* در بافت ماهیچه موش‌های مصرف‌کننده عصاره دارچین افزایش می‌یابد (Qin *et al*., 2003). همچنین نشان داده شده است که تغذیه یک گرم عصاره چای سبز موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن *IRS1* در ماهیچه موش‌ها می‌شود (Cao *et al*., 2007). بنابراین، نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که مخلوط گیاهان دارویی استفاده شده، همانند تحقیقات انجام شده در تک معده‌ای‌ها بر بیان ژن *INSR* موثر بود.

در این پژوهش، بیان ژن *GLUT1* و *GLUT4* در هر دو تیمار دریافت‌کننده مخلوط گیاهان دارویی افزایش یافت. نشان داده شد که اضافه کردن دارچین در سطح دو درصد جیره موش‌های مبتلا به مقاومت انسولینی سبب افزایش بیان ژن‌های *IRS1* و *IRS2* و همچنین *GLUT1* و *GLUT4* در بافت عضلانی بیشتر شده است (Couturier *et al*., 2011). همچنین نشان داده شده است که اضافه کردن کارنوزیک اسید، ماده فنولیک اصلی عصاره برگ گیاه رزماری، به محیط کشت حاوی سلول‌های ماهیچه می‌تواند فعالیت *GLUT4* را افزایش داده و جابجایی این گیرنده را بیشتر نموده و دسترسی به گلوکز به وسیله بافت‌های بدن را تحریک نماید (Lipina and Hundal, 2014). در موش-های مقاوم به انسولین، پودر دارچین و عصاره زردچوبه، حساسیت انسولین را با افزایش بیان ژن‌های *IRS1*، *IRS2*، *GLUT4* و *PPARγ* بهبود می‌بخشند (Nishiyama *et al*., 2005, Couturier *et al*., 2011). بافت‌های اصلی مورد هدف این گیاهان دارویی شامل بافت‌های محیطی (ماهیچه‌ها و سلول‌های چربی) یا کبد هستند. مخلوط گیاهان دارویی منجر به کاهش مقاومت انسولینی گاوهای دوره انتقال شده و عملکرد گاوها را در اوایل دوره شیردهی افزایش می‌دهند (Hashemzadeh-Cigari *et al*., 2014; Hashemzadeh-Cigari *et al*., 2015). با توجه به یافته‌های

حاضر می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که مکمل نمودن مخلوط گیاهان دارویی احتمالاً با افزایش سطح بیان ژن ناقلین گلوکز در کنار بهبود عملکرد انسولین با افزایش بیان ژن‌های گیرنده‌های انسولین، بهبود جذب گلوکز به وسیله بافت‌های عضلانی را به دنبال داشته و احتمالاً توجیهی بر بهبود افزایش وزن روزانه در تیمارهای دریافت‌کننده مخلوط گیاهان دارویی است.

در این پژوهش، بیان ژن *PPARγ* در اثر مصرف مخلوط گیاهان دارویی کاهش یافت. این در حالی بود که بیان یکی از ژن‌های هدف برای گیرنده فعال‌کننده تکثیر پراکسی‌زوم گاما (که ژن *GLUT4* است) بیشتر شد. گزارش شده است که اضافه نمودن سینامالدهید، ماده موثره اسانس دارچین، رونویسی *PPARγ* در بافت چربی را کاهش می‌دهد (Huang *et al*., 2011). از طرف دیگر، با توجه به اینکه ژن *PPARγ* به تنظیم بیان چندین ژن کد کننده پروتئین‌های دخیل در سوخت و ساز چربی مرتبط است و می‌تواند یک ژن موثر بر تجمع چربی داخل ماهیچه باشد (Ebrahimi *et al.,* 2018)، این احتمال وجود دارد که کاهش فعالیت ژن *PPARγ* به وسیله گیاهان دارویی، موجب افزایش تولید گوشت لُخم بدون چربی و بهبود کیفیت آن شود که از نظر سلامتی مفید است.

در پژوهش حاضر، بره‌ها در شرایط تنش گرمایی قرار داشتند. برخی شواهد حاکی از آن است که مقاومت انسولینی با مشکلاتی در تنظیم دمای بدن همراه است (DiGiacomo *et al*., 2014)، چون در شرایط تنش گرمایی، مصرف گلوکز بر مصرف منابع دیگر انرژی غالب می‌شود، موادی که حساسیت به انسولین را در بافت‌های احشایی تحریک می‌کنند، مانند تغذیه با مکمل کروم، ممکن است تحمل به تنش گرمایی را ارتقا داده و عملکرد تولیدی حیوانات را در این شرایط بهبود بخشند (Rhoads *et al*., 2013). در تایید این فرضیه، گنجاندن مکمل کروم در جیره گوساله‌های شیرخوار در شرایط تنش گرمایی منجر به افزایش حساسیت انسولین (Spears *et al*., 2012)، و افزایش مصرف خوراک و رشد شده است (Kargar *et al*., 2018). بنابراین همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، بهبود رشد و درصد وزن لاشه در بره‌های تغذیه شده با مخلوط مکمل گیاهان دارویی می‌تواند تا حدی با فراتنظیمی بیان ژن‌های مربوط به حساسیت انسولینی و یا افزایش انتقال گلوکز به داخل سلول در بافت عضلانی مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که مکمل حاوی مخلوط گیاهان دارویی شامل دارچین، زردچوبه، رزماری و میخک، بیان ژن‌های مرتبط با گیرنده انسولین و حاملین گلوکز شامل *GLUT1* و *GLUT2* را در شرایط تنش گرمایی شدید بهبود می‌بخشد. با توجه به اینکه تنش گرمایی می‌تواند آثار منفی زیادی بر سوخت و ساز و رشد بره‌های پرواری داشته باشد، افزایش حساسیت انسولین در بافت ماهیچه‌ای در پاسخ به مخلوط گیاهان دارویی می‌تواند با تاثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با سوخت و ساز انسولین و گلوکز، به عنوان یک راهبرد تغذیه‌ای برای بهبود رشد و تعدیل آثار تنش گرمایی در دام‌های پرواری مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۲۷/۱۷۹۹۰۴پ – ۱۳۹۴/۱۲/۰۴ مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان صورت گرفته است. علاوه بر این، نویسندگان از پشتیبانی‌های بی‌دریغ شرکت نوید مرغ گیلان و آزمایشگاه-های مرکزی و زیست‌فناوری دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان کمال تشکر و امتنان را دارند.

فهرست منابع

Anand, P., Murali, K. Y., Tandon, V., Murthy, P. S., & Chandra, R. (2010). Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, *186*, 72-81.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2000). Official methods of analysis. AOAC, Arlington, VA, USA.

Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., Rashamol, V. P., Pragna, P., Lees, A. M., & Sejian, V. (2019). The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Research in Veterinary Science*, *126*, 94-102.

BakIrel, T., BakIrel, U., Keles, O. Ü., Ülgen, S. G., & Yardibi, H. (2008). *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*(1): 64-73.

Belhadj Slimen, I., Chniter, M., Najar, T., & Ghram, A. (2019). Meta-analysis of some physiologic, metabolic and oxidative responses of sheep exposed to environmental heat stress. *Livestock Science*, *229*, 179-187.

Briskin, D. P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, *124*(2), 507-514.

Broadhurst, C. L. (1997). Nutrition and non-insulin dependent diabetes mellitus from an anthropological perspective. *Alternative Medicine Review*, *25*, 378-399.

Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., & Anderson, R. A. (2000). Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 849-852.

Cao, H., Polansky, M. M., & Anderson, R. A. (2007). Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *459*(2), 214-222.

Chauhan, S. S., Celi, P., Leury, B. J., Clarke, I. J., & Dunshea, F. R. (2014). Dietary antioxidants at supranutritional doses improve oxidative status and reduce the negative effects of heat stress in sheep. *Journal of Animal Science*, *92*(8), 3364-3374.

Chauhan, S. S., Dunshea, F. R., Plozza, T. E., Hopkins, D. L., & Ponnampalam, E. N. (2020). The impact of antioxidant supplementation and heat Stress on carcass characteristics, muscle nutritional profile and functionality of lamb meat. *Animals*, *10*(8), 1286.

Couturier, K., Qin, B., Batandier, C., Awada, M., Hininger-Favier, I., Canini, F., Leverve, X., Roussel, A. M., & Anderson, R. A. (2011). Cinnamon increases liver glycogen in an animal model of insulin resistance. *Metabolism*, *60*(11), 1590-1597.

Diesel, B., Kulhanek-Heinze, S., Höltje, M., Brandt, B., Höltje, H. D., Vollmar, A. M., & Kiemer, A. K. (2007). α-Lipoic acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis. *Biochemistry*, *46*(8), 2146-2155.

DiGiacomo, K., Leury, B. J., & Dunshea, F. R. (2014). Potential nutritional strategies for the amelioration or prevention of high rigor temperature in cattle – a review. *Animal Production Science*, *54*(4), 430-443.

Ebrahimi, M., Rajion, M. A., Jafari, S., Jahromi, M. F., Oskoueian, E., Sazili, A. Q., Goh, Y. M., & Ghaffari, M. H. (2018). Effects of dietary n-6: n-3 polyunsaturated fatty acid ratios on meat quality, carcass characteristics, tissue fatty acid profiles, and expression of lipogenic genes in growing goats. *PLoS ONE*, *13*, e0188369.

Eddouks, M., Bidi, A., Bouhali, E. L., Hajji, B., & Zeggwagh, N. A. (2014). Antidiabetic plants improving insulin sensitivity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *66*, 1197-1214.

Hashemzadeh-Cigari, F., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Kadivar, M., Riasi, A., & Zebeli, Q. (2014). Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, *97*, 7487-7497.

Hashemzadeh-Cigari, F., Ghorbani, G. R., Khorvash, M., Riasi, A., Taghizadeh, A., & Zebeli, Q. (2015). Supplementation of herbal plants differently modulated metabolic profile, insulin sensitivity, and oxidative stress in transition dairy cows fed various extruded oil seeds. *Preventive Veterinary Medicine*, *118*, 45-55.

Hashemzadeh, F., Rafeie, F., Hadipour, A., & Rezadoust, M. H. (2022). Supplementing a phytogenic-rich herbal mixture to heat-stressed lambs: Growth performance, carcass yield, and muscle and liver antioxidant status. *Small Ruminant Research*, *206*, 106596.

Honda, S., Aoki, F., Tanaka, H., Kishida, H., Nishiyama, T., Okada, S., Matsumoto, I., Abe, K., & Mae, T. (2006). Effects of ingested turmeric oleoresin on glucose and lipid metabolisms in obese diabetic mice: A DNA microarray study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(24), 9055-9062.

Huang, B., Yuan, H. D., Kim, D. Y., Quan, H. Y., & Chung, S. H. (2011). Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3666-3673.

Ibarra, A., Cases, J., Roller, M., Chiralt-Boix, A., Coussaert, A., & Ripoll, C. (2011). Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, *106*(08), 1182-1189.

Joy, F., McKinnon, J. J., Hendrick, S., Górka, P., & Penner, G. B. (2017). Effect of dietary energy substrate and days on feed on apparent total tract digestibility, ruminal short-chain fatty acid absorption, acetate and glucose clearance, and insulin responsiveness in finishing feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, *95*, 5606-5616.

Kargar, S., Mousavi, F., & Karimi-Dehkordi, S. (2018). Effects of chromium supplementation on weight gain, feeding behaviour, health and metabolic criteria of environmentally heat-loaded Holstein dairy calves from birth to weaning. *Archives of Animal Nutrition*, *72*(6), 443-457.

Khan, A., Bryden, N., Polansky, M., & Anderson, R. (1990). Insulin potentiating factor and chromium content of selected foods and spices. *Biological Trace Element Research*, *24*(2-3), 183-188.

Kuroda, M., Mimaki, Y., Ohtomo, T., Yamada, J., Nishiyama, T., Mae, T., Kishida, H., & Kawada, T. (2012). Hypoglycemic effects of clove (*Syzygium aromaticum* flower buds) on genetically diabetic KK-Ay mice and identification of the active ingredients. *Journal of Natural Medicines*, *66*(2), 394-399.

Lipina, C., & Hundal, H. S. (2014). Carnosic acid stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells via a PME-1/PP2A/PKB signalling axis. *Cellular Signalling*, *26*(11), 2343-2349.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*, 402-408.

Marai, I. F. M., El-Darawany, A. A., Fadiel, A., & Abdel-Hafez, M. A. M. (2007). Physiological traits as affected by heat stress in sheep-A review. *Small Ruminant Research*, *71*(1-3), 1-12.

Nishiyama, T., Mae, T., Kishida, H., Tsukagawa, M., Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashida, Y., Takahashi, K., Kawada, T., Nakagawa, K., & Kitahara, M. (2005). Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(4), 959-963.

Oh, J., Wall, E. H., Bravo, D. M., & Hristov, A. N. (2017). Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: A review. *Journal of Dairy Science*, *100*(7), 5974-5983.

Qin, B., Nagasaki, M., Ren, M., Bajotto, G., Oshida, Y., & Sato, Y. (2003). Cinnamon extract (traditional herb) potentiates *in vivo* insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *62*(3), 139-148.

Rhoads, M. L., Kim, J. W., Collier, R. J., Crooker, B. A., Boisclair, Y. R., Baumgard, L. H., and Rhoads, R. P. (2010). Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *Journal of Dairy Science*, *93*(1), 170-179.

Rhoads, R. P., Baumgard, L. H., Suagee, J. K., & Sanders, S. R. (2013). Nutritional interventions to alleviate the negative consequences of heat stress. *Advances in Nutrition*, *4*(3), 267-276.

NRC. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academies Press, USA.

Rychlik, W. (2007). OLIGO 7 primer analysis software. in: Yuryev, A. (Eds), PCR primer design, Methods in Molecular Biology, Vol 402. Humana Press. Pp. 35-59.

SAS Institue. (2009). SAS /STAT Users Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T Method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101-1108.

Soltan, M. A. (2010). Effect of dietary chromium supplementation on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows under heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *94*(2), 264-272.

Spears, J. W., Whisnant, C. S., Huntington, G. B., Lloyd, K. E., Fry, R. S., Krafka, K., Lamptey, A., & Hyda, J. (2012). Chromium propionate enhances insulin sensitivity in growing cattle. *Journal of Dairy Science*, *95*(4), 2037-2045.

Swanson, R. M., Tait, R. G., Galles, B. M., Duffy, E. M., Schmidt, T. B., Petersen, J. L., & Yates, D. T. (2020). Heat stress-induced deficits in growth, metabolic efficiency, and cardiovascular function coincided with chronic systemic inflammation and hypercatecholaminemia in ractopamine-supplemented feedlot lambs. *Journal of Animal Science*, *98*(6), 1-15.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*, 3583-3597.