Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 17, Issue 2, 2026 p: 80-91

OPEN ACCESS

Research Paper

The Effect of *In Ovo* Injection of D-Limonene on the Morphology of Digestive and Immune Tissues in Broiler Chicken Embryos

Ali Kalantari-Hesari[1], Bahman Navidshad[2, 3], Hossein Ali Hossein[3], Zeinab Hazbavi[4] and Maryam Royan[5]

1- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
2- Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, (Corresponding author: bnavidshad@guilan.ac.ir)
3- M. Sc., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
4- Department of Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
5- Animal Biotechnology Research Institute, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

Received: 22 September, 2025 Revised: 08 December, 2025 Accepted: 14 January, 2026

Extended Abstract

Background: The global poultry industry is actively seeking natural, safe, and effective alternatives to growth-promoting antibiotics, which have faced severe restrictions due to concerns about bacterial resistance and drug residues. In this context, phytogenic compounds and their derivatives have garnered significant attention due to their multiple biological properties, low toxicity, and biodegradability. D-limonene, a natural cyclic monoterpene abundantly found in citrus essential oils, is known for its antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial properties, and particularly its unique ability to inhibit the aromatase enzyme (the key enzyme in the conversion of androgens to estrogens). Furthermore, *in ovo* injection technology is a novel method for intervening during critical embryonic developmental stages and directly delivering bioactive compounds. This study was designed to investigate the effect of *in ovo* injection of two different levels of D-limonene on the morphology (histomorphometry) of digestive and immune organs in broiler chicken embryos. The primary hypothesis was that D-limonene could dose-dependently influence the growth and differentiation of these tissues through various mechanisms, including hormonal modulation and antioxidant protection.

Methods: This research was conducted on 160 fertile, homogeneous broiler breeder eggs (Ross 308) with an average weight of 65-68 g. The eggs were randomly assigned to a completely randomized design into four treatment groups of 40 eggs each: Control group (C) receiving no injection, Sham group (CW) injected with 0.1 mL of sterile distilled water, DL1 group injected with 0.1 mL of pure D-limonene extract, and DL2 group injected with 0.2 mL of the same D-limonene extract. Injection was performed on the fifth day of incubation via the air cell under fully sterile conditions. On the 18th day of incubation, tissue samples were collected from the digestive organs, including the esophagus, proventriculus, gizzard, small intestine (jejunum), and liver, as well as the primary immune organs, including the bursa of Fabricius, spleen, and thymus. After fixation in 10% buffered formalin, the samples underwent standard processing steps of dehydration, clearing, and paraffin embedding. Tissue sections of 5-7 µm thickness were prepared and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Histomorphometric examination was performed using a light microscope equipped with a digital camera and image analysis software. Numerous parameters, including epithelial thickness, muscular layer thickness, intestinal villus height, gland diameter, hepatocyte dimensions, and the dimensions of lymphoid structures in immune organs, were measured accurately. Data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) after ensuring normal distribution with the Shapiro-Wilk test; if significant, means were compared using Duncan's multiple range test at a significance level of $P < 0.05$.

Results: The findings of this research revealed significant and dose-dependent changes in response to D-limonene injection. In the digestive system, the high dose of D-limonene (DL2) caused a significant decrease in the thickness of the muscular layer in the esophagus and proventriculus, while simultaneously significantly increasing the diameter of the secretory glands in these organs. In the gizzard, the low dose (DL1) significantly increased the thickness of the muscular layer, whereas the high dose (DL2) led to an increase in the depth of the mucosal glands.

Copyright ©2026 Kalantari-Hesari et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

In the small intestine (jejunum), D-limonene injection at both doses caused a significant increase in epithelial thickness, villus height, and muscular layer thickness; the increased villus height indicates a strong potential for improving the surface area for nutrient absorption. In the liver, the diameter of hepatocytes and their nuclei increased significantly in the D-limonene-treated groups, suggesting the hypertrophy of liver cells. In the immune system, the results were even more notable. The high dose of D-limonene (DL2) caused a significant increase in the diameter of the lymphoid nodules in the bursa of Fabricius, the diameter of the spleen's white pulp (lymphocyte-producing areas), and the thickness of the thymic lobules' medulla. These results clearly demonstrate that D-limonene affects not only the digestive tissues but also the development and early maturation of the immune system.

This study convincingly demonstrates that the *in ovo* injection of D-limonene on the 15th day of incubation is an effective strategy for modulating the growth and development of digestive and immune tissues in broiler chicken embryos. The observed effects, which were predominantly dose-dependent, are exerted through multiple interconnected mechanisms, including aromatase inhibition, antioxidant activity, and stimulation of secretion. In summary, the low dose of D-limonene is more beneficial for strengthening the muscular structures of the digestive tract and improving the intestinal absorptive potential, while the higher dose has greater potential for enhancing secretory capabilities and, particularly, strengthening and developing the primary immune system.

Conclusion: These findings provide a solid scientific basis for considering D-limonene as a natural growth promoter and immune modulator in poultry breeding programs, especially through the novel technology of *in ovo* injection. However, to translate these laboratory findings into practical applications at the industrial level, further studies are essential to evaluate the impact of this intervention on growth performance, feed conversion ratio, general health, and response to immune challenges during the post-hatch period, as well as to gain a deeper understanding of the underlying molecular mechanisms of these effects.

Keywords: Broiler chicken, D-limonene, Digestive system, Embryo, Histomorphometry, Immune system, In ovo injection

How to Cite This Article: Kalantari-Hesari, A., Navidshad, B., Hossein, H. A., Hazbavi, Z., & Royan, M. (2026). The Effect of *In Ovo* Injection of D-Limonene on the Morphology of Digestive and Immune Tissues in Broiler Chicken Embryos. *Res Anim Prod,* 17(2), 80-91. DOI: 10.61882/rap.2026.1579

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

مقاله پژوهشی

تأثیر تزریق داخل تخم‌مرغی دی‌لیمونن بر ریخت‌شناسی بافت‌های گوارشی و ایمنی در جنین جوجه‌های گوشتی

علی کلانتری حصاری[۱]، بهمن نویدشاد[۲و۳]، حسین علی حسین[۳]، زینب حزباوی[۴] و مریم رویان [۵]

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲- گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، (نویسنده مسوول: bnavidshad@guilan.ac.ir)
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴- گروه مدیریت مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۵- پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (ARREEO)، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۳۱ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۴
صفحه: ۸۰ تا ۹۱

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: صنعت طیور در سراسر جهان به‌دنبال جایگزین‌های طبیعی، ایمن و موثر برای آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد است که به‌دلیل نگرانی‌های مربوط به مقاومت باکتریایی و باقی‌مانده‌های دارویی، با محدودیت‌های شدیدی مواجه شده‌اند. در این راستا، ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها به‌دلیل دارا بودن خواص بیولوژیک متعدد، سمیت پایین و قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. دی‌لیمونن، یک مونوترپن حلقوی طبیعی که به‌وفور در اسانس مرکبات یافت می‌شود، به‌خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و به‌ویژه توانایی منحصر به‌فرد آن در مهار آنزیم آروماتاز (آنزیم کلیدی در تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها) شناخته شده است. از سوی دیگر، فناوری تزریق درون تخم‌مرغی (*in ovo*) یک روش نوین برای مداخله در مراحل حساس رشد جنینی و ارائه مستقیم ترکیبات زیست فعال است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی دو سطح مختلف دی‌لیمونن بر ریخت‌شناسی (هیستومورفومتری) اندام‌های گوارشی و ایمنی در جنین جوجه‌های گوشتی طراحی شد. فرضیه اصلی این بود که دی‌لیمونن می‌تواند با مکانیسم‌های مختلف از جمله تعدیل هورمونی و محافظت آنتی‌اکسیدانی، رشد و تمایز این بافت‌ها را به‌صورت دوز وابسته تحت تأثیر قرار دهد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش بر روی ۱۶۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار و همگن از گله مادر تجاری گوشتی (راس ۳۰۸) با میانگین وزن ۶۸-۶۵ گرم انجام شد. تخم‌مرغ‌ها به‌طور تصادفی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به چهار گروه تیماری ۴۰ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل ۱ (C) که هیچ‌گونه تزریقی دریافت نکرد، گروه کنترل ۲ (CW) که ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تزریق شد، گروه DL1 که ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس خالص دی‌لیمونن تزریق شد و گروه DL2 که ۰/۲ میلی‌لیتر از همان اسانس دی‌لیمونن را دریافت کرد. تزریق در روز پنجم جوجه‌کشی و از طریق اتاقک هوایی با رعایت کامل شرایط استریل انجام پذیرفت. در روز هجدهم جوجه‌کشی، نمونه‌های بافتی از اندام‌های گوارشی شامل مری، پیش‌معده، سنگدان، روده کوچک (ژژنوم) و کبد، و همچنین اندام‌های ایمنی اولیه شامل بورس فابرسیوس، طحال و تیموس جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از تثبیت شدن در فرمالین بافری ۱۰ درصد، مراحل استاندارد آب‌گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری در پارافین را طی کردند و مقاطع بافتی به ضخامت پنج تا هفت میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. بررسی هیستومورفومتریک با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال و نرم‌افزار تحلیل تصویر انجام شد و پارامترهایی از جمله ضخامت اپیتلیوم، ضخامت لایه ماهیچه‌ای، ارتفاع پرزهای روده، قطر غدد، ابعاد هپاتوسیت‌ها و ابعاد ساختارهای لنفاوی در اندام‌های ایمنی به دقت اندازه‌گیری شدند. داده‌ها پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk، با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: این پژوهش تغییرات معنی‌دار و دوز وابسته‌ای را در پاسخ به تزریق دی‌لیمونن نشان داد. در دستگاه گوارش، دوز بالای دی‌لیمونن (DL2) باعث کاهش معنی‌دار ضخامت لایه عضلانی مری و پیش‌معده شد، اما در عین حال، قطر غدد ترشحی در این اندام‌ها به‌طور چشمگیری افزایش یافت. در سنگدان، دوز پایین (DL1) موجب افزایش معنی‌دار ضخامت لایه عضلانی شد، در حالی‌که دوز بالا (DL2) منجربه افزایش عمق غدد مخاطی شد. در روده کوچک (ژژنوم)، تزریق دی‌لیمونن در هر دو دوز باعث افزایش معنی‌دار ضخامت اپیتلیوم، ارتفاع پرزها و ضخامت لایه عضلانی شد که افزایش ارتفاع پرزها نشان دهنده پتانسیل قوی برای بهبود سطح جذب مواد مغذی است. در کبد، قطر هپاتوسیت‌ها و هسته آن‌ها در گروه‌های درمان شده با دی‌لیمونن به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، که حاکی از هایپرتروفی سلول‌های کبدی است. در سیستم ایمنی، نتایج حتی قابل توجه‌تر بود. دوز بالای دی‌لیمونن (DL2) باعث افزایش معنی‌دار قطر گره‌های لنفاوی در بورس فابرسیوس، قطر پولپ سفید طحال (مناطق تولید لنفوسیت) و ضخامت مرکز لبول‌های تیموسی شد. این نتایج به وضوح نشان می‌دهند که دی‌لیمونن نه تنها بر بافت‌های گوارشی، بلکه بر گسترش و بلوغ اولیه سیستم ایمنی نیز تأثیر می‌گذارد.

نتیجه‌گیری: این پژوهش به‌طور قانع کننده‌ای اثبات کرد که تزریق درون تخم‌مرغی دی‌لیمونن در روز پنجم جوجه‌کشی یک راهبرد مؤثر برای تعدیل رشد و توسعه بافت‌های گوارشی و ایمنی در جنین جوجه گوشتی است. اثرات مشاهده شده که عمدتاً وابسته به دوز بودند، از طریق مکانیسم‌های چندگانه و به هم پیوسته‌ای شامل مهار آروماتاز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تحریک ترشح اعمال می‌شوند. به‌طور خلاصه، دوز پایین دی‌لیمونن بیشتر برای تقویت ساختارهای عضلانی دستگاه گوارش و بهبود پتانسیل جذبی روده سودمند است، در حالی‌که دوز بالاتر پتانسیل بیشتری در تقویت قابلیت‌های تراوش و به‌ویژه، تقویت و توسعه سیستم ایمنی اولیه دارد. این یافته‌ها پایه علمی محکمی را برای در نظر گرفتن دی‌لیمونن به‌عنوان یک محرک رشد طبیعی و تعدیل‌کننده ایمنی در برنامه‌های پرورش طیور، به ویژه از طریق فناوری نوین تزریق درون تخم‌مرغی ، فراهم می‌کند. با این حال، برای کاربردی‌سازی این یافته‌های آزمایشگاهی در صنعت، لازم است مطالعات بیشتری صورت گیرند تا تأثیر مداخله‌ی مذکور بر عملکرد رشد، ضریب تبدیل غذایی، سلامت عمومی و نیز پاسخ جوجه‌ها به چالش‌های ایمنی در دوره پس از تولد ارزیابی شود. همچنین، درک دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولیِ زمینه‌ساز این اثرات ضروری است.

واژه‌های کلیدی: تزریق درون تخم‌مرغی، جنین، جوجه گوشتی، دستگاه گوارش، دی‌لیمونن، سیستم ایمنی، هیستومورفومتری

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

مقدمه

صنعت طیور به‌عنوان یکی از مهم‌ترین زیرشاخه‌های بخش کشاورزی، نقش حیاتی را در تأمین پروتئین حیوانی با کیفیت و ارزان‌قیمت برای جمعیت رو به رشد جهان ایفا می‌کند (Mottet & Tempio, 2017). در این راستا، بهینه‌سازی عملکرد رشد، سلامت و بازده تولید از اهداف اصلی و همیشگی این صنعت محسوب می‌شوند. در دهه‌های اخیر، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد به‌دلیل نگرانی‌های جدی در مورد ایجاد و گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و باقی‌مانده‌های دارویی در محصولات دامی، با محدودیت‌های شدیدی مواجه شده است (Gadde *et al*., 2017). این چالش، محققان و متخصصان صنعت طیور را بر آن داشته است تا به‌دنبال جایگزین‌های ایمن، طبیعی و مؤثری باشند که بتوانند ضمن حفظ سلامت و بهره‌وری گله، نگرانی‌های بهداشت عمومی و محیط زیست را نیز برطرف سازند.

در این میان، ترکیبات گیاهی و مشتقات آن‌ها به‌دلیل دارا بودن خواص بیولوژیک متعدد، سمیت پایین و قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند (Brenes & Roura, 2010). در بین این ترکیبات، اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جایگاه برجسته‌ای برخوردارند. دی‌لیمونن یک مونوترپن حلقوی طبیعی است که به وفور در اسانس مرکباتی مانند پرتقال، لیمو و گریپ‌فروت یافت می‌شود (Sun, 2007). این ترکیب نه تنها به‌دلیل عطر و طعم مطبوع، بلکه به خاطر طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیک مورد مطالعه قرار گرفته است. از مهم‌ترین خواص گزارش شده برای دی لیمونن می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی، ضدقارچی و حتی ضدسرطانی اشاره کرد (Crowell, 1999; Yu *et al*., 2010; Fisher & Phillips, 2008).

یکی از مکانیسم‌های جالب توجه و نسبتاً منحصر به‌فرد دی‌لیمونن، توانایی آن در مهار آنزیم آروماتاز (CYP19A1) است (Miller *et al*., 2011). آروماتاز، آنزیمی کلیدی از خانواده سیتوکروم P450 است که کاتالیز واکنش تبدیل آندروژن‌ها (مانند تستوسترون) به استروژن‌ها (مانند استرادیول) را بر عهده دارد (Miller & Larionov, 2012). مهار این آنزیم می‌تواند توازن هورمونی درون‌زا را به نفع مسیرهای آندروژنی تغییر دهد. از آن‌جا که استروژن‌ها به‌عنوان فاکتورهای مهار کننده رشد در برخی بافت‌ها از جمله بافت عضلانی عمل می‌کنند، کاهش سطح آن‌ها می‌تواند پتانسیل افزایش رشد عضلانی و بهبود ترکیب لاشه را داشته باشد (Fennell *et al*., 1996). علاوه بر این، استروژن اثرات سرکوب‌گرانه‌ای بر سیستم ایمنی دارد و کاهش آن ممکن است منجر به تقویت پاسخ‌های ایمنی شود (Tingaud-Sequeira *et al*., 2004).

از سوی دیگر، توسعه فناوری‌های نوین در مدیریت جنین طیور، افق‌های جدیدی را برای بهبود عملکرد پس از تولد گشوده است. روش تزریق درون تخم‌مرغی (*in ovo*) یک تکنیک پیشرفته است که امکان مداخله در مراحل حساس رشد جنینی و ارائه مستقیم مواد مغذی، واکسن‌ها، پروبیوتیک‌ها و سایر ترکیبات زیست‌فعال را فراهم می‌سازد (Jamshab & Mottaghitalab, 2019; Khan *et al*., 2021; Uni *et al*., 2005). این روش اجازه می‌دهد تا ترکیبات مورد نظر در زمانی که اندام‌ها در حال شکل‌گیری و تمایز هستند، در دسترس جنین قرار گیرند و اثر پایداری بر فیزیولوژی و عملکرد پرنده در دوره پرورش داشته باشند. استفاده از این روش، امکان بهره‌برداری از پتانسیل کامل ترکیبات گیاهی مانند دی‌لیمونن را برای تنظیم و بهبود رشد و سلامت جوجه‌ها از نخستین مراحل زندگی فراهم می‌سازد.

با توجه به خواص چندگانه دی‌لیمونن (به‌ویژه خاصیت آنتی‌آروماتازی، آنتی‌اکسیدانی و تعدیل ایمنی) و همچنین پتانسیل بالای روش تزریق درون تخم‌مرغی برای هدف‌گیری مراحل اولیه رشد، این فرضیه مطرح شد که تزریق دی‌لیمونن در دوره جنینی می‌تواند تأثیر ساختاری بر اندام‌های گوارشی و ایمنی جوجه گوشتی داشته باشد. بنا بر این، هدف از این پژوهش، بررسی دقیق تأثیر هیستومورفومتریک تزریق درون تخم‌مرغی دو سطح مختلف از دی‌لیمونن بر بافت‌های مری، پیش‌معده، سنگدان، روده کوچک، کبد، بورس فابرسیوس، طحال و تیموس در جنین جوجه گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی، طرح تیمارها و مدیریت جوجه‌کشی

در این مطالعه از تعداد ۱۶۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار و همگن از گله مادر تجاری گوشتی (Ross 308) با میانگین وزن ۶۵–۶۸ گرم استفاده شد. پیش از شروع جوجه‌کشی، تخم‌مرغ‌ها از نظر سلامت پوسته و ترک‌خوردگی یا شکستگی بررسی شدند. تخم‌مرغ‌ها به‌طور کاملاً تصادفی (با استفاده از طرح کاملاً تصادفی) به چهار گروه تیماری با ۴۰ عدد تخم‌مرغ در هر تیمار تقسیم شدند:

گروه کنترل ۱ (Non-injected control) (C): این گروه هیچ گونه تزریقی را دریافت نکردند.

گروه کنترل ۲ (Sham control) (CW): به این گروه، ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تزریق شد.

گروه با تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس خالص دی‌لیمونن (DL1) (Citrus & Allied Essences Ltd, Spain) .

گروه با تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر اسانس خالص دی‌لیمونن (DL2). اسانس دی‌لیمونن مورد استفاده در آزمایش دارای خلوص ۹۵ درصد بود.

تمام تخم‌مرغ‌ها در یک دستگاه جوجه‌کشی صنعتی با قابلیت چرخش اتوماتیک قرار داده شدند. شرایط محیطی دستگاه‌ها به‌طور جداگانه برای دوره‌های ستر و هچر تنظیم و پیوسته پایش شدند. در دوره ستر، دما بر روی ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی بر روی ۵۶ درصد ثابت نگه داشته شدند. در مرحله هچر، دما به ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاهش و رطوبت نسبی به ۷۰ درصد افزایش یافت.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

روش تزریق درون تخم‌مرغی

تزریق در روز پنجم جوجه‌کشی انجام پذیرفت. ابتدا، سطح پوسته تخم‌مرغ در ناحیه فوقانی (محل اتاقک هوایی) با استفاده از الکل ۷۰ درصد به‌طور کامل ضدعفونی شد. سپس، با استفاده از یک سوزن استریل و نازک (شماره ۲۳)، منفذ کوچکی در پوسته ایجاد شد. حجم‌های مشخص شده از محلول‌ها (آب مقطر یا اسانس دی‌لیمونن) با دقت و به آرامی توسط سرنگ‌های انسولین مدرج (یک میلی‌لیتری) به درون اتاقک هوایی تزریق شدند. بلافاصله پس از تزریق، منفذ ایجادشده با استفاده از پارافین پزشکی استریل و مذاب کاملاً مسدود شد تا از تبخیر محتویات و ورود آلودگی‌های میکروبی جلوگیری شود. تخم مرغ‌های گروه کنترل ۱ نیز تنها در معرض عملیات شبه‌تزریق (مانند دستکاری و ضدعفونی) قرار گرفتند ولی تزریقی را دریافت نکردند. در روز دهم جوجه‌کشی، کلیه تخم‌مرغ‌ها توسط دستگاه نطفه‌سنج بررسی شدند و تخم‌مرغ‌های فاقد جنین زنده یا دارای توقف رشد (در مجموع ۲۴ عدد) از مطالعه حذف شدند.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی بافت‌ها برای بررسی هیستولوژیکی

در روز هجدهم جوجه‌کشی، نمونه‌برداری از جنین همه تخم‌ها انجام شد. پس از مرگ آرام از طریق تخریب مغز جنین‌ها، نمونه‌های بافتی از اندام‌های هدف شامل بخش‌های مختلف دستگاه گوارش (مری گردنی، پیش‌معده، سنگدان، ژژنوم و کبد) و اندام‌های ایمنی اولیه (بورس فابرسیوس، طحال و تیموس) با دقت جدا شدند. نمونه‌ها بلافاصله در محلول فیکساتور بافری فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و برای حداقل ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا به‌طور کامل تثبیت شوند.

فرآیند بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی

پس از تثبیت، نمونه‌های بافتی طی یک فرآیند استاندارد برای تهیه مقاطع پارافینی آماده شدند. این فرآیند شامل مراحل آب‌گیری (با استفاده از گرادیان الکل)، شفاف‌سازی (با استفاده از گزیلول) و آغشتگی و قالب‌گیری در پارافین بود که توسط یک دستگاه تیشو پروسسور اتوماتیک (اتوتکنیکون مدل DS9602، شرکت دیده‌سبز، ایران) انجام شد. پس از پایان پاساژ بافتی، بلوک‌های پارافینی تهیه و از این بلوک‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم (مدل Rotary DS4055، شرکت دیده سبز، ایران) برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شدند. این مقاطع بر روی لام‌های شیشه‌ای قرار داده شدند و سپس برای رنگ‌آمیزی با روش استاندارد هماتوکسیلین–ائوزین (HandE) مورد استفاده قرار گرفتند (Kalantari-Hesari *et al.*, 2022). پس از رنگ‌آمیزی، مقاطع توسط لامل پوشانده و با چسب مونت مخصوص فیکس شدند.

تعیین جنسیت جنین‌ها

برای تعیین جنسیت جنین‌ها، از آن‌جایی که برخی از اندام‌ها دفرمه بودند و تشخیص قطعی بیضه یا تخمدان مشکل بود، نمونه‌های مشکوک به اندام تناسلی اخذ شدند و تعیین بیضه یا تخمدان بعد از تهیه مقطع بافتی و بررسی بافت‌شناسی انجام شد.

بررسی هیستومورفومتریکی

مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده تحت میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال با بزرگنمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. برای هر نمونه و هر پارامتر، حداقل ۱۰ میدان تصادفی انتخاب و اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نرم‌افزار تحلیل تصویر DinoCapture انجام شد (Singh *et al.*, 2023). پارامترهای اندازه‌گیری شده برای هر بافت به شرح زیر بودند:

مری: ضخامت اپیتلیوم، ضخامت لایه زیرمخاط، ضخامت لایه عضلانی و قطر غدد مری.

پیش‌معده: ضخامت اپیتلیوم، ضخامت لایه عضلانی و قطر غدد.

سنگدان: ضخامت اپیتلیوم، عمق غدد مخاطی، قطر غدد مخاطی و ضخامت لایه عضلانی.

ژژنوم: ضخامت اپیتلیوم، ارتفاع پرز، ضخامت پرز، عمق کریپت، قطر کریپت و ضخامت لایه عضلانی.

کبد: قطر هپاتوسیت‌ها، قطر هسته هپاتوسیت‌ها و قطر سینوزوئیدها.

بورس فابرسیوس: ضخامت اپیتلیوم پوشاننده و قطر گره‌های لنفاوی.

طحال: قطر پولپ قرمز و قطر پولپ سفید.

تیموس: ضخامت قشر و ضخامت مرکز لبول‌های تیموسی.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های هیستومورفومتریکی جمع‌آوری شده پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع آن‌ها با آزمون Shapiro-Wilk با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌های تیمارها در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمار، با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ($P<$ ۰/۰۵) انجام شد. کلیه تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شدند.

نتایج و بحث

ساختار بافتی غدد تناسلی تخمدان و بیضه

در بررسی تمایز غدد جنسی تیمارهای مختلف در روز ۱۸، از ۴۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار در تیمار بدون تزریق، تعداد ۲۳ عدد دارای بافت گناد تخمدان قابل تشخیص و ۱۰ عدد دارای بافت گناد بیضه قابل تشخیص بودند. تعداد هفت عدد از تخم مرغ‌ها در روز ۱۰ توقف رشد جنین داشتند که پس از بررسی توسط دستگاه نطفه‌سنج از مطالعه حذف شدند. در تیمار تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر ۲۱ عدد تخم‌مرغ دارای بافت گناد تخمدان قابل تشخیص و ۱۱ عدد دارای بافت گناد بیضه قابل تشخیص بودند. تعداد هشت عدد از تخم‌مرغ‌ها در روز ۱۰ توقف رشد جنین داشتند که پس از بررسی توسط دستگاه نطفه‌سنج از مطالعه حذف شدند. در تیمار تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس دی‌لیمونن ۱۰ عدد دارای بافت گناد تخمدان قابل تشخیص و ۲۵ عدد دارای بافت گناد بیضه قابل تشخیص بودند. تعداد پنج عدد از تخم‌مرغ‌ها در روز ۱۰ توقف رشد جنین داشتند که پس از بررسی توسط دستگاه نطفه‌سنج از مطالعه حذف شدند.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

نهایتاً در تیمار تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر اسانس دی‌لیمونن، تعداد پنج عدد دارای بافت تخمدان قابل تشخیص و ۳۱ عدد دارای بافت بیضه قابل تشخیص بودند. تعداد چهار عدد از تخم مرغ‌ها در روز ۱۰ توقف رشد جنین داشتند که پس از بررسی توسط دستگاه نطفه‌سنج از مطالعه حذف شدند (جدول ۱).

جدول ۱- اثر تزریق درون تخم‌مرغی دی‌لیمونن بر ساختار بافتی غدد تناسلی تخمدان و بیضه جنین جوجه
Table 1. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the tissue structure of the gonads (ovary and testis) in chicken embryos.

Excluded Eggs تعداد تخم‌مرغ‌های حذف شده	Number of Formed Testicular Gonads تعداد تشکیل گناد بیضه	Number of Formed Ovarian Gonads تعداد تشکیل گناد تخمدان	Number of Fertile Eggs مرغ نطفه‌دارتعداد تخم	Treatment تیمار
7 (17.5%)	10 (25%)	23 (57.5 %)	40	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
8 (20 %)	11 (27.5%)	21 (52.5%)	40	Sterile Distilled Water Injection کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
5 (12.5%)	25 (62.5 %)	10 (25%)	40	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
4 (10%)	31 (77.5%)	5 (12.5%)	40	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی‌لیمونن

در بررسی حاضر، تغییرات مشاهده‌شده در ساختار بافتی گنادها (تخمدان و بیضه) می‌توانند نشان دهنده تأثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد سیستم تولیدمثل باشند. در تخمدان، افزایش تعداد فولیکول‌های در حال رشد و کاهش فولیکول‌های آترتیک در برخی تیمارها بیانگر بهبود فعالیت فولیکولوژنسیز و وضعیت فیزیولوژیک بهتر تخمدان است (Johnson, 2015; Etches, 1996). فولیکول‌های سالم با لایه گرانولوزای منظم و اووسیت با مورفولوژی طبیعی، شاخص‌های مهمی از تعادل هورمونی و عملکرد مناسب محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد محسوب می‌شوند. از سوی دیگر، در تیمارهایی که افزایش فولیکول‌های آترتیک یا تخریب ساختاری مشاهده شد، می‌توان این تغییرات را به بروز تنش اکسیداتیو و عدم تعادل تغذیه‌ای یا اختلال در ترشح هورمون‌های جنسی نسبت داد. گزارش شده است که افزایش تنش اکسیداتیو می‌تواند منجر به آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا و در نتیجه افزایش تحلیل فولیکولی شود (Devine & Perreault, 2012; Surai, 2002).

در بافت بیضه نیز افزایش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، تراکم بیشتر سلول‌های زایای اسپرماتوژنیک و حضور منظم مراحل مختلف اسپرماتوژنز (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) نشان دهنده بهبود فعالیت اسپرم‌سازی در تیمارها هستند (Hess & França, 2008; Sharpe, 1994). همچنین، وجود سلول‌های سرتولی سالم و سازمان یافته، نقش مهمی در تمایز و بلوغ سلول‌های زایا ایفا می‌کند. در مقابل، کاهش ضخامت اپی‌تلیوم زایا، اختلال در آرایش سلولی و کاهش تعداد سلول‌های زایا می‌توانند بیانگر اثرات منفی تیمارها بر فرآیند اسپرم‌سازی باشند که معمولاً در شرایط تنش تغذیه‌ای یا حضور ترکیبات مضر گزارش شده است (Sharpe, 1994; Surai, 2002).

به‌طور کلی، یافته‌های بافت‌شناسی این مطالعه نشان می‌دهند که تیمارهای آزمایشی می‌توانند از طریق تأثیر بر تعادل اکسیداتیو و وضعیت هورمونی، ساختار و عملکرد گنادها را تحت تأثیر قرار دهند و این تغییرات می‌توانند به‌صورت مستقیم با عملکرد تولیدمثلی حیوان مرتبط باشند (Etches, 1996; Surai, 2002).

تأثیر تیمارهای مختلف بر ساختار بافت مری

بررسی مقاطع بافتی مری، ساختار طبیعی شامل اپیتلیوم سنگفرشی مطبق، لایه همبند سست زیرمخاط، غدد موکوسی و لایه عضلانی حلقوی و طولی را نشان داد. از نظر هیستومورفومتریک، میانگین ضخامت اپیتلیوم و لایه زیرمخاط در گروه‌های تیمارشده با دی–لیمونن اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (به‌ترتیب P = ۰/۴۷۹۹ و P = ۰/۴۰۰۷). با این‌حال، تغییرات معنی‌داری در لایه عضلانی و غدد مری مشاهده شدند. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، ضخامت لایه عضلانی در گروه DL2 به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل ۱ و گروه DL1 بود (P < ۰/۰۰۱۶). از سوی دیگر، قطر غدد مری در هر دو گروه دریافت کننده دی–لیمونن (DL1 و DL2) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۱ و کنترل ۲ (تزریق آب مقطر) بود (P < ۰/۰۰۱۲) .

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

جدول ۲- اثر تزریق درون تخم مرغی دی-لیمونن بر بافت مری جنین
Table 2. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the esophageal tissue of embryos

Gland Diameter (µm) قطر غدد مری (میکرومتر)	Muscular Layer Thickness (µm) ضخامت لایه عضلانی مری (میکرومتر)	Submucosa Thickness (µm) ضخامت زیرمخاط مری (میکرومتر)	Epithelium Thickness (µm) ضخامت اپیتلیوم مری (میکرومتر)	Treatment تیمار
131.2 ± 11.49[b]	139.0 ± 9.00[a]	139.1 ± 30.74	19.2 ± 2.53	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
139.0 ± 11.49[b]	98.5 ± 9.00[b]	91.6 ± 30.74	17.7 ± 2.53	Sterile Distilled Water Injection کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
180.8 ± 11.49[a]	118.0 ± 9.00[b]	133.5 ± 30.74	20.4 ± 2.53	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
202.25 ± 13.28[a]	65.9 ± 10.40[c]	68.3 ± 35.49	14.4 ± 2.92	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
0.0012	0.0016	0.4007	0.4799	P-Value

a-c مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P > 0.05$).
a-c Means with different superscripts within a column are different significantly ($P < 0.05$).

تأثیر تیمارهای مختلف بر ساختار بافت پیش‌معده

ساختار بافتی پیش‌معده در تمام گروه‌ها شامل اپیتلیوم استوانه‌ای ساده، غدد ترشحی واقع در لایه پروپریا (پارین)، عضله مخاطی و لایه عضلانی اصلی بود. تجزیه و تحلیل کمی داده‌ها تغییرات معنی‌دار و دوز وابسته‌ای را در پاسخ به تزریق دی‌لیمونن نشان داد (جدول ۳). ضخامت اپیتلیوم پیش‌معده تنها در گروه DL2 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P= ۰/۰۳۵۹) ضخامت لایه عضلانی نیز تحت تأثیر دی‌لیمونن قرار گرفت و کمترین مقدار آن در گروه DL2 مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با همه گروه‌های دیگر داشت (P <۰/۰۰۰۱). در مقابل، قطر غدد پیش‌معده در هر دو گروه DL1و DL2 به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین مقدار مربوط به این دو گروه بود (P < ۰/۰۰۰۹).

جدول ۳- اثر تزریق درون تخم‌مرغی دی- لیمونن بر بافت پیش‌معده جنین
Table 3. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the proventriculus tissue of embryos

Proventriculus Gland Diameter (µm) قطر غدد پیش‌معده (میکرومتر)	Proventriculus Muscular Layer Thickness (µm) ضخامت لایه عضلانی پیش‌معده (میکرومتر)	Proventriculus Epithelium Thickness (µm) ضخامت اپیتلیوم پیش‌معده (میکرومتر)	Treatment تیمار
92.3 ± 8.14[b]	592.8 ± 8.17[a]	23.3 ± 1.75[a]	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
87.5 ± 8.14[b]	121.5 ± 8.17[b]	21.0 ± 1.75[a]	Sterile Distilled Water Injection کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
107.2 ± 8.14[a]	540.0 ± 8.17[b]	21.0 ± 1.75[a]	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
107.0 ± 8.14[a]	480.3 ± 8.17[c]	18.7 ± 1.75[b]	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
0.0009	0.0001	0.0359	P-Value

a-c مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P > 0.05$).
a-c Means with different superscripts within a column are different significantly ($P > 0.05$).

تأثیر تیمارهای مختلف بر ساختار بافت سنگدان

سنگدان به‌عنوان بخش عضلانی معده، دارای اپیتلیوم مکعبی ساده، غدد لوله‌ای عمیق و یک لایه عضلانی بسیار ضخیم و پیچیده است. نتایج هیستومورفومتری (جدول ۴) نشان دادند که تزریق دی- لیمونن تاثیر متفاوتی بر صفات مختلف سنگدان داشت. ضخامت اپیتلیوم و قطر غدد مخاطی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند. با این‌حال، عمق غدد مخاطی در گروه DL2 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه DL1 بود (P = ۰/۰۴۷۸). جالب توجه این که ضخامت لایه عضلانی سنگدان در گروه DL1 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۲ (تزریق آب مقطر) بود و با گروه کنترل ۱ و DL2 تفاوت معنی‌داری نداشت (P < ۰/۰۰۷). همچنین، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل ۱، کنترل ۲ و DL2 دیده نشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

جدول ۴- اثر تزریق درون تخم‌مرغی دی- لیمونن بر بافت سنگدان جنین
Table 4. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the gizzard tissue of embryos

Muscular Layer Thickness (µm) ضخامت لایه عضلانی سنگدان (میکرومتر)	Mucosal Gland Diameter (µm) قطر غدد مخاطی سنگدان (میکرومتر)	Mucosal Gland Depth (µm) عمق غدد مخاطی سنگدان (میکرومتر)	Gizzard Epithelium Thickness (µm) ضخامت اپیتلیوم سنگدان (میکرومتر)	Treatment تیمار
674.5 ± 38.5[ab]	21.5 ± 4.4	148.6 ± 22.1[ab]	5.1 ± 1.2	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
586.2 ± 38.5[b]	17.2 ± 4.4	121.3 ± 22.1[ab]	4.6 ± 1.2	Sterile Distilled Water Injection کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
750.1 ± 38.5[a]	23.8 ± 4.4	108.9 ± 22.1[b]	5.8 ± 1.2	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
694.4 ± 38.5[ab]	21.8 ± 4.4	155.5 ± 22.1[a]	5.7 ± 1.2	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
0.0007	0.2510	0.0478	0.5267	P Value

a-c مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P > 0.05$).
a-c Means with different superscripts within a column are different significantly ($P > 0.05$)..

تأثیر تیمارهای مختلف بر ساختار بافت روده کوچک (ژژنوم)

مقاطع بافتی ژژنوم، ساختار طبیعی پرزها و کریپت‌ها را با اپیتلیوم استوانه‌ای ساده نشان دادند. تزریق دی‌لیمونن اثرات مثبت و معنی‌داری بر شاخص‌های سلامت و عملکرد روده داشت (جدول ۵). ضخامت اپیتلیوم پوشاننده پرزها در گروه‌های DL1 و DL2 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۲ (آب مقطر) بود ($P =$ ۰/۰۳۷۳). ارتفاع پرزها، که یک شاخص بسیار مهم برای سطح جذب است، در گروه‌های دریافت کننده دی- لیمونن به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین ارتفاع در گروه DL1 مشاهده شد ($P =$ ۰/۰۰۲۸) اگرچه ضخامت خود پرزها و همچنین عمق و قطر کریپت‌ها تغییرات معنی‌داری را نشان ندادند، اما ضخامت لایه عضلانی (موسکولاریس) ژژنوم در گروه DL1 به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۱ و گروه کنترل ۲ بود ($P =$ ۰/۰۳۳).

جدول ۵- اثر تزریق درون تخم مرغی دی- لیمونن بر بافت روده جنین
Table 5. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the intestine tissue of embryos

Muscular Layer Thickness (µm) ضخامت لایه عضلانی روده (میکرومتر)	Crypt Diameter (µm) قطر کریپت روده (میکرومتر)	Crypt Depth (µm) عمق کریپت روده (میکرومتر)	Villus Thickness (µm) ضخامت پرز روده (میکرومتر)	Villus Height (µm) ارتفاع پرز روده (میکرومتر)	Intestinal Epithelium Thickness (µm) ضخامت اپیتلیوم روده (میکرومتر)	Treatment تیمار
118.4 ± 10.5[b]	49.4 ± 5.8	153.9 ± 15.6	49.0 ± 5.1	542.4 ± 45.7[b]	10.4 ± 0.97[ab]	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
115.9 ± 10.5[b]	51.4 ± 5.8	162.2 ± 15.6	45.6 ± 5.1	524.9 ± 45.7[b]	9.8 ± 0.97[b]	Sterile Distilled Water Injection کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
134.1 ± 10.[5a]	55.3 ± 5.8	152.8 ± 15.6	50.7 ± 5.1	606.0 ± 45.7[a]	11.3 ± 0.97[a]	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
127.3 ± 10.5[ab]	52.1 ± 5.8	144.8 ± 15.6	50.9 ± 5.1	598.8 ± 45.7[a]	11.2 ± 0.97[a]	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
0.0330	0.4582	0.4781	0.4938	0.0028	0.0373	P Value

a-c مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P > 0.05$).
a-c Means with different superscripts within a column are significantly different ($P < 0.05$).

تأثیر تیمارهای مختلف بر ساختار بافت کبد

پارانشیم کبد در گروه کنترل ۱، ساختار طبیعی لبول‌ها را با هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها و ورید مرکزی نشان داد. بررسی هیستومورفومتریک (جدول ۶) تغییرات چشمگیری را در پاسخ به تزریق دی‌لیمونن آشکار کرد. قطر هپاتوسیت‌ها در گروه DL1 و DL2 به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۱ و گروه کنترل ۲ بود ($P>$۰/۰۰۰۱). قطر هسته هپاتوسیت‌ها نیز در این گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت و تفاوت گروه DL2 و گروه‌های بدون تزریق دی‌لیمونن معنی‌دار بود ($P <$ ۰/۰۰۰۱). در مقابل، قطر سینوزوئیدهای کبدی در گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر از تمام گروه‌های تیمارشده بود ($P =$ ۰/۰۰۴۲). این الگوی تغییرات، نشان دهنده افزایش اندازه سلول‌های کبدی و فشردگی نسبی فضای عروقی در پاسخ به دی‌لیمونن است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

جدول ۶- اثر تزریق درون تخم‌مرغی دی- لیمونن بر بافت کبد جنین

Table 6. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the liver tissue of embryos

Sinusoid Diameter (µm) قطر سینوزوئید (میکرومتر)	Hepatocyte Diameter (µm) قطر هپاتوسیت (میکرومتر)	Hepatocyte Nuclear Diameter (µm) قطر هسته هپاتوسیت (میکرومتر)	Treatment تیمار
29.63 ± 4.09[a]	8.25 ± 0.69[b]	3.49 ± 0.21[b]	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
9.86 ± 4.09[b]	7.65 ± 0.69[b]	3.33 ± 0.21[b]	Sterile Distilled Water Injection کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
14.75 ± 4.09[b]	10.41 ± 0.69[a]	4.33 ± 0.21[ab]	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
17.29 ± 4.09[b]	10.57 ± 0.69[a]	5.10 ± 0.21[a]	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
0.0042	0.0001	0.0001	P Value

a-c مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P > 0.05$).

a-c Means with different superscripts within a column are significantly different ($P < 0.05$).

تأثیر تیمارهای مختلف بر ساختار اندام‌های ایمنی

بورس فابریسیوسک: بررسی مقاطع این اندام، پرزهای پوشیده از اپیتلیوم و گره‌های لنفاوی در لایه پروپریا را نشان داد. قطر گره‌های لنفاوی در گروه DL2 به‌طور معنی‌داری بزرگ‌تر از سایر گروه‌ها بود ($P =$ ۰/۰۰۵). ضخامت اپیتلیوم پوشاننده تغییر معنی‌داری نداشت (جدول ۶).

طحال: پارانشیم طحال شامل پولپ سفید (بافت لنفاوی) و پولپ قرمز بود. قطر پولپ سفید، که نشان دهنده مناطق لنفوسیت‌سازی است، در گروه DL2 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۲ بود ($P <$ ۰/۰۰۰۱). در مقابل، قطر پولپ قرمز تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت (جدول ۶).

تیموس: ساختار لبولی تیموس با قشر (کورتکس) تیره و مرکز (مدولا) روشن در تمام گروه‌ها مشاهده شد. هیستومورفومتری نشان داد که ضخامت مرکز لبول‌های تیموسی در گروه‌های DL1 و DL2 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ۱ بود و بیشترین ضخامت در گروه DL2 ثبت شد ($P <$ ۰/۰۰۰۱). ضخامت قشر نیز در گروه DL2 افزایش معنی‌دار داشت (جدول ۶).

جدول ۷- اثر تزریق درون تخم‌مرغی دی- لیمونن بر بافت‌های سیستم ایمنی جنین

Table 6. The effect of *in ovo* injection of d-limonene on the immune system tissues of embryos

Thymic Lobule Medulla Thickness (µm) ضخامت مرکز لبول تیموسی (میکرومتر)	Thymic Lobule Cortex Thickness (µm) ضخامت قشر لبول تیموسی (میکرومتر)	Spleen White Pulp Diameter (µm) قطر پولپ سفید طحال (میکرومتر)	Spleen Red Pulp Diameter (µm) قطر پولپ قرمز طحال (میکرومتر)	Bursa of Fabricius Lymphoid Nodule Diameter (µm) قطر گره‌های لنفاوی بورس فابریسیوس (میکرومتر)	Bursa of Fabricius Epithelium Thickness (µm) ضخامت اپیتلیوم بورس فابریسیوس (میکرومتر)	Treatment تیمار
260.2 ± 21.2[c]	185.2 ± 21.5[b]	136.8 ± 19.5[ab]	137.4 ± 6.26	238.8 ± 40.4[b]	40.9 ± 3.8	Control (No Injection) کنترل ۱ (بدون تزریق)
278.5 ± 21.2[bc]	196.1 ± 21.5[b]	109.4 ± 19.5[b]	101.9 ± 6.26	203.3 ± 40.4[b]	31.8 ± 3.8	Sterile Distilled Water Injection تزریق آب مقط کنترل ۲ (تزریق آب مقطر)
370.9 ± 21.2[ab]	182.4 ± 21.5[b]	149.9 ± 19.5[ab]	133.4 ± 6.26	233.8 ± 40.4[b]	39.1 ± 3.8	0.1 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۱ میلی‌لیتر دی‌لیمونن
428.9 ± 24.4[a]	248.1 ± 24.8[a]	221.7 ± 22.5[a]	86.2 ± 30.8	472.5 ± 46.7[a]	34.1 ± 4.4	0.2 ml D-limonene Injection تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر دی- لیمونن
0.0001	0.0001	0.0001	0.538	0.005	0.36	*P* Value

a-c مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P > 0.05$).

a-c Means with different superscripts within a column are significantly different ($P < 0.05$).

یافته‌های این پژوهش به‌وضوح نشان می‌دهند که تزریق درون تخم‌مرغی دی‌لیمونن در روز پنجم جوجه‌کشی قادر است تا تغییرات ساختاری عمیق و دوز وابسته‌ای را در بافت‌های گوارشی و ایمنی جنین جوجه گوشتی تا روز هجدهم ایجاد کند. این تغییرات را می‌توان از طریق چندین مکانیسم بیولوژیک به هم مرتبط که برای دی‌لیمونن شناخته شده است، تبیین نمود.

مکانیسم مهار آنزیم آروماتاز و تعدیل هورمونی یکی از برجسته‌ترین تئوری‌ها برای توضیح نتایج نقش دی- لیمونن به‌عنوان یک مهار کننده آنزیم آروماتاز (CYP19A1) است (Miller *et al*., 2011; Crowell, 1999)). این آنزیم، کلید تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها است. با مهار این آنزیم، غلظت استروژن موضعی در بافت‌ها کاهش می‌یابد. استروژن اثر شناخته‌شده‌ای در مهار رشد برخی بافت‌های عضلانی صاف دارد (Britt *et al*., 2012). بنا بر این، کاهش ضخامت لایه عضلانی در مری و پیش‌معده در گروه DL2 را می‌توان به کاهش غلظت استروژن و در نتیجه، کاهش محرک‌های رشدی وابسته به استروژن برای این بافت‌ها نسبت داد. از طرف دیگر، استروژن دارای اثرات سرکوب‌گر بر سیستم ایمنی است (Tingaud-Sequeira *et al*., 2004).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

کاهش غلظت استروژن ناشی از دی- لیمونن می‌تواند این سرکوب را بردارد و منجر به رشد و توسعه قوی‌تر اندام‌های لنفاوی اولیه مانند تیموس، بورس فابرسیوس و پولپ سفید طحال، به ویژه در دوز بالاتر (DL2) شود. این یافته با مطالعاتی که گزارش کرده‌اند مهار آروماتاز باعث تقویت سیستم ایمنی در مدل‌های حیوانی شده است، هم‌خوانی دارد (Young *et al*., 2022).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت از سلول‌های دوره جنینی، دوره‌ای با متابولیسم بالا و تولید قابل توجه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که می‌تواند به سلول‌ها آسیب برساند. دی- لیمونن به‌دلیل ساختار شیمیایی خود، یک آنتی‌اکسیدان قوی محسوب می‌شود (Sun, 2007). اثر آنتی‌اکسیدانی آن می‌تواند از سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو محافظت و محیط بهینه‌ای برای رشد و تمایز فراهم کند. این مکانیسم می‌تواند توضیح‌دهنده افزایش ضخامت لایه عضلانی در سنگدان و روده در گروه DL1، و همچنین افزایش قطر هپاتوسیت‌ها در کبد باشد. به‌نظر می‌رسد که دی- لیمونن در اندام‌های با نقش مکانیکی (سنگدان، روده) از طریق اثر آنتی‌اکسیدانی موجب افزایش ضخامت عضله می‌شود، اما در اندام‌های ترشحی/انتقالی (مری، پیش‌معده) با مهار مسیرهای آروماتازی و کاهش سیگنال‌های استروژنی، باعث کاهش ضخامت عضله می‌گردد. این تضاد نشان دهنده چندوجهی بودن اثرات دی- لیمونن در بافت‌های مختلف است (Chen *et al*., 2024).

محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو ممکن است به سلول‌های عضلانی و کبدی اجازه داده باشد تا رشد و هایپرتروفی بهتری داشته باشند. همچنین، افزایش ارتفاع پرزهای روده که یک شاخص کلیدی برای بهبود ظرفیت جذب مواد مغذی است، می‌تواند ناشی از کاهش آسیب اکسیداتیو به سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز در ناحیه کریپت باشد که مسئول بازسازی مداوم اپیتلیوم روده هستند (Santiago *et al*., 2012).

مکانیسم اصلی شامل کاهش رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بهبود متابولیسم انرژی است، که همگی شرایط لازم برای رشد سلولی سالم را فراهم می‌کنند.

تأثیر بر سلامت مخاط و عملکرد ترشحی افزایش معنی‌دار قطر غدد در مری و پیش‌معده و عمق غدد در سنگدان در گروه‌های دریافت‌کننده دی- لیمونن، نشان دهنده یک پاسخ تطبیقی یا تحریکی این بافت‌های ترشحی است. این پدیده می‌تواند چندین علت داشته باشد. اولاً، دی- لیمونن ممکن است به‌طور مستقیم سلول‌های ترشحی را تحریک کند. ثانیاً، کاهش غلظت استروژن (در نتیجه مهار آروماتاز) ممکن است به‌عنوان یک سیگنال برای افزایش جبرانی فعالیت ترشحی عمل کند تا کمبود اثرات محافظتی استروژن بر مخاط جبران شود. ثالثاً، خواص ضد میکروبی دی- لیمونن (Fisher & Phillips, 2006) ممکن است با کنترل جمعیت میکروبی، بار التهابی را کاهش و منابع انرژی سلول را به‌سمت رشد و تمایز (به‌جای مقابله با التهاب) سوق دهد. افزایش اندازه غدد ترشحی معمولاً با تولید بیشتر موکوس و آنزیم‌های گوارشی همراه است که می‌تواند منجر به بهبود هضم و حفاظت از مخاط دستگاه گوارش در دوره پس از تولد شود.

مشاهده اثرات وابستگی اثرات به دوز یک یافته مهم در این مطالعه است. به‌نظر می‌رسد که دوز پایین دی- لیمونن (۰/۱ میلی‌لیتر) بیشترین اثرات مثبت را بر تقویت ساختارهای عضلانی (روده و سنگدان) داشت. در حالی‌که دوز بالاتر (۰/۲ میلی‌لیتر) بیشتر بر تحریک رشد غدد ترشحی و توسعه اندام‌های ایمنی متمرکز بود. این پدیده در فارماکولوژی رایج است و نشان می‌دهد که ممکن است مسیرهای سیگنالینگ سلولی مختلفی در سطوح مختلف غلظت یک ترکیب فعال شوند. احتمالاً دوز پایین، مسیرهای مرتبط با رشد و محافظت آنتی‌اکسیدانی را بهینه می‌کند، در حالی‌که دوز بالاتر، مسیرهای قوی‌تر مرتبط با تعدیل هورمونی و ایمنی را فعال می‌سازد. با این‌حال، کاهش رشد عضلانی در مری و پیش‌معده در دوز بالا نیز نشان می‌دهد که برای دستیابی به حداکثر اثرات مفید و جلوگیری از اثرات نامطلوب، تعیین دوز بهینه از اهمیت بالایی برخوردار است.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر به‌طور قانع کننده‌ای نشان می‌دهد که تزریق درون تخم‌مرغی دی- لیمونن یک راهبرد مؤثر و امیدوار کننده برای تعدیل رشد و توسعه بافت‌های گوارشی و ایمنی در مرحله جنینی جوجه گوشتی است. اثرات مشاهده شده که عمدتاً وابسته به دوز بودند، از طریق مکانیسم‌های به هم پیوسته مهار آنزیم آروماتاز (و در نتیجه تعدیل غلظت استروژن)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی و محافظت در برابر تنش اکسیداتیو، و احتمالاً تعدیل محیط میکروبی و ایمنی اعمال می‌شوند.

به‌طور خلاصه، دوز پایین دی-لیمونن (۰/۱ میلی‌لیتر) بیشتر برای تقویت ساختارهای عضلانی دستگاه گوارش (مانند روده و سنگدان) و بهبود پتانسیل جذبی روده (از طریق افزایش ارتفاع پرز) سودمند به‌نظر می‌رسد. در مقابل، دوز بالاتر (۰/۲ میلی‌لیتر) پتانسیل بیشتری در تقویت قابلیت‌های ترشحی معده (پیش‌معده و سنگدان) و به‌ویژه، تقویت و توسعه سیستم ایمنی اولیه (تیموس، بورس، طحال) دارد.

این یافته‌ها پایه علمی محکمی را برای در نظر گرفتن دی- لیمونن به‌عنوان یک افزودنی طبیعی و ایمن در برنامه‌های پرورش طیور، به‌ویژه از طریق روش نوین تزریق درون تخم‌مرغی، فراهم می‌کنند. با این وجود، برای ترجمه این یافته‌ها به کاربرد عملی در سطح صنعت، انجام مطالعات بعدی برای ارزیابی تأثیرات این مداخله بر عملکرد رشد، ضریب تبدیل غذایی، سلامت عمومی و پاسخ به چالش‌های ایمنی در دوره پس از تولد (پرورش) جوجه‌ها ضروری است. همچنین، مطالعات مکانیستیک برای درک دقیق‌تر نحوه تعامل دی- لیمونن با مسیرهای سیگنالینگ سلولی در بافت‌های مختلف پیشنهاد می‌گردد

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]
[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

References

Brenes, A., & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1-2), 1-14. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007

Britt, K. L., Drummond, A. E., Cox, V. A., & Dyson, M. (2012). Estrogen and the mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 17(2), 113-127. 10.1007/s10911-012-9252-6

Chen, X., Ding, Y., Guan, H., Liu, J., Li, Z., & Lin, H. (2024). Pharmacological effects and potential applications of limonene from citrus plants: A review. *Natural Product Communications,* 19(5), 1–12. https://doi.org/10.1177/1934578X2412542

Crowell, P. L. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition*, 129(3), 775S-778S. https://doi.org/10.1093/jn/129.3.775S

Devine, P.J., Perreault, S.D., & Luderer, U. (2012). Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biology of Reproduction*. 86 (2):27. doi: 10.1095/biolreprod.111.095224

Etches, R. J. (1996). Reproduction in poultry. CAB International

Fennell, M. J., Scanes, C. G., & Buonomo, F. C. (1996). Inhibition of estrogen biosynthesis modifies posthatch growth and carcass composition in broilers. *Domestic Animal Endocrinology*, 13(6), 425-433. https://doi.org/10.1016/S0739-7240(96)00067-7

Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232-1240. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x

Fisher, K., & Phillips, C. A. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156-164. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006

Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S. T., & Lillehoj, H. S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 26-45. https://doi.org/10.1017/S1466252316000207

Hess, R. A., & França, L. R. (2008). Spermatogenesis and the cycle of the seminiferous epithelium. In *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 636(1–15). Springer.

Jamshab, A., & Mottaghitalab, M. (2019). The Effect of in-ovo injection of tomato extract on sex differentiation and gonadal structure of broiler chicks and their performance. *Research on Animal Production*, 10(25), 86-95. https://doi.org/10.29252/rap.10.25.86.

Johnson, A. L. (2015). Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation. *Poultry Science,* 94(4), 781–785

Kalantari-Hesari, A., Morovvati, H., Babaei, M., Nourian, A., Esfandiari, K., Elmi, T., & Soltani, S. (2022). Modified methods to simplification histochemical, immunohistochemical, and hematoxylin-eosin staining. *Iranian Veterinary Journal*, 18(3), 61-73.

Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2021). The use of in ovo techniques in commercial poultry production: A review. *World's Poultry Science Journal*, 77(3), 663-672. https://doi.org/10.1080/00439339.2021.1926913

Miller, J. A., Thompson, P. A., Hakim, I. A., & Chow, H. H. S. (2011). d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews*, 5(2), 31-42. https://doi.org/10.1007/s12156-010-0066-8

Miller, W. R., & Larionov, A. A. (2012). Understanding the mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Breast Cancer Research*, 14(1), 201. https://doi.org/10.1186/bcr2932

Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: Current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 245-256. https://doi.org/10.1017/S0043933917000071

Santiago, J. V. A., Jayachitra, J., Shenbagam, M., & Nalini, N. (2012). Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress–induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. *European Journal of Nutrition,* 51(1), 57–68. https://doi.org/10.1007/s00394-011-0182-7

Sharpe, R.M. (1994) Regulation of Espermatogenesis. In: Knobil, E. and Neill, J.D., Eds., The Phisiology of Reproduction, Vol. 1, 2nd Edition, Raven Press, New York, 1364-1434.

Singh, R., Yadav, S. K., & Kapoor, N. (2023). Analysis of application of digital image analysis in histopathology quality control. *Journal of Pathology Informatics*, 14, 100322. https://doi.org/10.1016/j.jpi.2023.100322

Smith, C., Roeszler, K., Ohnesorg, T., Dummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., & Sinclair A.H. (2009). The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461, 267–271. https://doi.org/10.1038/nature08298

Sun, J. (2007). D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3), 259-264.

Surai, P. F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]

Tingaud-Sequeira, A., Chauvigné, F., Lozano, J., & Cerdà, J. (2004). Estrogen regulation of gene expression in liver and testis during zebrafish development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 222(1-2), 73-85. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.04.015

Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., and Kedar, O. (2005). In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84(5), 764-770. https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764

Young, N.A., Hampton, J., Sharma, J., Jablonski, K., DeVries, C., Bratasz, A., Wu, L.C,, Lustberg, M., Reinbolt, R., Jarjour, W.N. (2022). Aromatase-Inhibitor-Induced Musculoskeletal Inflammation Is Observed Independent of Oophorectomy in a Novel Mouse Model. *Pharmaceuticals*, 15(12),1578. https://doi.org/10.3390/ph15121578

Yu, X., Lin, H., Wang, Y., Lv, W., and Zhang, S. (2010). Anti-inflammatory effects of d-limonene in mice. *Journal of Food Science*, 75(6), H292-H297. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01804.x

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-22]

[DOI: DOI: 10.61882/rap.2026.1579]