

تأثیر سن، جنس و کشتار بر توزیع سلولی مایعات لاواژ شده برونکوالوئولار در گوساله و گاو

زهره افتخاری^۱ محمد رضا مخیر دزفولی^{۱*} راضیه طغرلی^۲ سید مهدی نصیری^۳ علی رضا باهنر^۴ حمید توانایی منش^۱

۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۲) دانش آموزته دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۳) بخش کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

۴) گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۳۱ فروردین ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱۱ تیر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: بر اساس اطلاعات تاکنون مطالعه‌ای در مورد یافتن تأثیر سن، جنس، نوع لوب ریه و استرس ناشی از کشتار بر سلول‌های دفاعی ریه در کشتور انجام نشده است. **هدف:** هدف از این مطالعه یافتن تأثیر سن و جنس دام، نوع لوب ریه و همچنین استرس ناشی از ذبح بر الگوی پراکنش سلول‌های التهابی در مایع برونکوالوئولار گوساله و گاو بود. **روش کار:** ۱۲ رأس گوساله هشتتاین و دودرگ در سه رده‌ی سنی انتخاب شدند. در دام زنده ۲۵۰mL نرمال سالین از طریق لوله نایبی کاتتر لاواژ به آرامی وارد ریه‌ها گردید و متعاقباً لاواژ با کمک فشار سرنگ صورت گرفت. ۱۲ عدد ریه راست و ریه چپ سالم دام ذبح شده نیز انتخاب و ۱۵۰mL محلول نرمال سالین از طریق کاتتر وارد ریه‌ها و متعاقباً لاواژ با کمک فشار سرنگ صورت گرفت. مایعات وارد لوله‌های فالکون گردیده و بعد از سانتر یو فوژ، از رسوبات گسترش لامی تهیه و به روش گیمسارنگ آمیزی شدند. آنالیز یافته‌ها با T-Test، آنووا و آزمون تعقیبی توکی انجام شد. از ضریب همبستگی اسپیرمن برای بررسی بین سن و سلول‌ها استفاده شد. **نتایج:** متغیرهای سلول‌های اپیتلیال، ماکروفاژ و ماست سل به ترتیب با ضریب همبستگی -0.43^* ، -0.59^* و -0.26^* با وجود معنی دار نبودن، همبستگی منفی را با سن نشان دادند. درصد سلول‌های ماست سل در جنس نر نسبت به جنس ماده بیشتر بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی دار بود. درصد سلول‌های اپیتلیال در ریه دام ذبح شده به طور معنی داری در مقایسه با ریه لاواژ شده دام زنده تغییر کرده بود و درصد ماکروفاژ مایعات لاواژ شده ریه دام زنده در مقایسه با ریه دام ذبح شده به طور معنی داری افزایش یافته بود. تفاوت معنی داری از نظر تراکم سلولی در سنین مختلف و دو جنس مشاهده نشد اما تراکم سلولی مایعات لاواژ شده در دام زنده به طور معنی داری بیشتر از ریه ذبح شده بود. **نتیجه گیری نهایی:** به نظر می‌رسد سن گوساله و نوع لوب ریه تأثیر چندانی بر روی الگوی سلول‌های دفاعی ریه ندارد اما جنس و استرس کشتار می‌تواند سبب تغییر در نوع سلول‌های دفاعی و تراکم سلولی و بروز بیشتر بیماری‌های تنفسی شود.

واژه‌های کلیدی: سن، گوساله، لاواژ ریه، جنس، استرس

مطالعات مختلف بیانگر این است که ماکروفاژهای آلوئولی نقش اصلی را در دفاع مجاری تنفسی و بافت ریه ایفا می‌کنند (۲۲) و نسبت ماکروفاژ به لنفوسیت و یا سایر سلول‌ها در جریان دفاع تنفسی تغییر می‌کند (۲۸). در سگ، جوندگان آزمایشگاهی و انسان ماکروفاژهای کبدی و طحال، مسئول اصلی حذف باکتری‌ها یا دیگر ذرات مضر در گردش خون هستند. در حالی که حذف باکتری‌ها و ذرات بیماری‌زا از خون نشخوارکنندگان، گربه و خوک عمدتاً توسط ماکروفاژهای درون عروقی ریه انجام می‌گیرد (۲۰). سر منشأ ماکروفاژهای آلوئول‌های ریه، منوسیت‌های خون می‌باشند که این منوسیت‌های تغییر شکل یافته به ماکروفاژ، به ندرت در خون محیطی دیده می‌شوند (۱۰).

یکی از روش‌های مهم تشخیص بیماری‌های ریوی و بررسی اثرات عوامل خارجی بر روی دفاع سلولی ریه، بررسی سلولی مایعات لاواژ برونکوالوئولار می‌باشد (۳۲). لاواژ ریه روش ارزان تر و قابل دسترس‌تر در مقایسه با روش‌های روتین دیگر شناسایی بیماری‌های ریوی مانند رادیولوژی و برونکوسکپی در دامپزشکی می‌باشد. تشخیص قطعی بیماری‌های ریوی مستلزم شناخت مناسب از شرایط فیزیولوژیک و سیتولوژیک مایعات لاواژ شده ریه سالم است اما درصدهای متفاوتی از

مقدمه

دستگاه تنفسی به ۳ بخش هدایتی (Conductive) انتقالی (Transitional) و تبادلات گازی (Gas exchange) تقسیم می‌گردد. سیستم تبدالی (حبابچه‌ها) فاقد سلول‌های مژه دار و تولیدکننده موکوس بوده و اصلی ترین مکانیسم دفاعی آن بیگانه‌خواری است که توسط ماکروفاژهای حبابچه‌ای - ریوی انجام می‌گیرد (۱،۲). این سلول‌ها مشتق از منوسیت‌های خون و به مقدار کمتر مشتق از ماکروفاژهای بافت بینابینی ریه بوده که به آهستگی تقسیم می‌شوند که نقش مهمی در افزایش ماکروفاژها جهت حفاظت ریه در برابر مواد خارجی ایفا می‌کند (۲۰، ۲۴).

برخلاف ماکروفاژهای بافتی، نیمه عمر ماکروفاژهای حبابچه‌ای کوتاه بوده و پاکسازی ریوی توسط ماکروفاژهای حبابچه‌ای با یک روش بسیار هماهنگ با دیگر سلول‌ها و ترشحات قسمت‌های پائین ریه انجام می‌گیرد. این تغییرات سلولی در موقع دفاع پیچیده بوده و سلول‌های بسیاری مانند ماکروفاژهای حبابچه‌ای، منوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها، سلول‌های دندریتیک و سورفاکتانت در آن دخیل می‌باشد (۵، ۱۶).



نمونه‌های اخذ شده در دستگاه سانتریفیوژ (Sigma 3-10) با دور ۴۵۰g به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند سپس مایعات رویی وارد لوله‌های دیگری گردیده و از رسوبات ته لوله لام تهیه شد. بعد از خشک شدن در معرض هوا، لام با کمک متانول ۷۰٪ به مدت ۳-۱ دقیقه تثبیت شده و پس از خشک شدن در رنگ گیمسا یک به پنج به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه قرار داده شد. شمارش سلولی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری انجام شد.

در دام کشتارگاهی نیز پس از مراجعه به کشتارگاه احسان ری ابتدا سلامت دام قبل از کشتار و نمونه‌گیری مورد تأیید دامپزشک کشتارگاه قرار گرفت سپس ۱۲ عدد ریه سالم (۱۲ عدد ریه چپ و ۱۲ عدد ریه راست) انتخاب شد. فاصله کشتار تا اخذ نمونه کمتر از ۳۰ دقیقه بود پس از شست و شوی سطحی ریه، کاتتر را از طریق محل دو شاخه شدن نای وارد برونش و برونشبول‌های انتهایی کرده و ۱۵۰mL نرمال سالین راطی ۳ مرحله به طور متوالی به هر سمت ریه (ریه چپ و ریه راست هر کدام ۱۵۰mL) تجویز شده و متعاقباً لاواژ توسط فشار منفی ایجاد شده به وسیله سرنگ صورت گرفت. سپس همانند نمونه‌های دام‌های زنده، نمونه‌های اخذ شده را سانتریفیوژ کرده و از رسوبات گسترش تهیه شد.

اطلاعات به دست آمده در جداول نرم افزار Excel وارد گردیده و از نرم افزار SPSS و روش آماری Independent Samples T-Test برای مقایسه دو گروه نرو و ماده و دو لوب ریه و گروه زنده و کشته استفاده گردید. از روش One Way ANOVA جهت مقایسه سه رده سنی در دام زنده و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. از ضریب همبستگی اسپیرمن برای بررسی بین سن و سلول‌ها استفاده شد. در همه آزمون‌های آماری انجام گرفته، ارزش p-value، کمتر از ۰/۰۵ معنی دارد در نظر گرفته شد.

نتایج

گوساله‌های زنده در سه رده سنی زیر دو ماه، ۴-۲ ماه و ۶-۴ ماه قرار داشتند. میانگین وزن گوساله‌های زیر دو ماه $32 \pm 3 / 45$ Kg، گوساله‌های ۴-۲ ماه $56 \pm 5 / 2$ Kg و گوساله‌های ۶-۴ ماه $78 \pm 3 / 8$ Kg بود. در معاینه بالینی قبل از آزمایش، صداهای ریوی در سمع و دقه کردن در محل توپوگرافی ریه‌ها عادی بودند و میانگین تعداد تنفس $33 / 42 \pm 5 / 6$ عدد در دقیقه، میانگین تعداد ضربان قلب $101 / 08 \pm 16 / 5$ و میانگین دمای مقعدی $38 / 91 \pm 0 / 46$ °C بود (جدول ۱). نتایج آزمایشات هماتولوژی دام‌های زنده قبل از انجام تکنیک BAL بیان گر سالم بودن گوساله‌ها بود (جدول ۲، ۳). میزان مایعات تجویز شده در هر دام به صورت برونکوالوژنولار حدود ۱۵۰-۲۵۰mL بود و میزان مایعات لاواژ شده حدود ۸۰-۶۰mL بود.

نتایج تراکم سلولی مایعات لاواژ شده توسط دستگاه Auto cell counter به صورت تعداد سلول در هر میکرولیتر (cell/microliter) در جدول ۳ بیان شده است.

متغیرهای سلول‌های اپیتلیال، ماکروفاژ و ماست سل به ترتیب با

سلول‌های دفاعی ریه در دام‌های مختلف ذکر شده است. در حالت طبیعی مایعات لاواژ شده ریه شامل سلول‌های پوششی، سلول‌های اگزودایی (نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، ماکروفاژها) و نیز ماست سل‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های پلاسمایی می‌باشند (۴، ۱۵). در گاو و گوساله ۹۰-۶۰٪ سلول‌های ریوی ماکروفاژ بوده و بقیه شامل نوتروفیل، لنفوسیت و سلول‌های اپیتلیال می‌باشند (۱۹). تاکنون مطالعه‌ای در مورد درصد سلول‌های دفاعی ریه در سنین مختلف در گوساله‌ها، در دو جنس نرو و ماده، و ریه لاواژ شده پس از ذبح جهت بررسی اثر استرس کشتار و زمان کشتار تا اخذ نمونه در کشور انجام نشده است.

هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر سن، جنس، نوع لوب ریه و استرس کشتار بر الگوی سلول‌های سیستم دفاعی مایعات به دست آمده از شست و شوی برونکوالوژنولار در گوساله‌های هلشتاین و دورگ و ریه گاو ن بالغ بود تا تغییرات احتمالی سلول‌های دفاعی ریه در شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک بررسی شود.

مواد و روش کار

تعداد ۱۲ رأس گوساله هلشتاین و دورگ در سه رده سنی زیر دو ماه، ۴-۲ ماه و ۶-۴ ماه انتخاب و مشخصات دام‌ها از نظر سن، جنس، وزن و وضعیت تولد در پرونده ثبت شد سپس معاینات بالینی انجام گرفت و گوساله‌ها از نظر سلامت و عدم درگیری ریوی و سایر بیماری‌های عفونی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

گوساله‌ها به مدت ۱۲ ساعت در پرهیز غذایی قرار گرفته و سپس تقید شیمیایی به صورت تجویز داخل وریدی پروپوفل (پروپوفل[®]) (5 mg/Kg) و در برخی دام‌ها جهت تقید بیشتر از زایلازین ($0 / 22 \text{ mg/Kg}$) به صورت تزریق داخل عضلانی استفاده شد. جهت بررسی هماتولوژیک از هر دام ۲mL خون گرفته شد و به آزمایشگاه ارسال گردید. دام را در موقعیت جناغی قرار داده و لوله نایی را از طریق دهان وارد نای کرده و با فلکس سرفه ورود لوله نایی به داخل نای تأیید گردیده دنبال آن کاف با ورود هوا توسط سرنگ به دیواره مجرا تثبیت گردید. در ادامه کاتتر لاواژ را از طریق لوله نایی به آرامی وارد برونش‌های اصلی و برونشبول‌ها گردید سپس ۲۵۰mL نرمال سالین راطی ۵ مرحله متوالی به آرامی وارد ریه کرده و متعاقباً لاواژ توسط فشار منفی ایجاد شده به واسطه تجویز مایعات صورت گرفت. دام‌های مورد نظر پس از انجام تکنیک BAL تحت نظر قرار گرفته و اکسی‌تراسایکلین (10 mg/kg) و فلونکسین مگلو مین ($1 / 1 \text{ mg/kg}$) جهت پیشگیری از مشکلات ریوی تجویز گردید. مایعات کدر و کف آلود لاواژ شده وارد لوله‌های فالكون استریل کدگذاری گردید و در کمتر از ۲ ساعت در کنار یخ جهت انجام عملیات سانتریفیوژ به آزمایشگاه ارسال شد. از هر نمونه حدود ۲mL-۱ جهت انجام آزمایشات سلول‌شناسی توسط دستگاه (Nihon Kohden ۶۴۵۰) Auto cell counter جمع‌آوری گردید.



ضریب همبستگی $-0/430$ ، $-0/059$ و $-0/267$ با وجود معنی‌دار نبودن، همبستگی منفی را با سن نشان دادند. بیشترین میزان سلول‌های اپیتلیال در گروه سنی زیر ۲ ماه ($18/5\%$) و کمترین میزان در رده سنی ۶-۴ ماه ($11/5\%$) بود. بیشترین میزان نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها در رده سنی ۲-۴ ماه ($6/25\%$ و $19/25\%$) و کمترین میزان آن در رده سنی زیر ۲ ماه ($3/5\%$ و 11%) قرار داشت اما این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌داری نبود ($p > 0/05$). بر اساس جدول ۴، درصد ماکروفاژها در گروه سنی ۲-۴ ماه ($60/5\%$) در مقایسه با دو گروه سنی دیگر (66%) کمتر بود ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0/05$). درصد ماست سل در گروه سنی ۰ تا ۲ ماه ($1/5\%$) در مقایسه با گروه سنی ۴-۶ ماه و ۲-۴ ماه ($5/5\%$) میزان بالاتری را نشان داد که از لحاظ آماری این تفاوت معنی‌دار نبود ($p > 0/05$) (جدول ۴).

بر اساس نتایج ذکر شده در جدول ۴، در دام زنده میزان سلول‌های نوتروفیل و اپیتلیال در دام ماده (5% و 19%) نسبت به دام نر ($37/4\%$ و $12/25\%$) و تعداد سلول‌های ماکروفاژ در جنس نر (66%) نسبت به جنس ماده (60%) بیشتر بود، اما این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). درصد ماست سل‌ها در جنس نر ($12/25\%$) در مقایسه با جنس ماده (0%) تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p = 0/04$).

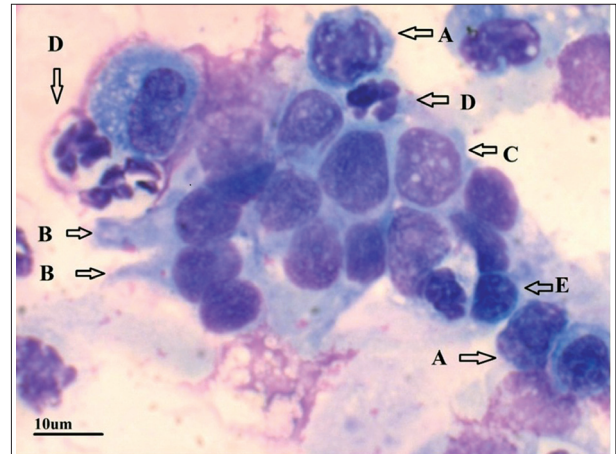
طبق نتایج ذکر شده در جدول ۵، علیرغم عدم تفاوت معنی‌داری، درصد سلول‌های دفاعی ریه در دلوپ چپ و راست ریه، میزان سلول‌های ماکروفاژ در ریه راست (48%) نسبت به ریه چپ ($40/5\%$) و تعداد سلول‌های اپیتلیال و لنفوسیت و ماست سل در ریه چپ ($13,39$) و ($75/0\%$) نسبت به ریه راست ($12,33$ و $10/41$) بیشتر بود ($p > 0/05$).

درصد سلول‌های اپیتلیال در ریه دام ذبح شده به طور معنی‌داری در مقایسه با ریه لاواژ شده دام زنده تغییر کرده بود ($p = 0/019$) همچنین بر اساس نتایج، درصد ماکروفاژ مایعات لاواژ شده ریه دام زنده در مقایسه با ریه دام ذبح شده به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p = 0/019$) (جدول ۶).

تفاوت معنی‌داری از نظر تراکم سلولی در سنین مختلف و دو جنس مشاهده نشد اما تراکم سلولی مایعات لاواژ شده در دام زنده (583 cell/microliter) به طور معنی‌داری بیشتر از ریه ذبح شده (237 cell/microliter) بود ($p = 0/03$) (جدول ۳).

بحث

لاواژ برونکوالوئولار، روشی مفید جهت ارزیابی سلامت یا بیماری ریه، روند پیشرفت و یا روند درمان بیماری بوده و نتایج مطالعات نشان می‌دهد که اصلی‌ترین راه آنالیز مایع BAL، تشخیص سلولی و شمارش تفریقی آنهاست ($8,14,17,18,26,28$). از آنجا که تشخیص قطعی بیماری‌های ریوی مستلزم شناخت دقیق از شرایط فیزیولوژیک و سیتولوژیک مایعات لاواژ شده ریه سالم است به همین دلیل بررسی میزان سلول‌های دفاعی



تصویر ۱. مایع لاواژ برونکوالوئولار (رنگ آمیزی گیمسا $\times 100$): A: ماکروفاژ، B: اپیتلیال استوانه‌ای، C: اپیتلیال مکعبی، D: نوتروفیل، E: لنفوسیت.

جدول ۱. نتایج اندازه‌گیری دما، ضربان قلب و تعداد تنفس دام‌های مورد آزمایش.

گروه	تعداد	میانگین \pm خطای معیار	اختلاف میانگین	محدوده طبیعی
دمای مقعدی ($^{\circ}\text{C}$)	۱۲	$38/91 \pm 0/46$	$-0/13$	$38/6-39/4$
تعداد تنفس (در دقیقه)	۱۲	$33/69 \pm 4/42$	$1/64$	$15-40$
تعداد ضربان قلب (در دقیقه)	۱۲	$101/50 \pm 16/08$	$4/76$	$100-120$

جدول ۲. نتایج آزمایش هماتولوژی دام‌های زنده قبل از انجام تکنیک BAL. (V) MCV = حجم متوسط سلولی (fl)، MCH = میزان هموگلوبین هر RBC (pg)، MCHC = میزان هموگلوبین مجموع RBCها (g/dL).

گروه	تعداد	میانگین \pm خطای معیار	اختلاف میانگین	محدوده طبیعی
پلاکت ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	۱۲	429 ± 110	$3/18$	$1-8$
اِنوزینوفیل ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	۷	$15 \pm 0/53$	$-0/20$	$0/5 \pm 0/2$
منوسیت ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	۱۰	$23 \pm 0/82$	$-0/26$	$0/7 \pm 0/4$
لنفوسیت ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	۱۲	$6/45 \pm 7/05$	$2/03$	$4/7 \pm 1/3$
نوتروفیل سگمانته ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	۱۲	$3/20 \pm 7/34$	$2/12$	$3/0 \pm 1/8$
گلبول‌های سفید ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	۱۲	$10/43 \pm 1/99$	$-0/57$	$8/8 \pm 2/5$
فیبرینوژن (g/L)	۱۲	$4/08 \pm 0/79$	$-0/22$	$2-7$
پروتئین تام (g/dL)	۱۲	$6/33 \pm 0/39$	$-0/11$	$3-7$
MCHC (g/dL)	۱۲	$30/62 \pm 1/13$	$-0/33$	$30-36$
MCH (pg)	۱۲	$12/42 \pm 1/05$	$-0/32$	$11-17$
MCV (fl)	۱۲	$40/67 \pm 3/14$	$-0/90$	$40-60$
گلبول قرمز ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	۱۱	$7/63 \pm 0/80$	$-0/24$	$5-10$
هموگلوبین (g/dL)	۱۲	$9/42 \pm 0/82$	$-0/24$	$8-15$
هماتوکریت (%)	۱۲	$32/07 \pm 2/50$	$-0/72$	$24-46$

جدول ۳. مقایسه تعداد سلول در هر میکرولیتر مایع لاواژ شده در دام زنده و ریه لاواژ شده (میانگین \pm خطای معیار).

موقعیت	میانگین \pm خطای معیار	تعداد
دام زنده	$282/33 \pm 511/3$	۱۲
دام نر	$252 \pm 391/8$	۸
دام ماده	$700 \pm 757/18$	۴
لوب راست ریه	$24 \pm 111/2$	۱۲
لوب چپ ریه	$235/8 \pm 121/9$	۱۲
کل دام ذبح شده	$237/9 \pm 114/1$	۲۴



بعد، کدورت بیشتری دارند و از لحاظ ارزیابی های سیتولوژیکی اعتبار بیشتری دارند (۱۹). مطالعات مشابه بر روی مایعات لاواژ شده ریه راست گوساله مبتلا به پنومونی و سالم با سنین ۷۲-۳۰ روزه بیانگر کدورت بیشتر مایعات اخذ شده در لاواژهای اول در مقایسه با لاواژ چهارم به بعد است. شمارش کل سلولی در لاواژهای ابتدایی نسبت به لاواژهای بعدی و در گروه پنومونیک در مقایسه با گروه سالم به طور معنی داری بیشتر بود (۰/۰۵ < p) (۱۹). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر در رابطه با ظاهر مایعات آسپیره شده تطابق کامل دارد، به نحوی که در مطالعه حاضر لاواژهای ابتدایی دارای کدورت و کف بیشتری نسبت به لاواژهای انتهایی بود و تراکم سلولی در لام های تهیه شده از مایعات لاواژ شده ابتدایی بیشتر از لام های تهیه شده از لاواژهای انتهایی بود.

نتایج به دست آمده در مطالعات مشابه (۱۱، ۱۲، ۲۳) و مطالعه حاضر بیانگر عدم تفاوت سیتولوژی معنی دار بین دو لوب راست و چپ است (۲۴۰) در مقایسه با ۲۳۵ cell/microliter). بر اساس اطلاعات به دست آمده متغیرهای سلول های اپیتلیال، ماکروفاژ و ماست سل با وجود معنی دار نبودن، همبستگی منفی را با سن نشان دادند.

تفاوت های گونه ای در نتایج سیتولوژیکی مایعات لاواژ شده از ریه نقش مهمی دارد چنان که مطالعات انجام شده بر روی کودکان سالم، میزان ماکروفاژ را ۸۴-۸۱٪، نوتروفیل را ۷/۰٪، لنفوسیت را ۱۶-۱۵٪ و ائوزینوفیل را ۱/۰٪ گزارش کرده اند و مطالعات انجام گرفته بر روی اسبان سالم درصد ماکروفاژ را ۵۲/۵، لنفوسیت را ۴۳، نوتروفیل را ۵/۱۱ و ماست سل را ۱/۱ ذکر کردند (۶، ۸، ۲۵) که احتمالاً به دلیل تفاوت های گونه ای میزان سلول های این مطالعه با نتایج پژوهش های فوق همخوانی ندارد.

از سویی دیگر روش های مختلف اخذ مایعات، میزان تجویز مایعات (۲۹)، نوع لوب ریه (۲۷)، سن، جنس دام و استرس (۲۱) نیز می تواند بر روی تفسیر نتایج اثر گذار باشد. به همین سبب روش های مختلفی برای لاواژ ریه در دام های مختلف (۲۹) ذکر شده است.

در مطالعه انجام گرفته توسط Sweeney و همکاران در سال ۱۹۹۲ بر روی ریه راست و چپ اسب، نتایج نشانگر بیشتر بودن درصد ماست سل ها در ریه چپ در مقایسه با ریه راست و نوتروفیل ها در ریه راست (۷-۱٪) در مقایسه با ریه چپ (۵-۱٪) بود (۲، ۲۷، ۲۸) که نتایج فوق با مطالعه حاضر مطابقت دارد چنان که میزان سلول های ماکروفاژ در ریه راست (۴۸٪) نسبت به ریه چپ (۴۰/۵٪) و تعداد سلول های اپیتلیال و لنفوسیت و ماست سل در ریه چپ (۱۳، ۳۹ و ۷۵/۰٪) نسبت به ریه راست (۱۲، ۳۳ و ۴۱٪) بیشتر بود اما از لحاظ آماری اختلاف معنی داری را نشان نداد (۰/۰۵ > p).

مطالعات بیانگر افزایش درصد ماکروفاژ، نوتروفیل و پروتئین کل مایعات لاواژ شده ریه گوساله های تحت استرس محرومیت غذایی و جابه جایی می باشد (۲۱) در حالی که در مطالعه حاضر استرس کشتار تأثیری روی محتوای سلولی مایعات لاواژ شده ریه نداشت.

جدول ۴. مقایسه نتایج شمارش سلولی بر اساس سن و جنس (میانگین ± خطای معیار).

رده سنی (تعداد)	اپیتلیال میانگین ± خطای معیار	نوتروفیل میانگین ± خطای معیار	لنفوسیت میانگین ± خطای معیار	ماکروفاژ میانگین ± خطای معیار	ماست سل میانگین ± خطای معیار
۲-۴ ماه (۴ رأس)	۱۸/۵۰±۵/۵۰	۳/۵۰±۳/۴۱	۱۱±۸/۲۴	۶۶/۵۰±۱/۲۷	۱/۵۰±۱/۹۱
۴-۶ ماه (۴ رأس)	۱۳/۵۰±۱/۱۷	۶/۲۵±۵/۹۰	۱۹/۲۵±۱/۹۳	۶۰/۵۰±۱/۲۷	۰/۵۰±۱
۴-۶ ماه (۴ رأس)	۱۱/۵۰±۶/۱۹	۴±۴/۶۱	۱۸±۸/۷۹	۶۶±۱/۷۵	۰/۵۰±۱
کل (۱۲ رأس)	۱۴/۵۰±۸/۰۹	۴/۵±۴/۴۸	۱۶/۰۸±۱/۲۵	۶۶/۳۳±۱/۴۵	۰/۸۳±۱/۳۳
دام ماده (۴ رأس)	۱۹±۶/۲۱	۵±۳/۸۲	۱۶±۵/۸۸	۶۰±۱۱/۱۹	.
دام نر (۸ رأس)	۱۲/۲۵±۸/۳۱	۴/۳۷±۵/۰۱	۱۶/۱۲±۱۵/۱۹	۶۶/۵۰±۱۶/۲۴	۱/۲۵±۱/۴۸

جدول ۵. مقایسه نتایج شمارش سلولی بر اساس نوع لوب ریه (میانگین ± خطای معیار).

ناحیه	اپیتلیال میانگین ± خطای معیار	نوتروفیل میانگین ± خطای معیار	لنفوسیت میانگین ± خطای معیار	ماکروفاژ میانگین ± خطای معیار	ماست سل میانگین ± خطای معیار
لوب راست (۱۲ عدد)	۳۳/۲۵±۱۷/۹۷	۲/۵۰±۲/۵۴	۱۲/۰۸±۷/۴۵	۴۸/۰۸±۱۶/۸۱	۰/۴±۰/۷۹
لوب چپ (۱۲ عدد)	۳۹/۲۵±۱۴/۰۲	۲/۵۰±۲/۳۹	۱۳/۹۱±۱۲/۱۰	۴۰/۵۸±۱۳/۷	۰/۷۵±۱/۰۵

جدول ۶. مقایسه نتایج شمارش سلولی در دام زنده و ریه دام ذبح شده (میانگین ± خطای معیار).

گروه (تعداد)	سلول	آزمایش (میانگین ± خطای معیار)	اختلاف میانگین
زنده (۱۲)	اپیتلیال	۲/۳۳	۱۴/۵±۸/۰۹
ذبح شده (۱۲)	اپیتلیال	۴/۰۲	۳۶/۲۵±۱۳/۹
زنده (۱۲)	نوتروفیل	۱/۲۹	۴/۵۸±۴/۴۸
ذبح شده (۱۲)	نوتروفیل	۰/۵۸	۲/۵۰±۲/۰۲
زنده (۱۲)	لنفوسیت	۳/۶۱	۱۶/۰۸±۱۲/۵۰
ذبح شده (۱۲)	لنفوسیت	۲/۵۶	۱۳/۰۰±۸/۸۷
زنده (۱۲)	ماکروفاژ	۴/۲۰	۶۴/۳۳±۱۴/۵۷
ذبح شده (۱۲)	ماکروفاژ	۳/۵۶	۴۴/۴۳±۱۲/۳۴
زنده (۱۲)	ماست سل	۰/۳۸	۰/۸۳±۱/۳۳
ذبح شده (۱۲)	ماست سل	۰/۱۴	۰/۵۸±۰/۵۱

ریه در شرایط مختلف فیزیولوژیکی می تواند نقش مؤثری در شناسایی استعداد افراد یک گونه به بیماریهای تنفسی داشته باشد.

طبق بررسی های مختلف حدود ۶۰٪ سلول های مایعات لاواژ شده ریه ی گاو را ماکروفاژها تشکیل می دهند (۳۰، ۳۱) که با مطالعه حاضر (۶۴/۳۳٪) همخوانی دارد ولی در گزارش Fogarty و همکاران در سال ۱۹۸۳ میزان ماکروفاژهای آلوئولی ریه گاو ان پرواری نزدیک به ۹۰٪ گزارش شده (۱۹) که بیانگر متغیر بودن سلول های دفاعی ریه در افراد مختلف یک گونه می باشد.

در مطالعه دیگری که توسط Mokhber Dezfouli و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی گوساله های مبتلا به پنومونی و گوساله های سالم ۳ تا ۱ ماهه انجام گرفت (۲) نتایج به دست آمده در مورد میزان ماکروفاژ و نوتروفیل در گروه کنترل با مطالعه حاضر مطابقت ندارد ولی نتایج مربوط به میزان سلول اپیتلیال با مطالعه حاضر کاملاً مطابقت دارد.

ظاهر فیزیکی مایعات اخذ شده در لاواژ بستگی به میزان مایعات وارد شده، فشار منفی ایجاد شده برای لاواژ و میزان مایعات اخذ شده دارد. به طوری که مایعات اخذ شده در لاواژهای اول و دوم در مقایسه با لاواژهای



References

- Allen, J.W., Viel, L., Bateman K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E. (1992) Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. *Can J Vet Res.* 56: 122-126.
- Araghi Soure, A., Mokhber Dezfouli, M.R., Zahrayi Salehi, T., Rezakhani, A., Afshari, G.R., Nadealian, M.Gh., Bahonar, A. (2007) Bronchoalveolar lavage and bacteriological findings in calf pneumonia. *J Vet Res.* 62: 87-92.
- Attili, A.R., Carquetella, M., Pampurini, F., Laus, F. (2012) Association between enrofloxacin and N-acetylcysteine in recurrent bronchopneumopathies in dog caused by biofilm producer bacteria. *J Anim Vet Adv.* 11: 462-469.
- Atyabi, N. (2006) *Veterinary Clinical Pathology, Laboratory Methods, Compilation.* (1st ed.) University of Tehran Press. Tehran, Iran.
- Batista, C.F., Blagitz, M.G., Santos, B.P., Bertagnon, H.G., Parra, A.C., Vianna, R.S., de Lucca, G.G., Lima, D.M., Santos, D.S., Della Libera, A.M.M.P. (2010) Maturation of mononuclear phagocytes in the lungs of young calves-In vitro study. *J Dairy Sci.* 95: 5909-5915.
- Bedenice, D., Mazan, M.R., Hoffman, A.M. (2008) Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J Vet Int Med.* 22: 1022-1028.
- Bredow, C.V., Birrier, P., Griese, M. (2001) Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 17: 716-722.
- De Blic, J., McKelvie, P., Le Bourgois, M., Blanche, S., Benoist, M.R., Scheinmann, P. (1987) Value of bronchoalveolar lavage in the management of severe acute pneumonia and interstitial pneumonitis in the immunocompromised child. *Thorax.* 42: 759-765.
- Dickie, R., Alanis, D.R., Delfosse, E., Tsuda, V.A. (2009) Age-dependent changes in porcine alveolar macrophage function during the postnatal period of alveolarization. *Dev Comp Immunol.* 33: 145-151.
- Duncan, J.R. (2001) *Veterinary Laboratory Medicine (Clinical Pathology).* (2nd ed.) Shiraz University Press. Shiraz, Iran.
- Firth, G.A. (1997) The normal lymphatic system of domestic fowl. *Vet Bull.* 47: 167-179.
- Fogarty, U., Quinn, P.J., Hannan, J. (1983) Broncho-pulmonary lavage in the calf-a new technique. *Irish Vet J.* 37: 35-38.
- Gordon, M., Clark, B., Siwicki, M.E., Caswell, M., Jeff, L. (2008) Stress alters the cellular and proteomic compartments of bovine bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Immunol Immunopathol.* 125: 111-125.
- Henderson, A.J.W. (1994) Bronchoalveolar lavage. *Arch Dis Child.* 70: 167-169.
- Iranzad Mahmoudi, D. (2008) *Methods and Techniques of Modern Veterinary Clinical Laboratory.* (1st ed.) Salar Press, Iran.
- Jobe, A.H., Ikegami, M. (2001) Biology of surfactant. *Clin Perinatol.* 28: 655-669.
- Klech, H., Hutter, C., Costabel, U. (1992) Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev.* 2: 47-127.
- Lakritz, J., Marsh, A.E., Cockrell, M., Smith, M.F., Tyler, J.W. (2004) Characterization of gelatinases in bronchoalveolar lavage fluid and gelatinases produced by alveolar macrophages isolated from

به طور کلی با توجه به مطالعات مختلف و یافته‌های این مطالعه می‌توان به این نتیجه رسید که آگاهی از وضعیت شمارش سلولی و تعیین میزان و درصد هر سلول نقش مهمی را در تشخیص و روند پیشرفت بیماری و یا بهبود وضعیت بیمار ایفا می‌کند و نتیجه شمارش سلولی به طور قابل اعتمادی بیانگر وضعیت دستگاه تنفسی خواهد بود. به نظر می‌رسد سن گوساله و نوع لوب ریه تأثیر چندانی بر روی الگوی سلول‌های دفاعی ریه ندارد اما جنس و استرس کشتار می‌تواند سبب تغییر در نوع سلول‌های دفاعی ریه و تراکم سلولی و بروز بیشتر بیماری‌های تنفسی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از پژوهشگاه زیست پزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و بنیاد ملی نخبگان که در انجام رساندن این پژوهش همکاری داشتند کمال تشکر را دارند.



- healthy calves. *Am J Vet Res.* 65: 163-172.
19. Lay, J.C., Slausona, D., Castlaman, N.D.W.L. (1986) Volume-controlled Bronchopulmonary Lavage of Normal and Pneumonic Calves. *Vet Pathol.* 23: 673-680.
 20. McGavin, M.D., Carlton, W.W., Zachary, J.F. (2010) Thomson Special Veterinary Pathology. (3rd ed.) St. Louis, Mosby. USA.
 21. Mohammadi, G.R., Nazifi, S., Rezakhani, A., Esmailnejad, Z. (2007) Effect of transportation stress on blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves. *Comp Clin Pathol.* 16: 85-95.
 22. Pinaa, T.C., Zapata, I.T., Hernández, F.C., López, J.B., Paricio, P.P. (2001) Hernández, P.M. Tumour markers in serum, bronchoalveolar lavage and biopsy cytosol in lung carcinoma: what environment lends the optimum diagnostic yield. *Clinica Chimica Acta.* 305: 27-34.
 23. Pringle, J.K., Viel, P.E., Shewen, R.A., Willoughby, S., Martin, W., Valli, V.E.O. (1988) Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. *Can J Vet Res.* 52: 239-248.
 24. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007) *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats.* (10th ed.) Elsevier Health Sciences, Philadelphia, USA.
 25. Ratjen, F., Bredendiek, M., Brendel, M., Meltzer, J., Costabel, U. (1994) Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J.* 7: 1865-1870.
 26. Sharma, A.K., Woldehiwet, Z. (1995) Cell-mediated immune responses of lambs to challenge with bovine respiratory syncytial virus. *Clin Exp Immunol.* 101: 288-294.
 27. Sweeney, C.R., Rossier, Y., Ziemer, E.L., Lindborg, S. (1992) Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res.* 53: 1376-9.
 28. Sweeney, C.R., Rossier, Y., Ziemer, E.L., Lindborg, S.R. (1994) Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *Am J Vet Res.* 55: 1501-4.
 29. Van sooling, D., Moolenbeek, C., Van Loveren, H. (1990) An improved method of bronchoalveolar lavage of lungs of small laboratory animals: short report. *Lab Anim.* 24: 197-199.
 30. Wilkie, B.N., Markham, R.J.F. (1981) Bronchoalveolar washing cells and immuno-globulins of clinically normal calves. *Am J Vet Res.* 42: 241-243.
 31. Wilkie, B.N., Markham, R.J.F., Shewen, P.E. (1980) Response of calves to lungchallenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am J Vet Res.* 41: 1773-1778.
 32. Yokota, S.J., Forman, H., Levy, D.A., Horak, B.R., Tegtmeier, S.B. (2007) The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 44: 373-379.



The effects of age, sex and slaughtering on cellular distribution of bronchoalveolar lavage fluids in calves and cattle

Eftekhari, Z.¹, Mokhber Dezfouli, M.R.^{1*}, Toghroli, R.², Nassiri, S.M.³, Bahonar, A.R.⁴, Tavanaimanesh, H.¹

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran-Iran

²Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran-Iran

³Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran-Iran

⁴Department of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 20 April 2014, Accepted 2 July 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Based on our knowledge, there have been no studies about the effect of age, sex, lobe and slaughtering stress on cellular distribution of bronchoalveolar lavage fluids in calves and cattle in Iran. **OBJECTIVES:** The main purpose of this study was to compare the cell distribution pattern of bronchial alveolar lavage fluids in calves and cattle in terms of age, sex, type of lung lobes and the stress of slaughtering. **METHODS:** Bronchoalveolar lavage was performed in twelve calves at three different ages' groups (less than 2 months, 2-4 months and 4-6 months). 250 milliliters sterile normal saline was infused through the tracheal tube and lavage was performed using syringe pressure. Post-mortem BAL was performed on twelve isolated lungs by infusing 150 milliliter normal saline. The lavage fluid was collected in sterile plastic tubes. The slide smears was prepared by pellet which were air-dried and stained with a Giemsa stain. Slides were evaluated cytologically. The data was analyzed by T-test, One Way ANOVA and post hoc Tukey test. Also, the Spearman correlation coefficient was used to assess the age and cell. **RESULTS:** Significant negative correlations were observed between cells such as epithelial cells, macrophages and mast cells, with a correlation coefficient of -0.430, -0.059 and -0.267- and age although the differences were not significant ($p < 0.01$). Statistically significant difference was observed in percentages of mast cells in males ($1.48 \pm 1.25\%$) and females (zero percent) ($p = 0.04$). The differences were significant ($p = 0.019$) between percentage of epithelial cells in the lungs of slaughtered cattle and lavaged lung of calves. The percentages of macrophages in slaughtered animals was significantly decreased ($p = 0.019$) compared with live calves. Significant differences were not observed in cell density in different ages and sexes. But in the cell density in live animals (583 cells per microliter) was significantly higher than the lungs of slaughtered (237 cells per microliter) ($p = 0.03$). **CONCLUSIONS:** It seems that age and lobe do not affect pattern of lung immune cells. Sex and slaughtering stress, however may cause changes in immune cell type and density and lead to develop more respiratory disease.

Key words: age, calf, lavage, sex, stress

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Bronchoalveolar lavage fluid (Giemsa stain 100×)-A: Macrophage - B: epithelial cylinders - C: Epithelial cube - D: Neutrophil - E: Lymphocyte.

Table 1. The mean temperature, heart rate and respiratory rate in calves.

Table 2. The mean blood parameters in calves before bronchoalveolar lavage.

Table 3. Comparison of number of cells per microliter in bronchoalveolar lavage fluids in calves and lavaged lungs (mean \pm standard error).

Table 4. Comparison of cell counts by age and sex (mean \pm standard error).

Table 5. Comparison of cell counts by lung lobes (mean \pm standard error).

Table 6. A comparison of cell count in live calves and slaughtered lavaged lung (mean \pm standard error).



*Corresponding author's email: mokhberd@ut.ac.ir, Tel: 021-61117002, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 69, 3: 255-261, 2014