



مقاله علمی - پژوهشی:

ارزیابی فعالیت کمپلمان سرم تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*)

آزاده یکتاسرشت^{۱*}، سیاوش سلطانیان^۲، امین غلامحسینی^۲، شیرین صفائیان^۲، حسام‌الدین کردستانی^۳

*azadeh_neisi@shirazu.ac.ir

۱-گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲-گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱

چکیده

سیستم کمپلمان به عنوان یکی از اجزاء مهم سیستم ایمنی ذاتی در کروکودیل‌ها کمتر شناخته شده است. ارزیابی فعالیت کمپلمان سرم به عنوان یک ابزار با ارزش برای تشخیص وضعیت سلامتی کروکودیل‌ها محسوب می‌شود. در این پژوهش، پاسخ ایمنی ذاتی تمساح مردابی یا پوزه کوتاه (*Crocodylus palustris*)، بزرگترین خزنده بومی ایران، با استفاده از همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش و کروکودیل مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تأثیر غلظت، حجم و دما بر فعالیت مسیر جایگزین کمپلمان تمساح مردابی (*C. palustris*) با استفاده از روش‌های همولیتیک استاندارد انجام و اندازه‌گیری میزان همولیز صورت گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده ارتباط معنی‌داری بین غلظت، حجم و دما با میزان همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش وجود داشت ($P < 0.05$). میزان همولیز سرم در غلظت‌ها (۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد)، حجم‌ها (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر) و دماهای مختلف (۳۵-۵ درجه سانتی‌گراد) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). نتایج نشان می‌دهد که فعالیت مسیر جایگزین کمپلمان کروکودیل ممکن است تحت تأثیر غلظت، حجم و دما قرار گیرد که این سبب افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی و ایجاد مقاومت به شیوع بیماری‌ها می‌گردد.

لغات کلیدی: پاسخ ایمنی، کمپلمان، ایمنی ذاتی، تمساح مردابی

*نویسنده مسئول

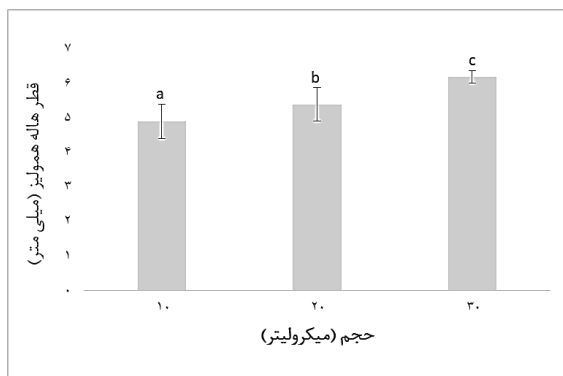
مقدمه

سیستم کمپلمان یکی از اجزاء مهم سیستم ایمنی ذاتی است که در همه مهره‌داران و تعداد زیادی از بی‌مهرگان یافت می‌شود (Merchant et al., 2006a). سیستم کمپلمان از ۳۵ پروتئین به شکل غیر فعال در خون تشکیل می‌شود که می‌تواند از سه مسیر شامل: ۱- مسیر کلاسیک (از طریق کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی)، ۲- مسیر جایگزین (به وسیله مولکول‌های سطحی میکروارگانیزم‌ها) و ۳- مسیر لکتین (به وسیله کربوهیدرات سطح باکتری)، فعال شود (Holland and Lambris, 2002). در چندین مطالعه، فعالیت کمپلمان سرم در خزندگانی همانند لاک پشت‌ها، تمساح و کروکودیل مورد بررسی قرار گرفته، ولی تاکنون مطالعه‌ای بر تمساح مردابی (*Crocodylus palustris*) صورت نگرفته است. برخی از مطالعات وجود اجزاء سیستم مکمل را در انواع مختلف خزندگان گزارش کرده‌اند. مسیر جایگزین مکمل سرم در خون تمساح آمریکایی *Alligator mississippiensis* و کروکودیل‌های آب شیرین نیز شناسایی و گزارش شده است (Koppenheffer, 1986; Merchant et al., 2005, 2006). فعالیت مسیر جایگزین کمپلمان به واسطه اندازه‌گیری میزان فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم زمانی که این مسیر به وسیله گلبول‌های قرمز بیگانه فعال می‌شود، قابل بررسی است (Yano, 1992). این آنالیز برای ارزیابی اثرات عوامل مختلف از جمله عفونت‌ها، عوامل محیطی و تغذیه بر میزان فعالیت کمپلمان سرم قابل استفاده است (Holland and Lambris, 2002). سیستم کمپلمان به عنوان یکی از اجزاء مهم سیستم ایمنی ذاتی در خزندگان کمتر شناخته شده است. ارزیابی فعالیت کمپلمان سرم به عنوان ابزاری با ارزش برای تشخیص وضعیت سلامتی محسوب می‌شود. درک چگونگی پاسخ‌های ایمنی تحت تأثیر عوامل محیطی برای تشخیص اثر این عوامل بر سیستم ایمنی ذاتی خزندگان از جمله فعالیت کمپلمان لازم و ضروری است. فعالیت کمپلمان در خزندگان ممکن است تحت تأثیر عوامل محیطی قرار گیرد که این سبب افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی و ایجاد مقاومت به شیوع بیماری‌ها می‌گردد. با توجه به وجود اطلاعات محدود در

زمینه فعالیت کمپلمان در خزندگان، در این تحقیق به ارزیابی پاسخ ایمنی ذاتی در تمساح مردابی یا پوزه کوتاه (*C. palustris*) بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز بیگانه پرداخته می‌شود تا ارتباط احتمالی بین نتایج این مطالعه با میزان فعالیت ایمنی ذاتی در مقابله با بیماری‌ها بررسی شود. *C. palustris* یکی از گونه‌های منحصربه‌فرد جانوری در کشور است که زیستگاه آن سیستان و بلوچستان است. نام محلی آن گاندو است. تاکنون هیچ بررسی در مورد عملکرد سیستم ایمنی این تمساح صورت نگرفته است.

مواد و روش کار

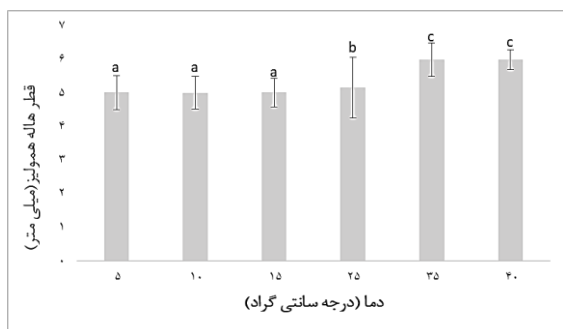
در این مطالعه از چهار کروکودیل (*C. palustris*) از منطقه حفاظت شده نگور (25°53'40"N 61°29'60"E) و (25°50'12"N-61°30'48"E) در جنوب شرق ایران در استان سیستان و بلوچستان خون‌گیری به عمل آمد و سپس خون‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی شیراز منتقل شدند. جهت تهیه سرم، خون در ۲۵۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای تهیه گلبول‌های قرمز خرگوش خونگیری از خرگوش با ضد انعقاد سیترات سدیم صورت گرفت. گلبول‌های قرمز سه بار شستشو شدند و در نهایت سوسپانسیون ده درصد تهیه گردید. در مراحل بعدی وابستگی غلظت، حجم و دما کمپلمان سرم کروکودیل با میزان همولیز گلبول قرمز حساس نشده خرگوش مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه پلیت‌های همولیتیک از بافر باربیتال و برای تهیه ژل، از آگاروز ۲ درصد استفاده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱۰ درصد از گلبول‌های قرمز خرگوش به ژل آگاروز تهیه شده اضافه گردید. چاهک‌هایی با قطر ۳ میلی متر و فواصل ۱۴ میلی متر در داخل ژل ایجاد شد. تیتراهای مختلف از سرم با استفاده از PBS (۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد) تهیه شد و ۳۰ میکرولیتر از هر رقت سرم به هر چاهک اضافه و انکوباسیون یک شب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. برای ارزیابی اثر حجم بر فعالیت کمپلمان سرم حجم‌های مختلف از سرم (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر) استفاده شد. برای بررسی وابستگی دمایی همولیز RBC، انکوباسیون سرم در دماهای متفاوت (۳۵-۵ درجه



شکل ۲: میزان همولیز کمپلمان در حجم های مختلف سرم کروکودیل *C. palustris* ($p < 0.05$)

Figure 2: Complement hemolysis in different volumes of serum in *C. palustris*. ($p < 0.05$)

بین میزان همولیز سرم با دماهای مختلف به طور معنی داری ارتباط داشت که افزایش را نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۳). بر اساس نتایج به دست آمده، میزان همولیز به ترتیب در دماهای ۵-۱۵ درجه سانتی گراد (5.02 ± 0.5 میلی متر)، ۲۵ درجه سانتی گراد (5.17 ± 0.9 میلی متر) و در محدوده دمایی ۳۵-۴۰ درجه سانتی گراد (6 ± 0.5 میلی متر) مشاهده شد.



شکل ۳: میزان همولیز کمپلمان در دماهای مختلف سرم کروکودیل *C. palustris* ($p < 0.05$)

Figure 3: Complement hemolysis in different temperatures of serum in *C. palustris*. ($p < 0.05$)

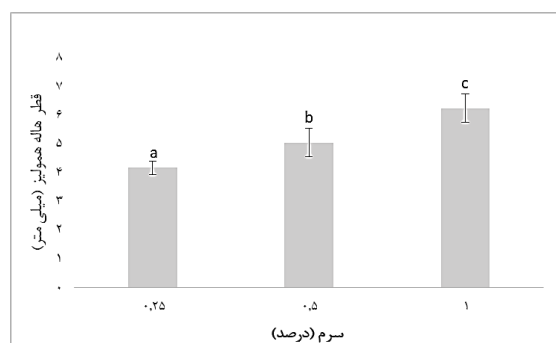
بحث

به دلیل اطلاعات ناکافی در رابطه با سیستم کمپلمان خزندگان از جمله تمساح ها، از سویی و اطلاعات محدود در رابطه با عوامل مؤثر بر این سیستم از جمله عوامل محیطی و فیزیولوژیک از سوی دیگر، مطالعه در این زمینه به عنوان

سانتی گراد) انجام شد. هاله همولیز ایجاد شده در همه موارد به طور مشخص قابل دید و اندازه گیری بود (Lachmann and Hobart, 1978). برای کنترل منفی فقط از PBS استفاده شد. این نمونه های کنترل به عنوان قضاوتی برای کل سایر نمونه ها استفاده می شوند. برای مطالعه و تجزیه و تحلیل داده های حاصل از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودار ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

بر اساس داده های به دست آمده، غلظت سرم ارتباط معنی داری با میزان همولیز داشت به طوری که میانگین میزان همولیز به ترتیب در غلظت های ۲۵ درصد سرم (4.17 ± 0.23 میلی متر)، ۵۰ درصد سرم (5.0 ± 0.57 میلی متر)، و ۱۰۰ درصد سرم (6.25 ± 0.5 میلی متر) مشخص شد. بیشترین و کمترین میزان همولیز به ترتیب در غلظت های ۲۵ و ۱۰۰ درصد سرم مشاهده شد ($p < 0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱: میزان همولیز کمپلمان در غلظت های مختلف سرم کروکودیل *C. palustris* ($p < 0.05$)

Figure 1: Complement hemolysis in different concentrations of serum in *C. palustris*. ($p < 0.05$)

بین میزان همولیز و حجم های مختلف سرم نیز ارتباط معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$). میزان همولیز در حجم های مختلف سرم، ۱۰ میکرولیتر (4.9 ± 0.5 میلی متر)، ۲۰ میکرولیتر (5.4 ± 0.5 میلی متر) و ۳۰ میکرولیتر (6.2 ± 0.19 میلی متر) دیده شد. بیشترین و کمترین میزان همولیز به ترتیب در حجم های ۱۰ و ۳۰ میکرولیتر سرم مشاهده گردید (شکل ۲).

معیاری برای تعیین شرایط سلامتی بسیار ضروری است. استفاده از تکنیک همولیز گلبول‌های قرمز برای ارزیابی سیستم ایمنی ذاتی مهره‌داران مناسب است. در این تحقیق ارزیابی فعالیت همولیتیک مسیر جایگزین کمپلمان سرم کروکودیل *C. palustris* بر گلبول‌های قرمز خرگوش انجام شد. در مطالعه حاضر، میزان فعالیت کمپلمان سرم به طور معناداری، روندی صعودی را در غلظت‌های مختلف سرم کروکودیل (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد) نشان داد به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت مسیر آلترناتیو کمپلمان سرم در غلظت ۱۰۰ درصد مشاهده شد. ارتباط معنی‌داری بین همولیز با حجم‌های مختلف از سرم (۱۰، ۳۰ و ۲۰ میکرولیتر) نتیجه شد. بیشینه میزان همولیز در حجم ۳۰ میکرولیتر مشاهده گردید. میزان فعالیت کمپلمان سرم با دمای انکوباسیون، وابستگی معناداری نشان داد. بیشترین میزان فعالیت کمپلمان در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد دیده شد. بر اساس مطالعات قبلی، مشخص شده است که غلظت، حجم و دما بر میزان فعالیت سیستم کمپلمان خزندگان موثر است. Ferronato و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای تأثیر غلظت و دما را در گونه‌ای از لاک‌پشت *Phrynos geoffroanus* بررسی کردند و دریافتند که میزان فعالیت کمپلمان با افزایش میزان غلظت و دما، روندی افزایشی داشته است که با نتایج به دست آمده در این مطالعه برای تمساح مردابی، همخوانی و مطابقت داشت (Ferronato et al., 2009). Merchant و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه بر خزنده اژده‌های کومودو (*Varanus komodoensis*) بیشترین میزان فعالیت کمپلمان را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (Merchant et al., 2012). برخی از محققین بیشترین میزان فعالیت کمپلمان را در گونه‌های کروکودیل در آبهای شیرین و شور به ترتیب در دماهای ۳۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تمساح آمریکایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کرده‌اند (Merchant and Britton, 2006). در خزنده *Amphiuma tridactylum* بیشینه میزان فعالیت کمپلمان سرم در دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Major et al., 2011). نتایج این مطالعات در ارتباط با

تأثیر دما بر بیشینه فعالیت کمپلمان با نتایج مطالعه حاضر متفاوت بود، ولی نتیجه مطالعه Merchant و همکاران (۲۰۰۶) بر گونه تمساح آمریکایی، با تحقیق حاضر همخوانی داشت. در مطالعه Merchant و همکاران (۲۰۱۳) بر گونه‌های کروکودیل آفریقایی *Osteolaemus tetraspis* و *Mecistops cataphractus* تأثیر عوامل حجم و دما بررسی شد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که میزان پروتئین‌های کمپلمان سرم در بین گونه‌های خزندگان متفاوت است (Merchant et al., 2005). در مطالعه Ferronato و همکاران (۲۰۰۹) بر لاک‌پشت گونه *Phrynos geoffroanus* مشاهده کردند که سرم با غلظت ۸۰ درصد، میزان ۱۰ درصد همولیز را نشان داد که در مقایسه تمساح آمریکایی که در غلظت ۲۰ درصد سرم، دارای ۹۰ درصد همولیز بود، از میزان همولیز کمتری برخوردار بود. اگرچه در *Phrynos geoffroanus* میزان همولیز در مقایسه با خزنده تمساح آمریکایی کمتر نشان داده شد، ولی در میزان همولیز با غلظت سرم یک روند افزایشی مشاهده گردید که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت (Ferronato et al., 2009). در مطالعه یکتاسرشت و همکاران (۱۳۹۳ و ۱۳۹۷) بر لاک‌پشت در گونه‌های *Emys orbicularis* و *Trachemys scripta elegans*، نتایج مشابهی در ارتباط با تأثیر غلظت و حجم سرم و دما با میزان همولیز به دست آمد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (Yektaseresht et al., 2014, 2018). درک چگونگی پاسخ‌های ایمنی تحت تأثیر عوامل محیطی برای تشخیص اثر این عوامل بر سیستم ایمنی ذاتی مهره‌داران از جمله میزان فعالیت کمپلمان، لازم و ضروری است. در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که فعالیت مسیر جایگزین کمپلمان سرم در کروکودیل *C. palustris* ممکن است تحت تأثیر غلظت، حجم و دما قرار گیرد. این اطلاعات دیدگاهی نو را در ارتباط با سیستم ایمنی ذاتی کروکودیل ضد پاتوژن‌ها فراهم کرده و ارزش سیستم کمپلمان سرم را به عنوان جزئی مهم از سیستم ایمنی ذاتی برای کنترل عفونت‌های میکروبی مشخص می‌کند.

- crocodiles. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143:488-493.
- Merchant, M.E., Henry, D., Falconi, R., Musche, B. and Bryja, J., 2012.** Characterization of serum complement activity in serum of the Komodo dragon (*Varanus komodoensis*). *Advances in Biological Chemistry*, 2:353-359.
- Merchant, M.E., Determan, R., Falconi, R. and Shirley, M., 2013.** Serum Complement Activity in Two Species of Divergent Central African Crocodiles. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 2:2.
- Yano, T., 1992.** Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, J.S. Fletcher, T.C. Anderson, D.P. et al. (eds.) *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, New Jersey: SOS, pp 131-141.
- Yektaseresht, A., Gholamhosseini, A. and Janparvar, A., 2014.** Assessing the impact of temperature, volume and concentration of serum on complement activity in the red-eared slider turtle, (*Trachemys scripta elegans*). *World Journal of Environmental Biosciences*, 6:60-4.
- Yektaseresht, A., Gholamhosseini, A. and Janparvar, A., 2018.** Influence of temperature, concentration and volume of serum on alternative complement pathway activity in European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Journal of Research in Ecology*, 6(1):1528-33.
- Ferronato, B.O., Merchant M.E., Marques T.S. and Verdade L.M., 2009.** Characterization of innate immune activity in *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Zoologia*, 26(4):747-752.
- Holland, M.C.H. and Lambris, J.D., 2002.** The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 12:399-420.
- Koppenheffer, T.L., 1986.** Activation of the alternative pathway by both high and low molecular weight turtle antibodies. *American Zoologist*, 26: 86.
- Lachmann, P.J. and Hobart M.J., 1978.** Complement technology. In: Weir, D.M. (eds). *Handbook of experimental immunology*. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, United Kingdom. pp 5A.12-5A.13.
- Major, S., Fontenot, C.L, Pojman, J.A. and Merchant, M.E., 2011.** Serum complement activity in the three-toed amphiuma (*Amphiuma tridactylum*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34:115- 121.
- Merchant, M.E., Roche, C., Thibodeaux, D. and Elsey, R.M., 2005.** Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comparative biochemistry and physiology B*, 141:281-288.
- Merchant, M.E. and Britton, A.R.C., 2006.** Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*)

Evaluation of serum complement activity in Mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*)

Yektaseresht A.^{1*}; Soltanian S.²; Gholamhosseini A.²; Safaeian S.³; Kordestani H.³

*azadeh_neisi@shirazu.ac.ir

1-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2-Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University Shiraz, Iran

3-Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Abstract

Little is known about complement system as a component of innate immunity of the ectothermic vertebrates such as crocodiles. Serum complement is valuable tool in determining the health status of turtles. In this research effect of concentration, volume and temperature on alternative complement pathway activity of Mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*) using standard haemolytic assays was studied. For this purpose, *Crocodylus palustris* serum complement hemolysis in different concentrations, volumes and temperatures was measured. Results indicated significant relation between relation measured hemolysis and concentration, volume and temperature ($p < 0.05$). The measure of hemolysis in various concentrations (25%, 50% and 100%), volumes (10, 20, 30 μ L) and temperatures (5-35°C) were significantly increased ($p < 0.05$). The results show that alternative complement pathway activity of crocodiles might affect concentration, volume and temperature that it caused increased non-specific immunity and the resistance to the outbreak of diseases.

Key words: Complement, Crocodiles, Non-specific immunity, Serum

*Corresponding author