مجله علمی شیلات ایران ۳۲(۲) ۶۳-۶۷ (DOI): 10.22092/ISFJ.2023.129252

مقاله علمی – پژوهشی:

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

آزاده یکتاسرشت*[۱]، سیاوش سلطانیان[۲]، امین غلامحسینی[۲]، شیرین صفائیان[۳]، 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 دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۱

چکیده

سیستم کملپمان 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 پوزه‌کوتاه (*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 روش های همولیتیک استاندارد انجام و اندازه گیری میزان همولیز صورت گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده ارتباط معنی‌داری بین غلظت، حجم و دما با میزان همولیزگلبول‌های قرمز خرگوش وجود داشت ($P<۰/۰۵$). میزان همولیز سرم در غلظت‌ها (۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد)، حجم ها (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر) و دماهای مختلف (۳۵-۵ درجه سانتی‌گراد) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

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 (به‌وسیله مولکول‌های سطحی میکروارگانیسم‌ها) و۳- مسیر لکتین (به‌وسیله کربوهیدرات سطح باکتری)، فعال شود (Holland and Lambris, 2002). در چندین مطالعه، فعالیت کمپلمان سرم در خزندگانی همانند لاک پشت ها، 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 به‌واسطه اندازه‌گیری میزان فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم زمانی که این مسیر به‌وسیله 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 کملپمان 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 گلبول های 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

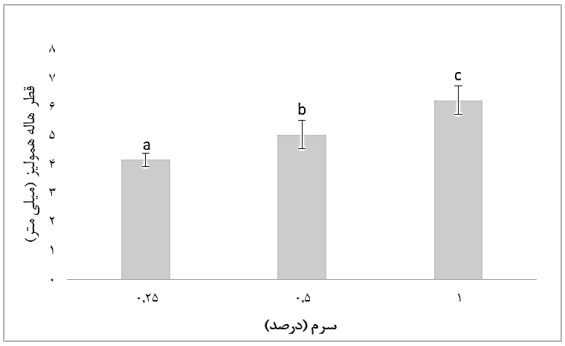
در این مطالعه از چهار کروکودیل (*C. palustris*) از منطقه حفاظت شده نگور (25°53'40''N 61°29'60''E) و 25°50'12''N-61°30'48''E) در جنوب شرق ایران در استان سیستان و بلوچستان خون‌گیری به‌عمل آمد و سپس خون‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی شیراز منتقل شدند. جهت تهیه سرم، خون در ۲۵۰۰×g 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 قرارگرفت. 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. تیترهای مختلف از سرم با استفاده از PBS (۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد) تهیه شد و ۳۰ میکرولیتر ازهر 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

سانتی‌گراد) 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 نمونه‌های کنترل به عنوان قضاوتی برای کل سایر نمونه‌ها استفاده می‌شوند. برای مطالعه و تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودار ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

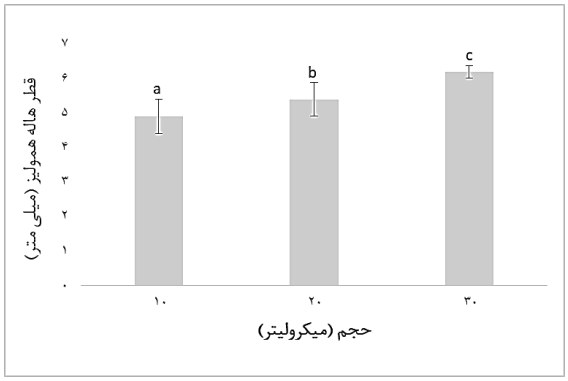
بر اساس داده‌های به‌دست آمده، غلظت سرم ارتباط معنی‌داری با میزان همولیز داشت به طوری‌که میانگین میزان همولیز به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵ درصد سرم (۴/۱۷±۰/۲۳ میلی‌متر)، ۵۰ درصد سرم (۰/۰۵۷ ± ۵/۰۵ میلی‌متر)، و ۱۰۰ درصد سرم (۰/۵ ±۶/۲۵ میلی‌متر) مشخص شد. بیشترین و کمترین میزان همولیز به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ درصد سرم مشاهده شد ($p<0/05$) (شکل ۱).



شکل ۱: میزان همولیز کمپلمان در غلظت‌های مختلف سرم کروکودیل *C. palustris* ($p<0/05$)

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

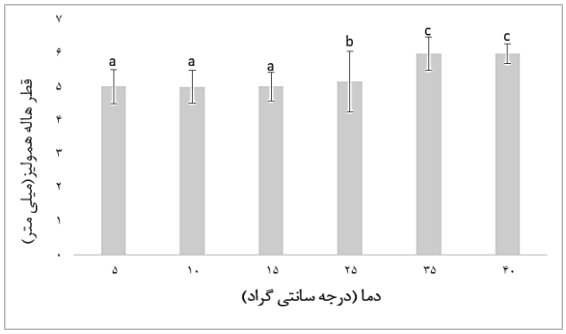
بین میزان همولیز و حجم‌های مختلف سرم نیز ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$). میزان همولیز در حجم‌های مختلف سرم، ۱۰ میکرولیتر (۰/۰۵ ±۴/۹ میلی‌متر)، ۲۰ میکرولیتر (۰/۰۵±۵/۴ میلی‌متر) و ۳۰ میکرولیتر (۰/۱۹ ±۶/۲ میلی‌متر) دیده شد. بیشترین و کمترین میزان همولیز به‌ترتیب در حجم‌های ۱۰ و ۳۰ میکرولیتر سرم مشاهده گردید (شکل ۲).



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 معنی‌داری ارتباط داشت که افزایش را نشان داد ($p<0/05$) (شکل ۳). بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان همولیز به‌ترتیب در دماهای ۱۵-۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۰۵ ±۵/۰۲ میلی‌متر)، ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۰۹ ±۵/۱۷ میلی‌متر) و در محدوده دمایی ۴۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۰۵ ±۶ میلی‌متر) 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 تمساح‌ها، 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

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 *Phrynops 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 به‌ترتیب 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 تاثیر 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*تاثیر 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*Phrynops 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 *Phrynops 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 لاک پشت در گونه‌های *Emys orbicularis*و *Trachemys scripta elegans*، نتایج مشابهی در ارتباط با تاثیر غلظت و حجم سرم و دما با میزان همولیز به‌دست 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 عفونت های میکروبی مشخص می‌کند.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

منابع

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*) 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.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]

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 µL) 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-09]