تأثير الزنك على البروتينات وإلانزيمات في محار المياه العذبة *Dreissena polymorpha*

عبد علي ذاكر احمد سامي فرحان

قسم علوم الحياة، كلية العلوم ــ جامعة الانبار

تاريخ القبول: ٢٠١١/٦/١٩، تاريخ الاستلام:٢٠١٠/١١/٣

الخلاصة

جمعت نماذج من بلح المياه العذبة *Dreissena polymorpha* من بحيرة القادسية – قضاء حديثة – محافظة الانبار – العراق للفترة من كانون أول 2008 إلى شباط 2009 .عرضت الحيوانات إلى 4 و 8 و 16 ملغم خارصين /لتر ماء لفترة ثمانية أيام. استخدمت الكتلة الحية لمعرفة تأثير الخارصين على الحزم البروتينية وحزم إنزيم الاستريز المرحلة كهربائياً على الهلام المتعدد الاكريلامايد وعلى فعالية خمسة إنزيمات والمحتوى البروتيني (باستخدام الطريقة اللونية). وجد بان الخارصين قد سبب :(أ) تغير في كثافة بعض حزم الاستريز (المرحلة كهربائيا) وزيادة في كمية البروتينات الكلية بازدياد تركيز الخارصين في الماء (ب) زيادة في فعالية كل من الانزيمات : الفوسفاتيز القاعدي وGOT وLDH وتثبيط في فعالية الانزيمين ACP وGPT. (ج) لم يسبب الخارصين تغيرات مهمة على الحزم البروتينية المرحلة كهربائيا. يمكن استخدام مثل هذه التغيرات في حيوان الدرسينا كمؤشر على تلوث المياه بالخارصين.

المقدمة

يستخدم الحيوان *Dreissena polymorpha* خفير في برامج المراقبة الحيوية لتقييم نوعية المياه في البيئة، وله القدرة على تجميع مختلف الملوثات في جسمه ومنها الخارصين (Elie et al., 2007).

يعد الخارصين احد العناصر التي يحتاجها الحيوان لعدة أعمال وظيفية منها المناعة وإزالة السمية والنمو والتكاثر(Cho *et al.*, 2007; Yousef *et al.*, 2002). رغم إن هذا العنصر من العناصر الطبيعية في البيئة إلا إن زيادة طرحه نتيجة النشاطات البشرية للبيئة يعد من الملوثات البيئية (Elumalia *et al.* 2006). إن فقدان هذا العنصر (الخارصين) يسبب إضرار مرضية أو تغيرات في طبيعة الكائنات الحية ، وتنعكس هذه الحالة عندما تكون معدلاته طبيعية بالجسم، ولكن زيادة تركيزه عن حد العتبة قد يصبح ساما وبعدها قاتلا،

فالخارصين ضروري بتراكيز واطئة للايض فهو يدخل في تركيب عدد من البروتينات وكعاملا مساعدا (Cofactor) لعدد من الإنزيمات (Soto *et al.* 2005).

وجد إن تعريض المحار *Corbicula fluminea* و*D. polymorpha* إلى الخارصين يؤدي إلى العديد من التغيرات الكيموحيوية مثل تخليق بروتينات ترتبط بالخارصين ومنها الميتالوثايونين (Marie *et al.* 2006) كما وجد إن الخارصين يسبب تغيرات في فعالية بعض الإنزيمات مثل إنزيمات LDH وACP وALP وSDH في السرطان البحري (Senthilkumar *et al.* , 2007) والتأثير في فعالية إنزيمات GOT و GPT و ALP و LDH في الفئران (Wang *et al.*, 2006).

الهدف من البحث هو التعرف على بعض المتغيرات الكيوحيوية في الحيوان الرخوي *D. polymorpha* من بحيرة القادسية في قضاء حديثة وتعريضه إلى الخارصين، وإمكانية استخدام هذه التغيرات كمؤشر مبكر على تلوث المياه بهذا العنصر .

طرائق العمل

تم جمع الحيوان *D. polymorpha* بأوزان متقاربة تراوحت بين 1.4– 1.6 غم وبأطول تراوح بين 1.2– 1.6 سم من بحيرة القادسية في قضاء حديثة في محافظة الانبار بالاعتماد على شباك الصيادين. نقلت العينات إلى المختبر وتم توزيعها في أحواض سعة كل حوض 10 لتر حاوية على ماء خالي من الكلور وبمعدل 75 فرد في كل حوض ثم تركت في المختبر لفترة أسبوع مع تغيير الماء يومياً وإزالة الإفراد الميتة خلال هذه الفترة وذلك لإغراض التأقلم والتخلص من الإفراد غير السليمة (FAO 1977)، بعدها تم تعريض المحار إلى تراكيز مختلفة من الخارصين بهيئة كبريتات الخارصين ($ZnSO_4$) المذابة في الماء واستعملت التراكيز 4 و8 و16 ملغم خارصين/ لتر ماء ولفترة ثمانية أيام رافق ذلك مجموعة سيطرة تحت نفس الظروف باستثناء إضافة عنصر الخارصين .

تشريح الحيوانات وتحضير المستخلص

بعد انتهاء فترة التعريض قتلت الحيوانات بفصل المصراعين عن بعضهما ، واستؤصلت الكتلة الحية ووزنت باستعمال ميزان حساس ثم هرست باستعمال جهاز التجانس الزجاجي في محيط ثلجي بعد إضافة المحلول الدارئ Tris– HCl pH 7.2 بنسبة 5:1 وزن/حجم لدراسة المحتوى البروتيني وفعالية الإنزيمات، وبنسبة 2:1 وزن/حجم لدراسة الطرز البروتينية وطرز إنزيم الاستريز. فصل المستخلص باستعمال جهاز الطرد المركزي

بسرعة 15000 دورة/دقيقة ولمدة عشرة دقائق، واخذ الرائق وحفظ في عشرين درجة مئوية تحت الصفر لحين الاستخدام .

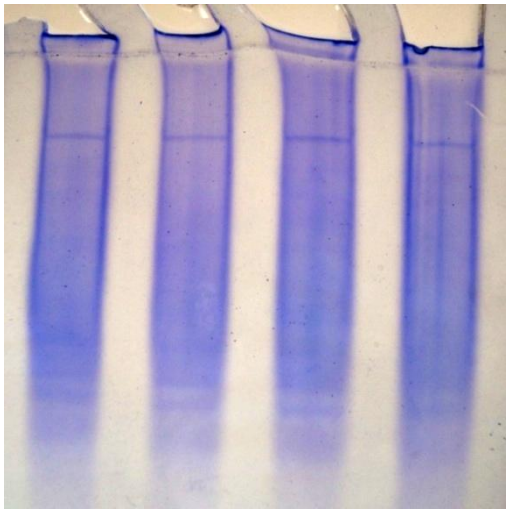
استخدمت طريقة بايوريت في تعيين كمية البروتين (Kaplan. and Pesce, 1989). إما تحديد الطرز البروتينية وطرز إنزيم الاستريز فقد جرى باستخدام الهلام المتعدد الاكريلامايد العمودي (Thaker & Haritos, 1991). تم قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي، والإنزيمين الناقلين للامين GPT,GOT (Wooton, 1964). إضافة إلى تقدير فعالية الإنزيمين ACP , LDH حسب ما ورد في (Tietz, 1995) .

التحليل الاحصائي: شمل التحليل الإحصائي حساب المتوسط الحسابي Mean والخطأ العشوائي Standard Error . تم استخدام التصميم العشوائي الكامل بواقع تسعة مكررات لاختبار التعريض بتراكيز المختلفة من الخارصين باستعمال البرنامج الاحصائي الالكتروني Genstat Discovery الإصدار الثالث (No3).

النتائج

تأثير الخارصين على الحزم البروتينية وحزم أنزيم الاستريز المرحلة كهربائياً

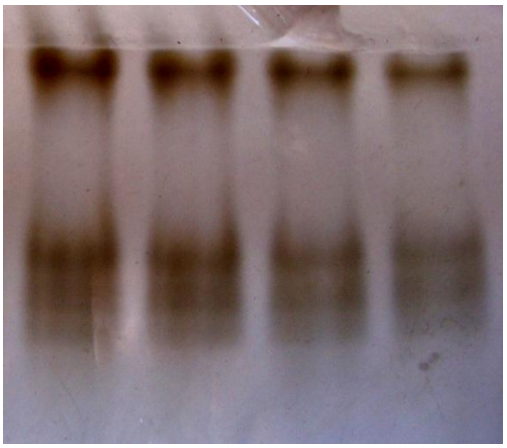
باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي على الهلام المتعدد الاكريلمايد وجد إن الخارصين لم يسبب إي تغيرات في حزم البروتينات في مستخلص الحيوان الرخوي *D. polymorpha* (الشكل 1) .



السيطرة 4ملغم/لتر 8ملغم/لتر 16ملغم/لتر

الشكل (1): تأثير الخارصين على الطرز البروتينية

إلا إنه تأثرت كثافة الحزم الالكتروفوريتية لإنزيم الاستريز, وازدادت بزيادة تركيز الخارصين (الشكل 2) .

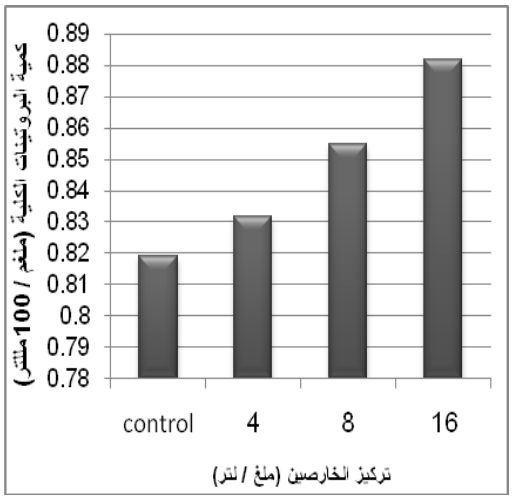


السيطرة 4 ملغم/لتر 8 ملغم/لتر 16 ملغم/لتر

شكل (2): تأثير الخارصين على حزم إنزيم الاستريز

تأثير الخارصين في كمية البروتين الكلية

لوحظ إن عنصر الخارصين سبب ارتفاع معنوي عند مستوى احتمال 5% في تحليل التباين، حيث يزداد ارتفاع كمية البروتين الكلي كلما ازداد تركيز الخارصين ، إذ بلغ متوسط البروتينات الكلية لدى حيوانات السيطرة 0.819mg/dl والحيوانات المعرضة لتراكيز 4 و 8 و 16 ملغم خارصين/لتر ماء كان متوسط كمية البروتينات الكلية فيها , 0.855 ,0.882 0.832 mg/dl على التوالي (الشكل3) .

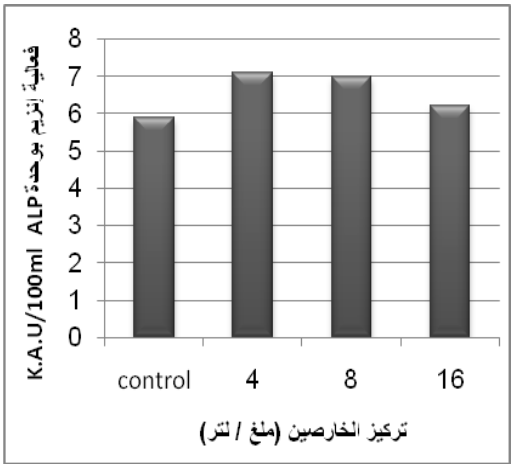


شكل (3): تأثير الخارصين على كمية البروتينات الكلية

تأثير الخارصين على فعالية إنزيم ALP

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن لعنصر الخارصين تأثير في نشاط الإنزيم أعلاه، ولقد اظهر التحليل الإحصائي وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمال 5% حيث بلغ

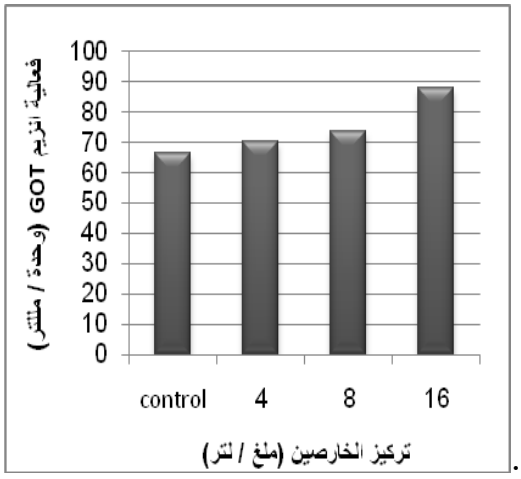
متوسط فعالية الإنزيم في حيوانات السيطرة 5.9K.A.U/L والمعاملة الأولى 7.111K.A.U/L والمعاملة الثانية 6.989K.A.U/L والمعاملة الثالثة 6.211K.A.U/L (الشكل 4) .



شكل (4): تأثير الخارصين على فعالية إنزيم ALP

تأثير الخارصين على فعالية إنزيم GOT

لغرض معرفة تأثير عنصر الخارصين في الجوانب الوظيفية لحيوان الدرسينا فقد تم تقدير نشاط إنزيم GOT وأظهرت نتائج الدراسة بان هناك فروق معنوية عند مستوى احتمال5%، حيث بلغ متوسط نشاط الأنزيم في حيوانات السيطرة 66.22U/ml وفي المعاملة الأولى 70U/ml وفي المعاملة الثانية 78.65U/ml وفي المعاملة الثالثة 88U/ml (الشكل 5)

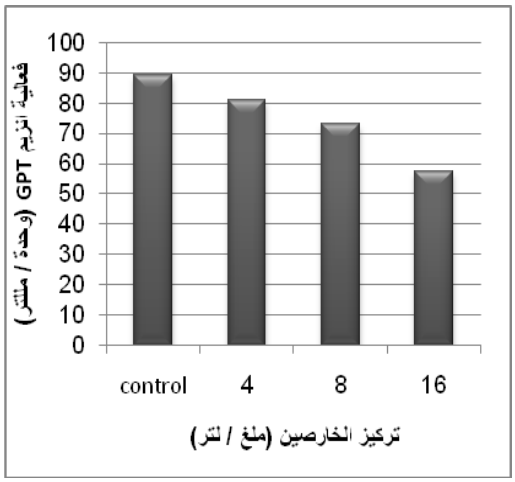


شكل (5): تأثير الخارصين على فعالية إنزيم GOT

تأثير الخارصين على فعالية إنزيم GPT

لقد تم دراسة تأثير عنصر الخارصين على نشاط الإنزيم وقد بينت نتائج الدراسة الحالية بان هناك انخفاضاً معنوياً بمستوى فعالية الإنزيم مقارنة بنماذج السيطرة، إذ بلغ

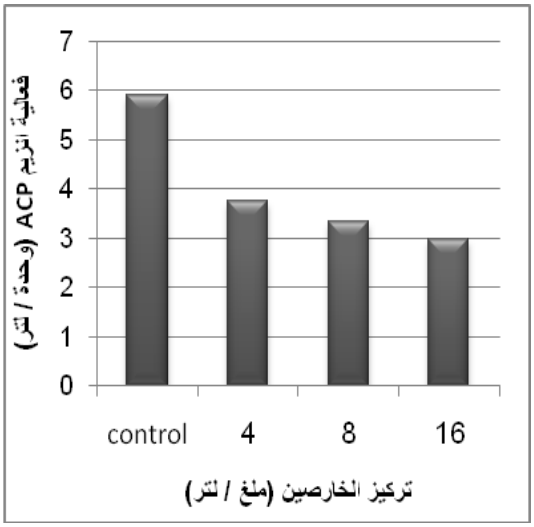
متوسط نشاط الإنزيم لدى حيوانات السيطرة 89.22U/ml وعند المعاملة الأولى 81U/ml وفي المعاملة الثانية 73.33U/ml وفي المعاملة الثالثة 57.33U/ml (الشكل 6) .



شكل (6): تأثير الخارصين على فعالية إنزيم GPT

تأثير الخارصين على فعالية إنزيم ACP

بينت نتائج الدراسة الحالية بان لعنصر الخارصين تأثير في الجوانب الوظيفية، حيث لوحظ انخفاض معنوي لفعالية الإنزيم بعد أسبوع من التعريض لتراكيز الخارصين المختلفة، إذ بلغ متوسط نشاط الإنزيم لدى حيوانات السيطرة 5.922U/L وفي المعاملة الأولى 3.77U/L وفي المعاملة الثانية 3.342U/L وفي المعاملة الثالثة 2.99U/L (الشكل 7) .

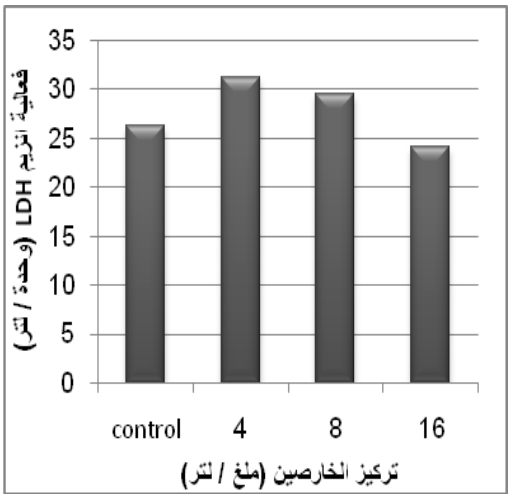


شكل (7): تأثير الخارصين على فعالية إنزيم ACP

تأثير الخارصين على فعالية إنزيم LDH

إن لعنصر الخارصين تأثير على فعالية إنزيم LDH، فقد اظهر التحليل الإحصائي وجود اختلافات معنوية بين حيوانات السيطرة والمعاملات الثلاثة لعنصر الخارصين، حيث

بلغ متوسط فعالية الإنزيم في حيوانات السيطرة 26.4U/L وفي المعاملة الأولى 31.31U/L وفي المعاملة الثانية 29.58U/L وفي المعاملة الثالثة 24.23U/L (الشكل 8) .



شكل (8): تأثير الخارصين على فعالية إنزيم LDH

المناقشة

الحيوانات التي تتناول الماء الملوث أو تعيش فيه لها القابلية على تجميع العناصر الملوثة ومنها الخارصين، وكميات الخارصين المتراكمة في أجسام هذه الكائنات الحية تعتمد على عدة عوامل منها تركيز الخارصين ومدة التعريض (Elie *et al.*, 2006 و Prasad *et al.*, 2006).

بالرغم من عدم إمكانيتنا على تقدير كمية الخارصين في الحيوان إلا انه من المتوقع إن تكون هناك تراكمات في جسم المحار مما أدى إلى حدوث تغيرات في كمية البروتينات وفعالية الإنزيمات . نلاحظ في هذه الدراسة لم يحصل تغير نوعي للبروتينات إثناء إجراء الترحيل الكهربائي على الهلام المتعدد الاكريلامايد، بينما ظهرت تغيرات مهمة في كمية البروتينات الكلية في مستخلص الحيوان، وكانت الزيادة مطردة مع زيادة تركيز الخارصين إثناء التعريض. وهذا يتفق مع (Lebedeva *et al.*, 2002) إذ لوحظ تغير كمية البروتينات الكلية في السمكة *Cyprinus carpio* عند تعرضها للخارصين وخلاف لما جاء في (Ovie and Oghoghene 2008) في دراسة تأثير الخارصين على الأسماك. إن عدم وجود تغيرات نوعية للحزم البروتينية على الهلام المتعدد الاكريلامايد قد يعود إلى قلة تركيز البروتينات (ولم تظهرعند صبغها) أو أنها لم تفصل على هلام متعدد الاكريلامايد (7.5%) المستخدم لصغر أو كبر وزنها الجزيئي أو إن التراكيز 4 و8 و 16 ملغم خارصين/لتر ماء

اقل من إن تحدث تأثيرات على الجينات المسؤولة عن إنتاج البروتينات وهذا ما أشار إليه (Marie *et al.*, 2006) في نفس الحيوان.

تعد الإنزيمات المختلفة واحدة من الطرائق الحساسة للتغيرات غير الطبيعية التي تحدث في الوظائف الخلوية للعديد من الحالات المرضية (Leatherland & Woo, 1998). من خلال ملاحظة نتائج الترحيل الكهربائي لإنزيم الاستريز فقد كان للخارصين تأثير واضح على كثافة حزم إنزيم الاستريز فكلما زاد تركيز الخارصين زادت كثافة الحزم، يمكن تفسير ذلك باستجابة هذا الأنزيم لوجود هذا العنصر بكميات تفوق المستوى الطبيعي في جسم الحيوان . لقد أجريت العديد من الدراسات حول حساسية هذا الأنزيم إلى الملوثات المختلفة وعكست النتائج استجابات متباينة بين التثبيط والتنشيط مثل تسبب الكادميوم في اختفاء حزم وظهور حزم جديدة في الحيوان بطني الأقدام *Littorin littorea* بسبب الارتباط مباشرةً (Mazon *et al.* 1998). كما لوحظ هذا التباين في الاستجابة في ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* عند تعريضها إلى الكادميوم (الدراجي ،2006).

لقد بينت العديد من الدراسات إن الخارصين مهم لفعالية الفوسفاتيز القاعدي وان زوجاً واحداً من ايونات هذا العنصر ضرورية لهذه الفعالية، لذلك فان غياب أو زيادة تركيز الخارصين قد تسبب تغيرات في فعالية الإنزيم (Kimura, 1993). اظهر الفوسفاتيز القاعدي زيادة في نشاطه في حيوان *D. polymorpha* عند تعريض الأخير إلى المستويات الواطئة والمتوسطة نسبياً من الخارصين. إما عند تعريض المحار إلى المستوى الأعلى من تركيز الخارصين فان نشاط الإنزيم لم يظهر تغيرا مهما. خلاف هذه النتائج لوحظت في الجهاز العصبي لسرطان الماء المعرض للخارصين (Senthilkumar *et al.*, 2007). قد يكون سبب الارتفاع في فعالية الانزيم عند بالتراكيز الواطئة والمتوسطة هو من اجل المساهمة في إصلاح الأنسجة المحطمة فالخارصين مكون مهم لصناعة الإنزيم.

إما الإنزيمين الناقلين للامين GOT وGPT فقد اظهرا اختلافاً فيما بينهما حيث ارتفع نشاط الإنزيم الأول وانخفض نشاط الإنزيم الثاني عند زيادة تركيز الخارصين في المحيط. وهذه النتيجة تطابق ما لوحظ في القواقع المعرضة للنحاس بتراكيز مختلفة (Masola, 1996). إن هذه الزيادة في فعالية إنزيم GOT قد تكون نتيجة للاستجابة الوظيفية الخارصين حيث يتم صناعة إنزيمات جديدة لإعادة إصلاح الأنسجة المحطمة. من جانب أخر اظهر GPT انخفاضاً حيث إن هذا الانخفاض في فعالية الإنزيم قد يكون بسبب الارتباط المباشر للخارصين مع الإنزيم أو ربما بسبب التأثيرات السامة في الأنسجة والتي تؤدي إلى انخفاض صناعة الإنزيمات .

اظهر الفوسفاتيز الحامضي انخفاضاً في نشاطه عند جميع مستويات التعريض للخارصين مقارنة بذلك الملاحظ في حيوانات السيطرة، كما إن وجود الخارصين في مركز نشاط الفوسفاتيز القاعدي ذو أهمية في نشاطه فان وجود المنغنيز في مركز نشاط الفوسفاتيز الحامضي أيضاً له نفس الأهمية لذا فان احتمالية استبدال الخارصين بالمنغنيز قد سببت هذا الانخفاض في نشاط الإنزيم كما هي الحال في دماغ والعقد العصبية لسرطان البحر (Senthilkumar *et al.* , 2007) .

اظهرت النتائج إن فعالية إنزيم LDH قد تأثرت بعنصر الخارصين حيث ارتفعت فعاليته عند التعريض للتراكيز الواطئة والمتوسطة من الخارصين إلا إن زيادة الأخير أدت إلى نقصان فعالية الإنزيم إلى مستوى اقل مما هو عليه في حيوانات السيطرة، لوحظت هذه مثل هذه النتائج في المحار المعرض إلى النحاس (Antognelli *et al.*, 2006). يعتقد إن الخارصين قد سبب تحطم الطبقة الطلائية للغلاصم وبذلك تقل فعاليتها لأخذ الأوكسجين فتقل كمية الأوكسجين في الأعضاء المهمة حيوياً وهكذا فأن عدم وجود الأوكسجين يزيد من فعالية إنزيم LDH (Valarmathi & Azariah, 2003). إما الانخفاض بفعالية الأنزيم عند التراكيز العالية من الخارصين ربما يكون سبب ذلك تحطم المايتوكوندريا نتيجة سمية الخارصين أو تغير وظائف غشاء المايتوكوندريا لذلك تثبط فعالية إنزيم LDH (Valarmathi & Azariah, 2003).

References

- Antognelli, C.; Baldracchini, F.; Frosini, R.; Piazzoli, A.; Talesa, V. and Giovannini, E. (2006): Effects of exposure to sublethal copper concentrationon glyoxalase system enzymes in specimens of *Scapharca inaequivalvis*. Biochemical. Systematics and Ecology, Vol.34, 275-281pp .
- Cho, Y.; Lomeda, R. R.; Ryu, S.; Sohn, H.; Beattie, J. H. and Kwun, I. (2007): Zinc deficiency negatively effects alkaline phosphatase and concentration of Ca, Mg and P in rat. Nutrition Research and practice. Vol.2, pp.113-119.
- Elie, A. C.; Dorr, A. J. M. Prearo and Abete, M. C. (2007): Seasonal effects on the antioxidant response and metal accumulation *Dreissena polymorpha* . Springer, vol.2, pp.613-623.
- Elumalia, M.; Antunes, C. and Guilhermino, L. (2006): Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus means* from the Minho river

estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury. Chemosphere. Vol.66, pp.1249-1255.

- FAO. (1977): Manual of methods in aquatic environment research, part 4 Bass for Selecting biological tests to evaluate marine pollution. FAO. Fish Tech. Pap. no.164, 31pp.
- Kaplan, L. and Pesce, A. (1989): Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation. Second edition. Mosby Company. United State of America.
- Kimura, E. (1993): Roles of zinc(l1) ion in zinc enzymes. Pure and Appl. Chem., Vol. 65, No.3, pp.355-359.
- Leatherland, J. F. and Woo, P.T. K. (1998): Fish disease and disorders. Vol2. Non- infection disorder. CABI. USA. UK. Pp.1-379.
- Lebedeva, N.; Vosyliene, M. Z. and Golovkina, T. (2002): The effect of toxic and heliophysical factors on the biochemical parameters of the external mucus of carp, (*Cyprinus carpio* L.) Arch. Pol. Fish. Vol.10, pp.5-14 .
- Marie, V.; Gonzalz, P. Baudrimont, M.; boudrineaud. J. and Boudou, A. (2006): Metallothionin response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *corbicula fluminea*. Biometal. Vol.19, pp.399-407.
- Masola, B.; Chibi, M.; Naik, Y. S.; Kandare, E. and Zaranyika, M. F (1996): Activities of glutamate dehydrogenase and aspartate and alanine aminotransferases in freshwater snails *Helisoma duryi* and *Lymnaea natalensis* exposed to copper. Biomarker, vol.8, pp.33-42.
- Mazon, L. I.; Gonzlez, G.; Vicario, A.; Estomba, A. and Aguirre, A. (1998): Inhibition of estrases in marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium. Ecotoxicol. Environ. Vol.41, pp.284-287.
- Ovie, K. S. and Oghoghene, U. E. (2008): Sublethal haematological effects of zinc on the freshwater fish, *Heteroclarias* sp. (Osteichthyes : Clariidae). African Journal of Biotechnology. Vol.7, pp.2068-2073.
- Prasad, M.N. V.; Sajwan. K. S. and Naidu, R. (2006): Trace elements in the environment. Taylor and Francis. USA. Pp.1- 689.

- Senthilkumar, P.; Samyappan, K.; Jayakumar, S. and Deecaraman. (2007): Effect of Heavy metal zinc on the neurosecretory cells of a freshwater field crab, *Spiralothelphusa hydroma*. Journal of Applied Science Research, vol.3, pp.1609-1614.
- Soto, M. ; Marigomez, I. and Cancio, I. (2004): Biological aspects of metal accumulation and storage. University of Basque. Basque. 644.
- Thaker, A. A. and Haritos, A. A. (1991): Mercury bioaccumulation and effects on soluble peptides, proteins and enzymes in hepatopancreas of the shrimp *Callianassa tyrrhena*. MAP Technical Reports Series, vol.48, pp.79-88.
- Tietz, N.W. (1995): Clinical guide to laboratory Tests. W. B. Saunders Co. Philadelphia. pp.271-285.
- Valarmathi, S. and Azariah , J. (2003): Effect of Copper Chloride on the Enzyme Activities of the Crab *Sesarma quadratum* (Fabricius). Vol.27, pp.253-257 .
- Wang, B.; Feng, Wang, T.; Jia, G.; Wang, M. ; shi, J.; Zhang, F.; Zhao, Y. and Chai, Z. (2006): Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in health adult mice. Toxicology Letters. Vol.161, pp.115-123.
- Wooton, I. D. P. (1964): Microanalysis in medical biochemistry. J. Churchill 1td. 104 Glauster place, London.
- Yousef, M. I.; El-Hendy, H.A.; El-Demerdash, F. M. and Elagamy, E. I.(2002): Dietary zinc deficiency induced changes in the activity of enzymes and the level of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. Toxicology. Vol.175, pp.223-234.

المصادر

الدراجي، هنادي عبد الاله عبد الرزاق (2006): دراسة بعض الجوانب الفسلجية لأطوار نمو ذبابة الفاكهة وتأثير الكادميوم عليها. رسالة ماجستير. كلية العلوم – جامعة الانبار.

Effect of Zinc Exposure on Protein and Activity of Enzymes of Freshwater Mussel Dreissena Polymorpha

Abid A. Thaker **Ahmad S. Farhan**
Department of Biology, College of Science_ University of Al-Anbar
Received:٣/١١/٢٠١٠, Accepted:19/6/2011

Abstract

Dreissena polymorpha mussel were collected from Al-Kadesia lake- Haditha /Al-Anbar Governorate-Iraq, between November 2008 and February 2009. The animals were exposed for 4, 8, and 8 mg zinc/L of water for 8 days. The soft tissue was analyzed for the effect of zinc on total protein components and activity of five enzymes (using colorimetric and /or electrophoretic methods).Zinc was found to cause (a) Change in the intensity of some esterase patterns and increase of total protein with increasing the concentration of zinc in the water (b) Increase in the activity of the enzymes, alkaline phosphatase (ALP), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and lactate dehydrogenase (LDH) and decrease in the activity of acid phosphatase (ACP) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) with increase of zinc concentration. These changes may be useful as an earlier indicator for water pollution with zinc .