تأثير النحاس على البروتينات والأنزيمات في الحيوان الرخوي *Dreissena polymorpha*

عبد علي ذاكر و احمد سامي فرحان

قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة الانبار

تأريخ القبول 2010/1/24

الخلاصة

تم تعريض الحيوان الرخوي *Dreissena polymorpha* إلى 1 و2 و4 ملغم نحاس/لتر ماء لفترة ثمانية أيام . استخدمت الكتلة الحية لمعرفة تأثير النحاس على البروتينيات الذائبة وفعالية ستة انزيمات (باستخدام الترحيل الكهربائي و/أو الطريقة اللونية). وجد بان النحاس قد سبب : (أ) تغير في كثافة بعض الحزم الالكتروفوريتية لإنزيم الاستريز وزيادة في كمية البروتين الكلي بازدياد تركيز النحاس في الماء (ب) زيادة في فعالية كل من الإنزيمين الناقلين للامينAST و ALT، كما إن التركيزين الأخيرين قد سببا انخفاضا في فعالية كل من الفوسفاتيز الحامضي والفوسفاتيز القاعدي ، إما إنزيم LDH فقد انخفضت فعاليته بسبب التعرض الى النحاس . إن هذا التباين في التأثيرات قد يكون مفيداً كدلالة على التلوث المائي المبكر بعنصر النحاس .

Effect of copper on soluble proteins and enzymes in freshwater mussel *Dreissena polymorpha* .

Abid A. Thaker and Ahmad S. Farhan

Department of Biology، College of Science، University of Al-Anbar

Summary

Dreissena polymorpha mussel were collected from Al-Kadesia lake - Haditha /Al-Anbar Governorate-Iraq. The animals were exposed to 1, 2 and 4 mg copper/l of water for eight days. The soft tissue was analyzed for the effect of copper on total protein components and activity of six enzymes (using colorimetric and /or electrophoretic methods). Copper was found to cause (a) Change in the intensity of some esterase patterns and increase of total protein by increasing the exposure time to copper (b) Increase in the activity of the enzymes, Aspartate amino transaminase (AST) and Alanine amino transaminase (ALT), and decrease in the activity of alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) . (c) Lactate dehydrogenase (LDH) activity was decreased after exposure to the metal. These changes may be useful as an early indicator for water pollution with copper .

المقدمة

يستخدم الحيوان الرخوي *Dreissena polymorpha* كمراقب حيوي في بيئات المياه العذبة وبصورة واسعة ، خاصة في دراسات التراكم الحيوي ، فمعدل الملوثات في أنسجته استعملت كمقياس للتعرض للملوثات الموجودة في المياه . كما وجد بان الملوثات تؤثر على الجوانب البايولوجية للحيوان مثل التناظر الجانبي للصدفة (1) ومعدل ترشيحه الغذاء (2) ومحتواه من البروتينات والبروتينات السكرية وفعالية بعض الإنزيمات كإنزيم Glutathione-s-transferase وإنزيم الكاتليز Catalase (3) . إن هذا الحيوان شأنه شأن الأحياء الأخرى يتأثر بتغيرات محيطه المائي وقدرته على تجميع معادن مختلفة ومنها النحاس (1) . يعد هذا العنصر (النحاس) من العناصر الأساسية في جسم الكائن الحي إذ يدخل في تركيب العديد من البروتينات التركيبية والوظيفية فهو مهم لعدد كبير من الأنزيمات كأنزيم Diamine oxidase وCytochrome C oxidase و Superoxide dismutase و Tyrosinase وبذلك فأنه يساهم في العمليات الايضية المهمة بالجسم وأهمها تحرير الطاقة وتفاعلات الأكسدة والاختزال كما إن تواجده بكميات مناسبة يعتبر ضروري لمناعة الجسم ، إلا أنه سام عند وجوده بتراكيز عالية في أنسجة الجسم (4) . ظهر إن للنحاس تأثير على عملية تخليق البروتينات مثل الميتالوثايونين والبروتينات التنفسية (في بعض الحيوانات) وبروتينات أخرى في مختلف الكائنات الحية كالأنزيمات وأي زيادة أو نقصان في تركيزه تقود إلى أثار سلبية في الكائن الحي (5) . كما وجد إن النحاس يسبب تغيرات في فعالية بعض الإنزيمات مثل الفوسفاتيز الحامضي (ACP) والفوسفاتيز القاعدي (ALP) في قنفذ البحر (6) والتأثير على فعالية إنزيمات AST و ALT في الجرذان (7) وإنزيمي LDH و G6PDH في سرطان الماء (8) .

الهدف من البحث متابعة بعض التغيرات الكيوحيوية في الحيوان اللافقري *D. polymorph* الذي جلب من بحيرة القادسية وتعريضه في المختبر إلى النحاس ، وإمكانية استخدام هذه التغيرات كمؤشر مبكر على تلوث المياه بهذا العنصر في البحيرة .

المواد وطرائق العمل

تم جمع الحيوانات من نوع *D. polymorpha* بأوزان متقاربة تراوحت بين 1.4 – 1.6 غم وبأطول تراوح بين 1.2 – 1.6 سم من بحيرة القادسية في حديثة (محافظة الانبار–العراق) 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 الغير سليمة (9) ، بعدها تم تعريض المحار إلى تراكيز مختلفة من النحاس بهيئة كبريتات النحاس ($CuSO_4$) المذابة في الماء حيث استعملت التراكيز 1 و 2 و 4 ملغم نحاس/ لتر ماء ولفترة ثمانية أيام رافق ذلك مجموعة سيطرة تحت نفس الظروف باستثناء وجود عنصر النحاس .

تشريح الحيوانات تحضير المستخلص

بعد انتهاء فترة التعريض قتلت الحيوانات بفصل المصراعين عن بعضهما ، واستؤصلت الكتلة الحية ووزنت ثم هرست باستعمال جهاز المجنس في محيط ثلجي بعد إضافة محلول Tris- HCl الدارئ 7.2 pH

بنسبة 5:1 وزن/حجم لدراسة المحتوى البروتيني وفعالية الإنزيمات ، وبنسبة 2:1 وزن/حجم لدراسة الحزم البروتينية وحزم إنزيم الاستريز . فصل المستخلص باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة ولمدة عشرة دقائق ، حيث اخذ الرائق وحفظ في −20 درجة مئوية لحين الاستخدام .

استخدمت طريقة بايوريت في تعيين كمية البروتين (10) . إما صبغ الحزم البروتينية وحزم إنزيم الاستريزبالصبغة الخاصة لكل منهما فقد جرى بعد الترحيل الكهربائي للنماذج على الهلام المتعدد الاكريلمايد العمودي (11) . تم حساب فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي بقياس الفينول المتحرر من المادة الأساس ، إما نشاط الإنزيمين الناقلين للامين ALT و AST فقد تم حسابه بمتابعة البايروفيت المتحرر (12) . قدرت فعالية كل من LDH وACP حسب ما ورد في (13).

تم استخدام البرنامج الاحصائي (Genstat Discovery (No.3 حيث شمل التحليل الاحصائي استخدام اختبار F test والمتوسط الحسابي والخطأ القياسي (14).

النتائج

تأثير النحاس على الحزم البروتينية وحزم أنزيم الاستريز المرحلة كهربائياً

باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي على الهلام المتعدد الاكريلمايد وجد إن النحاس لم يسبب إي تغيرات كمية او نوعية في حزم البروتينات (شكل1) . إلا إنه تأثرت كثافة الحزم الالكتروفوريتية لإنزيم الاستريز حيث ازدادت بزيادة تركيز النحاس (شكل2) ولم تظهر تغيرات نوعية .

تأثير النحاس على كمية البروتين الكلية

تم تقدير محتوى البروتين الكلي الذائب في مستخلص المحار ولوحظ إن عنصر النحاس سبب ارتفاع معنوي ($p< 0.05$)، حيث يزداد ارتفاع كمية البروتين الكلي كلما ازداد تركيز النحاس ، إذ بلغ متوسط البروتينات الكلية لدى حيوانات السيطرة 0.817mg/dI والحيوانات المعرضة لتراكيز 1 و 2 و 4 ملغم نحاس/لتر ماء كان متوسط كمية البروتينات الكلية فيها 0.934، 0.887، 0.824 mg/dI على التوالي (شكل3) .

تأثير النحاس على فعالية إنزيم ALP

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن لعنصر النحاس تأثير في نشاط الإنزيم ، ولقد اظهر التحليل الإحصائي وجود اختلافات معنوية ($p< 0.05$) حيث بلغ متوسط فعالية الإنزيم في حيوانات السيطرة 6.028K.A.U/L والمعاملة الأولى 5.958K.A.U/L والمعاملة الثانية 5.342K.A.U/L والمعاملة الثالثة 4.121K.A.U/L (شكل4) .

تأثير النحاس على فعالية إنزيم AST

لغرض معرفة تأثير عنصر النحاس في الجوانب الوظيفية لمحار الدرسينا فقد تم تقدير نشاط إنزيم AST وأظهرت نتائج الدراسة بان هناك فروق معنوية ($p< 0.05$)، حيث بلغ متوسط نشاط الأنزيم في حيوانات

السيطرة 60U/ml وفي المعاملة الأولى 73U/ml وفي المعاملة الثانية 77.22U/ml وفي المعاملة الثالثة 81.21U/ml (شكل5) .

تأثير النحاس على فعالية إنزيم ALT

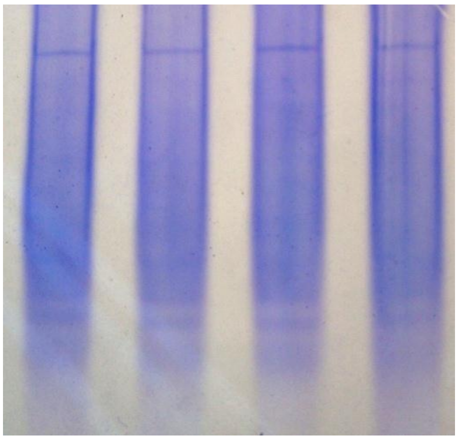
لقد تم دراسة تأثير النحاس على نشاط الإنزيم وقد بينت نتائج الدراسة الحالية بان هناك ارتفاعاً معنوياً بمستوى فعالية الإنزيم مقارنة بنماذج السيطرة ، إذ بلغ متوسط نشاط الإنزيم لدى حيوانات السيطرة 84.22U/ml وعند المعاملة الأولى 86.22U/ml وفي المعاملة الثانية 92.11U/ml وفي المعاملة الثالثة 97.56U/ml (شكل6) .

تأثير النحاس على فعالية إنزيم ACP

بينت نتائج الدراسة الحالية بان لعنصر النحاس تأثير في الجوانب الوظيفية ، حيث لوحظ انخفاض معنوي لفعالية الإنزيم بعد أسبوع من التعريض لتراكيز النحاس المختلفة ، إذ بلغ متوسط نشاط الإنزيم لدى حيوانات السيطرة 5.65U/L وفي المعاملة الأولى 5.557U/L وفي المعاملة الثانية 4.828U/L وفي المعاملة الثالثة 4.292U/L (شكل7) .

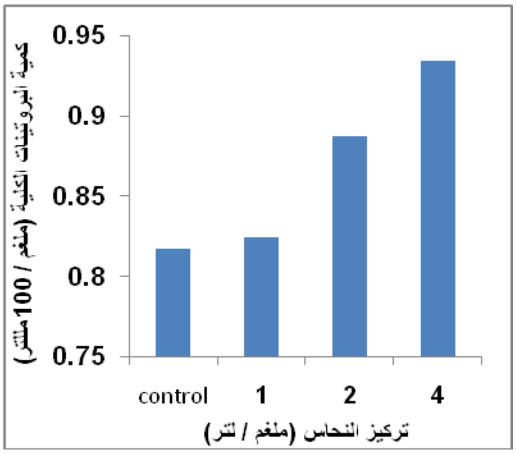
تأثير النحاس على فعالية إنزيم LDH

إن لعنصر النحاس تأثير على فعالية إنزيم LDH عند تعرض الحيوان لتراكيز مختلفة منه ، فقد أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود انخفاضاً معنوياً بفعالية الإنزيم نتيجة المعاملات الثلاثة لهذا العنصر ، حيث بلغ متوسط فعالية الإنزيم في حيوانات السيطرة 27.88 وحدة/لتر وفي المعاملة الأولى 21.28 وحدة/لتر والمعاملة الثانية 21.28 وحدة/لتر والمعاملة الثالثة 20.38 وحدة/لتر (شكل8) .

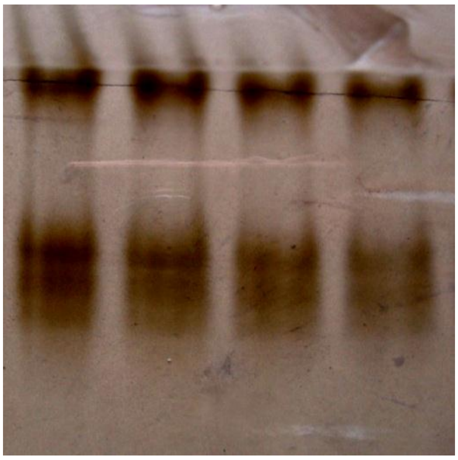


السيطرة   1 ملغم/لتر   2 ملغم/لتر   4 ملغم/لتر

شكل (1) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على الحزم البروتينية في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا

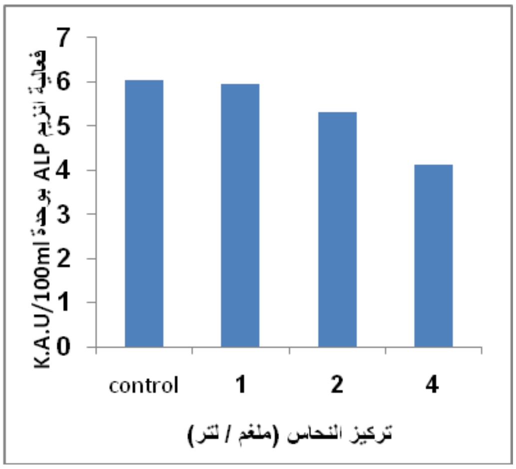


شكل (3) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على كمية البروتين الكلي الذائب في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا

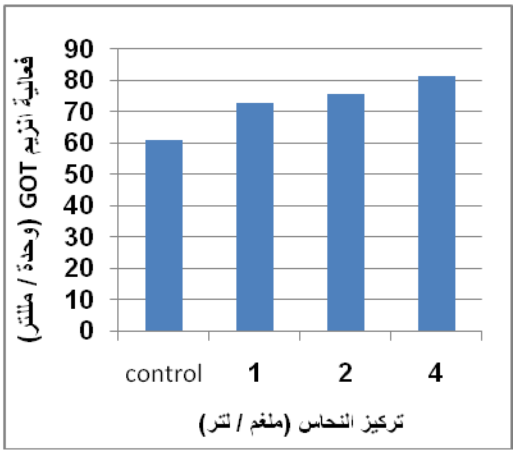


السيطرة   1 ملغم/لتر   2 ملغم/لتر   4 ملغم/لتر

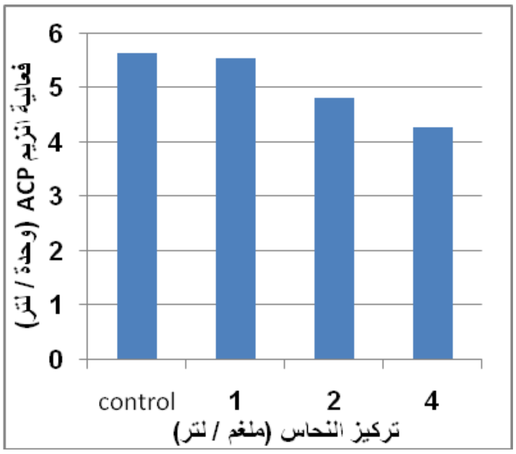
شكل (2) تأثير عنصر النحاس بتراكيز مختلفة على حزم إنزيم الاستريز في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا



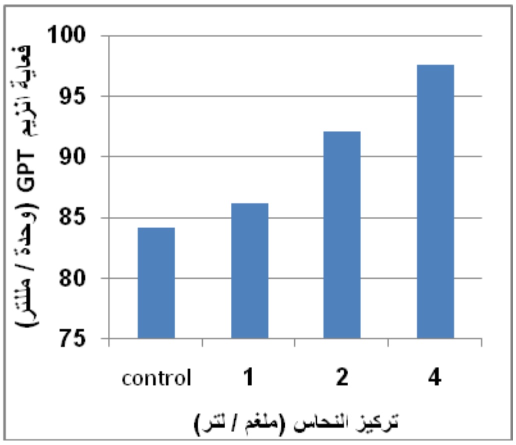
شكل (4) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على فعالية إنزيم ALP في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا



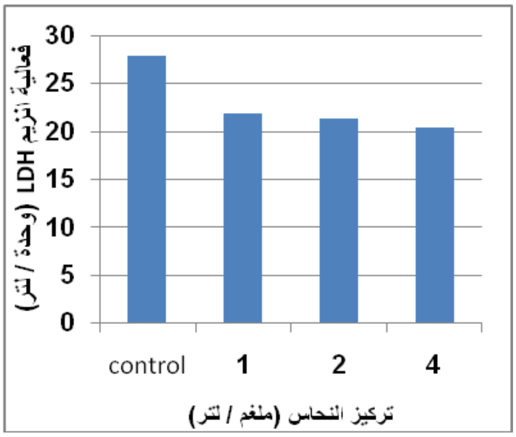
شكل (5) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على فعالية إنزيم AST في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا



شكل (7) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على فعالية إنزيم ACP في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا



شكل (6) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على فعالية إنزيم ALT في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا



شكل (8) تأثير النحاس بتراكيز مختلفة على فعالية إنزيم LDH في الكتلة الحية لحيوان الدرسينا

المناقشة

الحيوانات التي تتناول الماء الملوث أو تعيش فيه لها القابلية على تجميع العناصر الملوثة ومنها النحاس ، وكميات النحاس المتراكمة في أجسام هذه الكائنات الحية تعتمد على عدة عوامل منها تركيز النحاس ومدة التعريض له (15) .

بالرغم من عدم تقدير كمية النحاس في جسم الحيوان (لعدم توفر الإمكانيات) إلا انه من المتوقع إن تكون هناك تراكمات 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 حدثت تغيرات مهمة في كمية البروتين الكلية في مستخلص الحيوان وكانت الزيادة مطردة مع زيادة تركيز النحاس في المحيط المائي. وهذا يتفق مع ما وجد في السمكة *Mugil seheli* عند تعرضها للنحاس (16) يختلف عما جاء في في دراسة تأثير النحاس على سمكة المياه العذبة *Esomus danricus* عند تعرضها إلى نفس

العنصر (17) . إن عدم وجود تغيرات نوعية للحزم البروتينية على الهلام المتعدد الاكريلامايد قد يعود إلى ان تركيز النحاس المتراكم في الجسم اقل من إن يحدث تأثيرات على الجينات المسؤولة عن إنتاج البروتينات (6) .

تعد الإنزيمات المختلفة واحدة من الطرائق الحساسة للتغيرات غير الطبيعية التي تحدث في الوظائف الخلوية للعديد من الحالات المرضية (17) . من خلال ملاحظة نتائج الترحيل الكهربائي لإنزيم الاستريز فقد كان للنحاس تأثير واضح على كثافة حزم إنزيم الاستريز فكلما زاد تركيز النحاس زادت كثافة الحزم ، وقد 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* (18) . كما لوحظ هذا التباين في الاستجابة في ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* عند تعريضها إلى الكادميوم (19) .

لقد بينت العديد من الدراسات إن الخارصين مهم لفعالية الفوسفاتيز القاعدي وان زوجاً واحداً ضروري لهذه الفعالية ، لذلك فان غياب أو زيادة تركيز النحاس قد تسبب تغيرات في فعالية الإنزيم (20) . إن تعرض حيوان الدراسة للنحاس يؤدي إلى انخفاض فعالية إنزيم ALP تدريجياً مع زيادة تركيز النحاس . إن الانخفاض في فعالية هذا الأنزيم ربما يعود إلى أحلال النحاس محل الأيونات المهمة للفعالية (الخارصين) (21) . لوحظ مثل هذا الانخفاض في سرطان المياه العذبة *Spiralothelphusa hydrodroma* المعرض للخارصين في الخلايا الإفرازية العصبية والدماغ والعقدة العصبية الصدرية وساق العين (8) .

إما الإنزيمين الناقلين للامين AST و ALT فقد اظهرا ارتفعاً بنشاطيهما عند زيادة تركيز النحاس في المحيط . وهذه النتيجة تطابق ما لوحظ في القواقع المعرضة للنحاس بتراكيز مختلفة (22) . إن هذه الزيادة في إنزيم AST و ALT قد يعود الى تاثير النحاس على الوظائف الحيوية لبعض الانسجة .

اظهر الفوسفاتيز الحامضي انخفاضاً في نشاطه عند جميع مستويات التعريض للنحاس 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 النحاس بالمنغنيز قد سببت هذا الانخفاض في نشاط الإنزيم كما هي الحال في نوع الاوالي *Tetrahymena pyriformis* عند تعرضه للنحاس (23) .

إن النتائج تبين إن فعالية إنزيم LDH قد تأثرت بعنصر النحاس حيث لوحظ انخفاض فعالية إنزيم LDH عند التعرض للنحاس بتراكيز مختلفة . ربما يكون سبب ذلك تحطم المايتوكوندريا نتيجة سمية النحاس أو تغير وظائف غشاء المايتوكوندريا لذلك تثبط فعالية هذا الانزيم (24) . لوحظ مثل هذا الانخفاض عند تعرض المحار *Lamellidens marginalis* إلى النحاس (25) .

المصادر

1- Voets J Talloen W Tender D Dongen SV Coaci A Blust R and Bervoets L (2006). Microcontaminant accumulation , physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminanted surface waters. J Aquat Tox. 79:213-225.
2- Kraak MH S Toussaint M Lavy D and Davids C (1994). Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *D. polymorpha* . Environ Pol. 84 : 139-143.
3- Contardo-Jara V and Wiegand C (2008). Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. J Env Pol. 155:182-189.
4- Reilly C (2004) . The nutritional trace metals . Blackwell publishing . Australia,82-130.
5- Solomon E I Penfield K W and Wilcox DE (1983) . Copper , Molybdenum and Vanadium in Biological system , Active site in copper proteins an electronic structure overview . Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany 5-144 .
6- Durkina VB and Evtushenko Z S (1991) . Changes in activity of certain enzymes in sea urchin embryos and larvae after exposure of adult organisms to heavy metals. Marine Ecology Progress Series Mar. Ecol Prog Ser 72 : 111-115.
7- Atta A H Fathy S Gohar M Reem Jan R Kamel G Mouneir SM and Nasr SM (2009) . Prolonged administration of high doses of copper nicotinate to rats: Effect on biochemical and cellular constituents of blood and on copper level in serum, liver and muscle . Int J Med Med Sci. 1 : 178-183 .
8- SenthilKumar P Samyappan K Jayakumar S and Deecaraman M (2007) . Effect of Heavy Metal Zinc on the Neurosecretory Cells of a Freshwater Field Crab, *Spiralothelphusa hydrodroma*. J Appl.Sciences Res. 3: 1609-1614 .
9- 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.
10- Kaplan L and Pesce A (1989) . Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation. Second edition. Mosby Company. United State of America.
11- Thaker AA and Haritos AA (1991). Mercury bioaccumulation and effects on soluble peptides, proteins and enzymes in hepatopancreas of the shrimp *Callianassa tyrrhena*. MAP Technic. Rep Series. 48 : 79-88.
12- Wooton IDP (1964). In:-Microanalysis in Medical Biochemistry. Jand A.Churchill Ltd. 104 Glauster place London.pp. 101-115.
13- Tietz NW (1995). Clinical guide to laboratory Tests. W B Saunders Co. Philadelphia. pp. 271-285.
14- Indrayan A (2008) . Medical biostatics . (2nd ed.) . Chapman and Hall/CRC Publisher . Delhi .

15- Prasad MN V Sajwan K S and Naidu R (2006). Trace elements in the environment. Taylor and Francis. USA 66- 489pp.
16- Abou EL-Naga E H EL-Moselhy K M. and Hamed M A. (2005) . Toxicity of cadmium and copper and their effect on some biochemical parameters of marine fish *Mugil seheli* . Egyp J Aquat Res. 31 : 60-71 .

17- Vutukuru SS; Suma C Madhavi K Juveria J Pauleena JS Rao JV and Anjaneyulu Y (2005) . Studies on the Development of Potential Biomarkers for Rapid Assessment of Copper Toxicity to Freshwater Fish using *Esomus danricus* as Model . *Int J Environ. Re. Public Health* **.** *2* : 63-73 .

18- Mazon LI Gonzlez G Vicario A Estomba A and Aguirre A (1998) . Inhibition of estrases in marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium . Ecotoxicol. Environ. 41 : 284-287.

19- الدراجي , هنادي عبد الاله عبد الرزاق (2006) . دراسة بعض الجوانب الفسلجية لأطوار نمو ذبابة الفاكهة وتأثير الكادميوم عليها . كلية العلوم – جامعة الانبار .

20- Kimura E (1993) . Roles of zinc(II) ion in zinc enzymes . Pure and Appl. Chem., Vol 65, No. 3, 355-359pp.
21- Applebury ML Johnson BP and Coleman JE (1970) . Phosphate binding to alkaline phosphatase . metal Ion Dependence . J Biol Chem. 245 : 4968-4976 .
22- Masola B Chibi M Naik YS 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, 8 : 33-42 .
23- Nicolau A Mota Mand Lima M (2004). Effect of different toxic compoundson ATP content and acid phosphatase activity in axenic cultures of *Tetrahymena pyriformis* . Ecotoxicol. Environ.Safet. 57 : 129–135 .
24- Carvalho CS and Fernandes M N (2008) . Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus* . Comp. Biochem. Physiol. Part A 151 : 437–442 .
25- Satyaparameshwar K Ravinder RT and Vijay KN (2005). Study of carbohydrate metabolism in selected tissues of freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* under copper sulphate toxicity. J Env Bio. 27: 39-4.