

אוניברסיטת תל-אביב  
הפקולטה למדעי החיים ע"ש ג'ורג' ס. ויז  
המדרשה לתארים מתקדמים

**אינדוקצית הציטוכרומים P4501A ו-P4502E-like**  
**ופעילות אצטילכולינאסטרז בדגי גרם כסמנים ביולוגיים**  
**לניטור זיהום נחל הירקון**

חיבור זה הוגש כעבודת גמר לקראת התואר "מוסמך אוניברסיטה"  
במסלול לאקולוגיה ואיכות הסביבה באוניברסיטת תל אביב

אוניברסיטת תל אביב  
מחלקת ביולוגיה

על-ידי

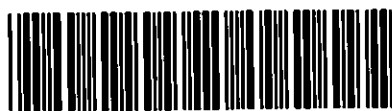
אורי פלביץ

העבודה הוכנה במסגרת המחלקה לזואולוגיה של אוניברסיטת תל-אביב  
המכון לחקר שמירת הטבע

בהנחיית

ד"ר עמינדב יעבץ

מרץ 2002



60513904

אוניברסיטת תל-אביב  
הפקולטה למדעי החיים ע"ש ג'ורג' ס. וייז  
המדרשה לתארים מתקדמים

**אינדוקצית הציטוכרומים P4501A ו- P4502E-like**  
**ופעילות אצטילכולינאסטרז בדגי גרם כסמנים ביולוגיים**  
**לניטור זיהום נחל הירקון**

חיבור זה הוגש כעבודת גמר לקראת התואר "מוסמך אוניברסיטה"  
במסלול לאקולוגיה ואיכות הסביבה באוניברסיטת תל אביב

על-ידי

אורי פלביץ'

העבודה הוכנה במסגרת המחלקה לזואולוגיה של אוניברסיטת תל-אביב  
המכון לחקר שמירת הטבע

בהנחיית

ד"ר עמינדב יעבץ

מרץ 2002

חתימת המנחה:

עבודה זו מוקדשת

לזכרו של

אבי האהוב, פרופסור דן (דש"ר) פלביץ' ז"ל

תודה מקרב לב, לכל אלה שעזרו תמכו וליוו אותי בעבודה זו:

לד"ר עמינדב יעבץ על הליווי, ההנחיה וההדרכה המקצועית.

לד"ר עופר מוקדי על הייעוץ והתמיכה.

לחברי המעבדה: איילה, רמי ואולגה על עזרתם.

תודה מיוחדת לנועם על שיתוף הפעולה ההדוק.

לפרויקטנטים: ברק, אסף ורותם על עבודתם המסורה.

לכל אנשי המכון לחקר שמירת הטבע על שיתוף הפעולה וההתעניינות.

לאנשי רשות נחל ירקון: דויד, רוזי, יוני, ופיליפ על הסיוע הרב.

לכל הדייגים המקצועיים והחובבים על תרומתם.

לחברי עודד ומשה, על התמיכה והעזרה לכל אורך הדרך.

למשפחתי היקרה על התמיכה הגורפת.

לענבר, אשתי האהובה, על הכל.


# תוכן העניינים

## תקציר עברי

### I. מבוא

1	1.1 סמנים ביולוגיים לזיהוי זיהום הסביבה המימית
1	1.2 מערכת ציטוכרום P450: תפקיד ומנגנון פעולה
7	1.3 תפקיד ציטוכרום b <sub>5</sub>
7	1.4 אבולוציה ונומנקלטורה של ציטוכרומי P450
9	1.5 בקרת הביטוי של ציטוכרומי P450
10	1.6 משפחות ציטוכרומי P450 בדגים
13	1.7 תת משפחת P4501A
15	1.8 תת משפחת P4502E
18	1.9 אצטילכולינאסטרז: תפקיד, מבנה ומנגנון פעולה
20	1.10 מנגנון עיכוב אצטילכולינאסטרז ע"י אורגנוזרחנים וקרובמטים
22	1.11 נחל הירקון
25	1.12 מטרות העבודה

### II. שיטות

26	 2.1 אתרי המחקר
28	2.2 חיות הניסוי
29	2.3 שיטות חשיפה של דגים למי הירקון ומקורותיו
31	2.4 חשיפה מבוקרת למזהמים המשרים אינדוקציה של ציטוכרומי P450
33	2.5 אנליזת פעילות האנזים אצטילכולינאסטרז
33	2.6 הכנת מיקרוזומים מן רקמת הכבד
34	2.7 תכולת חלבון כללית

34	2.8 קביעת תכולת ציטוכרום $b_5$
34	2.9 קביעת תכולת ציטוכרום P450
34	2.10 קביעת הפעילות הקטליטית EROD
35	2.11 קביעת תכולה ספציפית של ציטוכרומי P450 באמצעות נוגדנים
37	2.12 ניתוח סטטיסטי

### III. תוצאות

38	3.1 קביעת רמות רקע לסמנים הביוכימיים במיני דגי המחקר
38	3.1.1 קביעת רמות הרקע של פעילות האנזים אצטילכולינאסטרז
39	3.1.2 קביעת רמות הרקע של מערכת ציטוכרום P450 וציטוכרום $b_5$ בכבד
	3.2 ניסויי אינדוקציה של ציטוכרום P450 ועיכוב אצטילכולינאסטרז באמנון מכלוא
40	3.2.1 אינדוקציה P4501A באמצעות הזרקת $\beta$ -naphthoflavone
43	3.2.2 אינדוקציה P4501A באמצעות חשיפה ל- $\beta$ -naphthoflavone במים
45	3.2.3 אינדוקציה P4502E-like באמצעות ethanol ו-trichloroethylene
48	3.2.4 עיכוב אצטילכולינאסטרז באמצעות trichloroethylene
	3.3 ניטור שיירי תרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה בקטעי נחל הירקון המתוקים
50	3.3.1 דייג דגים מקומיים בירקון המתוק
55	3.3.2 חשיפת אמנוני מכלוא בכלובי רשת במאגר ראש העין ואתר שבע טחנות
57	3.3.3 חשיפת אמנוני מכלוא לדגימות מים מאתרים שונים בירקון
	3.4 ניטור תרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה בקטע הירקון המלוח
61	3.4.1 ניסוי אקלום דגי מים מתוקים למי ים
62	3.4.2 דייג קיפונים בירקון המלוח
66	3.4.3 חשיפת קיפונים בכלובי רשת במי הירקון המלוח
	3.5 ניטור איכות קולחי המוצא של מכוני טיהור השפכים המוזרמים לירקון
68	3.5.1 חשיפת אמנונים לדגימות מים ממכוני טיהור השפכים
69	3.5.2 מערכת ניטור ביולוגי בזרימה בצפיפה במכון טיהור השפכים ברמת השרון

## IV. דיון

- 74 4.1 סמנים ביולוגיים לניטור הסביבה האקווטית
- 75 4.2 קביעת רמות הרקע האנזימטיות בדגי המחקר
- 4.3 אינדוקציה של מערכת ציטוכרום P450 באמנון מכלוא
- 78 4.3.1 אינדוקציה ציטוכרום P4501A באמצעות  $\beta$ -naphthoflavone
- 81 4.3.2 אינדוקציה ציטוכרום P4502E-like
- 83 4.4 ניטור ביולוגי של מזהם המים trichloroethylene באמצעות פרופיל אצטילכולינאסטרז
- 4.5 ניטור שיירי תרכובות בעלות רעילות ביולוגית בנחל הירקון
- 84 4.5.1 ניטור מעלה הירקון
- 85 4.5.2 ניטור קטעו התיכון של הירקון
- 91 4.5.3 ניטור הירקון המלוח
- 94 4.5.4 ניטור איכות קולחי המוצא של מכוני טיהור השפכים המוזרמים לירקון
- 97 4.6 שיטות חשיפה שונות של דגים בניטור ביולוגי
- 98 4.7 התאמת מיני דגי המחקר לתוכניות ניטור ביולוגי

99

**סיכום**

**רשימת ספרות**

**תקציר באנגלית**

## תקציר

מערכות אקולוגיות אקוטיות נחשפות בעשרות השנים האחרונות, לאלפי סוגים חדשים של תרכובות מעשי ידי אדם. חדירתן של מגוון תרכובות בעלות פעילות רעילה לסביבה מאיימת על קיומם של אורגניזמים והמערכת האקולוגית כולה. בארץ, ההתפתחות המואצת של העיור והתעשייה באזור מישור החוף תרמו לזיהום נחלי החוף. הגדול שבהם, נחל הירקון, עובר במרכז האוכלוסייה הגדול בארץ וסובל קשות מפעילות האדם. פעילות זו כוללת שאיבה של עיקר מקורות מימיו השפירים, הזרמת שפכים וקולחים תעשייתיים וביתיים, ופעילות אורבנית, חקלאית ותעשייתית ערה באזור אגן הניקוז התורמות לזיהום נקודתי ודיפוזי המגיעים לנחל.

לשם ניטור זיהום מי הירקון בתרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה, נעשה שימוש במחקר הנוכחי בשני סמנים ביולוגיים בדגי גרם: 1. עיכוב פעילות אצטילכולינאסטרו (AChE), ברקמות המוח, הזימים והכבד, המשמש כאינדיקציה לחשיפה לחומרי הדברה מסוג אורגנוזרחנים וקרבתים. 2. אינדוקציה ציטוכרום P4501A בכבד והפעילות הקטליטית האופיינית לו-EROD. אנויים זה עובר אינדוקציה וסינתזה *de novo* בתגובה לחשיפה לתרכובות רעילות, מזהמות סביבה, כמו polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), ו-polychlorinated biphenyls (PCBs).

במחקר הנוכחי, נרכשו מחוות דגים מסחריות דגים ממינים שונים. כל קבוצת דגים הוגדרה כאסופה נפרדת. אסופות הדגים שימשו לניסויי מעבדה שכללו חשיפה לרעלים שונים או לדגימות מים שהובאו מאתרי דיגום בנחל. אסופות דגים אחרות נחשפו בכלובים בנחל הירקון עצמו. בנוסף, נדגמו מאתרים שונים מיני דגים מקומיים החיים באופן טבעי בנחל הירקון. אנליזה ביוכימית של הדגים השונים בוצעה במעבדה והממצאים הושו לממצאים מאתרי ייחוס הנחשבים נקיים יחסית או לקבוצות ביקורת.

דגי אמנון מכלוא (*Oreochromis niloticus x O. aureus*) נחשפו במעבדה לתרכובות שונות הידועות כמשרות סינתזה של ציטוכרומי P450 ספציפיים. לשם קבלת נתוני ייחוס לאינדוקציה ציטוכרום P4501A הוזרקו לחלל הבטן של הדגים מינונים שונים של  $\beta$ -naphthoflavone. החשיפה גרמה לאינדוקציה מובהקת ( $P < 0.001$ ) של תכולת P4501A ופעילותו הקטליטית EROD עם מתאם גבוה בניהם ( $r^2 = 0.76, P < 0.001$ ). תגובת האינדוקציה שנתקבלה נמצאה תלויה במנה (dose dependent) בקשר ליניארי חיובי ( $r^2 = 0.65, P < 0.001$ ).

במחקר הנוכחי, נבדקה האפשרות של שימוש באנויים P4502E1-like בדגים כסמן ביולוגי לזיהום הסביבה המימית בתרכובות קסנוביוטיות רעילות ומסרטנות כגון, nitrosamines וממסים אורגניים תעשייתיים. דגי אמנון מכלוא נחשפו למשרנים ידועים של P4502E1 ביונקים - ethanol והממס



האורגני (TCE) trichloroethylene. בכל הדוגמאות מניסויי החשיפה לרבות מיקרוזומי הביקורת התקבלה תגובה אימונוכימית עם נוגדן ל- P4502E1 מאדם, אך לטיפולים לא הייתה השפעה על רמת האינדוקציה. מיקרוזומים שהופקו מכבדי דגי קיפון טובר (*Liza ramada*), ודגי קרפיון מצוי (*Cyprinus carpio*) שנלכדו בירקון, ומדגי אמנון מכלוא שנחשפו ל-  $\beta$ -naphthoflavone לא הגיבו כלל עם אותו נוגדן. מנגד, נתקבלה תגובה משמעותית עם נוגדן לציטוכרום P4501A. ייתכן ועלייה בסינתזת P4501A גורמת לירידה בתכולת ציטוכרומים אחרים כגון, P4502E-like.

הממס התעשייתי TCE הוא מזהם מים בעל תכונות נירוטוקסיות הנפוץ בארץ ובעולם. חשיפת דגי אמנון מכלוא במשך שלושה ימים לריכוז קבוע של 5 ppm TCE במים גרמה לתסמינים של פגיעה עצבית ולבסוף למוות הדגים. באמנונים אלו נמצאה ירידה של 99% ו- 67%, בפעילות AChE בזימים ובמוח, בהתאמה. בפרטים נוספים שנחשפו לאותו פרק זמן לריכוז של 0.1 ppm TCE אובחן עיכוב מובהק ( $P < 0.01$ ) בפעילות AChE ברקמות הכבד, הזימים והמוח (99%, 95%, 58%, בהתאמה). על כל פנים, בניסיונות קינטיים *in vitro* שנעשו עם הומוגנט מזימי אמנון מכלוא, לא נמצא ש- TCE הנו מעכב של AChE.

מאגר מקורות בראש העין הוא מאגר מים שפירים הסמוך למקורות המים הטבעיים של הירקון, מעיינות ראש העין. בדגי אמנון מכלוא שנחשפו בכלוב *in situ* במי המאגר, הובחן עיכוב מובהק ( $P < 0.05$ ) בפעילות AChE ברקמות הזימים והמוח, לעומת דגי אסופת הדגים שלא עברו טיפול. תכולת ציטוכרום P4501A ופעילות EROD עלו פי 4.4 ( $P < 0.05$ ) ופי 2.3 ( $P < 0.05$ ), בהתאמה, בדגי הכלובים בהשוואה לדגי האסופה. באופן דומה, בדגי אמנון מכלוא שנחשפו לדגימות מים שהובאו מהמאגר, נמצא עיכוב מובהק של פעילות AChE במוח (40%, ובזימים 30%) ( $P < 0.05$ ) לעומת קבוצת הביקורת. פעילות EROD בדגים אלו עלתה פי 6.2 ( $P < 0.05$ ). ממצאי דגי קרפיון מצוי שנתפסו במאגר ראש העין הושוו לממצאים מקרפיונים שנלכדו במעלה הנחל (קטע הנחל ממאגר ראש העין ועד למפגש עם נחל קנה). תכולת ציטוכרום P4501A ופעילות EROD היו גבוהות בדגי ראש העין פי 8 ( $P < 0.001$ ) ופי 2 ( $P < 0.05$ ), בהתאמה. תוצאות אלו מצביעות על פגיעה באיכות המים של מאגר ראש העין. מאידך, הממצאים הביוכימיים מדגי הקרפיון שנלכדו במעלה הירקון משקפים איכות מים טובה בקטע זה, לפחות מבחינת נוכחות כימיקלים הידרוקרבוניים.

חשיפה של אמנוני מכלוא לדגימות מים ממעלה הקטע התיכון של נחל הירקון וספק המים העיקרי של קטע זה, מכון טיהור השפכים (מטי"ש) כבר סבא-הוד השרון, גרמה בדרך כלל למות הדגים בטווחי זמן של מספר שעות. על אף זמני החשיפה הקצרים נמצא בחלק מהמקרים, עיכוב מובהק בפעילות AChE בזימים ובמוח הדגים. במטי"ש רמת השרון, המזרים קולחים ברמה שלישונית לנחל הירקון, הותקנה מערכת זרימה רציפה, ובה נחשפו דגי אמנון מכלוא לתקופה של שלושים יום. כל הדגים נותרו בחיים בתום הניסוי. באמנונים אלו נמצא עיכוב של 75% ( $P < 0.01$ ) בפעילות

AChE ברקמת הזימים, אך לא נצפתה ירידה בפעילות במוח. אינדוקציה מובהקת של P4501A נמצאה באמנונים אלו ( $P < 0.01$ ), ובדגי אמנון מכלוא שנחשפו לדגימות מים מהמכון ( $P < 0.01$ ). הממצאים מראים שקולחי מכוני הטיהור כוללים שיירי קוטלי חרקים המגיעים אל הקטע התיכון. בקולחי רמת השרון הובחנה גם השפעתן של תרכובות הידרוקרבוניות רעילות.

סכר שבע טחנות הוא נקודת החיבור בין הקטע התיכון, המזוהם של הירקון לבין הירקון המלות. בחמישה מיני דגים שונים, שחיים באתר שבע טחנות באופן טבעי או שנחשפו *in situ* בכלוב, נכרה פגיעה מובהקת בפעילות AChE ברקמות הזימים והכבד. כך למשל, נרשמה ירידה בפעילות AChE בזימים (82%) ובכבד (94%) של דגי אמנון מצוי (*Tilapia zillii*). עלייה משמעותית באינדוקציה ציטוכרום P4501A, ביחס לאתרי ייחוס, נמצאה בשלושה מינים שנלכדו באתר שבע טחנות: אמנון גליל (*Sarotherodon galileus*), קיפון טובר וקרפיון מצוי (פי 42,  $P < 0.05$ ; פי 15,  $P < 0.001$ ); פי 13.5,  $P < 0.001$ , בהתאמה). קיפוני טובר שנידוגו בקטע המלות, בשתי הזדמנויות שונות, קרוב לשפך הנחל היו בעלי תכולת ציטוכרום P4501A גבוהים פי 12.5 ופי 19 ( $P < 0.001$ ) מדגי מדגה קיבוץ המעפיל. פעילות EROD באותם דגים עלתה אף היא במידה ניכרת ( $P < 0.001$ ).

לסיכום, אינדוקציה ציטוכרום P4501A ואנליזת פרופיל AChE בדגי גרם שנחשפו למי הירקון, משקפים חשיפה לתרכובות בעלות רעילות ביולוגית. ממצאי השימוש בסמנים ביולוגיים אלו, מצביעים על זיהום כרוני של קטעי הנחל התיכון והמלות, בשאריות חומרי הדברה אורגנוזורחנים וקרובמטים ושיירי פסולת תעשייתית רעילה. מכוני טיהור השפכים תורמים לזיהום הנחל בקוטלי חרקים ותרכובות נוספות בעלות רעילות ביולוגית חזקה. תוצאות העבודה מלמדות שמאגר ראש העין נחשף לפרקים לרמות נמוכות של חומרי הדברה ולרמות כרוניות של תרכובות הידרוקרבוניות רעילות. הממצאים מעוררים דאגה נוכח העובדה שמדובר בעודפי מי שתייה המגיעים מקידוחי ראש העין ומי המוביל הארצי, מקורות מים עיקריים של ישראל.

## 1. מבוא

### 1.1 סמנים ביולוגיים לזיהוי זיהום הסביבה המימית

תרכובות זרות (xenobiotics) ממקור טבעי ומעשה ידי אדם חודרות ומתפשטות במערכת האקולוגית האקוויטית במגוון דרכים: שפכים ישירים, נגר עילי, נשורת אטמוספרית, תנועה אביוטית וביוטית, ומעבר בשרשרת המזון (Livingstone, 1998). מגוון רחב של תרכובות קסנוביוטיות החודרות לסביבה האקוויטית הן בעלות רעילות פוטנציאלית, חלקן אף בעלות השפעות קרצינוגניות, מוטגניות וטרטוגניות (De Flora *et al.*, 1991). ריכוז החומרים ורמת זמינותם הביולוגית מכתיבים את רמות החשיפה שהאורגניזם חווה. רמות חשיפה אלו יקבעו את ההסתברות והעוצמה של ההשפעות הרעילות על האורגניזם (Newman, 1998).

ניטור ביולוגי משמש לבקרה והערכה של רמת החשיפה של הסביבה למזהמים. הקושי בהערכת ההשפעות של זיהום על רמות האוכלוסייה והחברה של אורגניזמים מימיים הביאו להצעה ששינויים בתגובות ביוכימיות/פיסילוגיות שונות עשויים להיות יעילים בחיזוי השפעת מזהמים (Payne *et al.*, 1987). הצורך בהתראה מוקדמת לגבי ההשפעה של זיהום סביבתי, בעיקר ריכוזים כרוניים נמוכים של תערובות חומרים, הוביל לפיתוח של סמנים ביולוגיים מולקולריים (Livingstone *et al.*, 1994). סמן ביולוגי מוגדר כמדידה המצביעה במונחים מולקולריים על נוכחות מזהמים/או השפעותיהם המזיקות/או אופן תגובת המאכסן (McCarthy and Shugart, 1990).

בעיקרון, סמנים ביולוגיים אשר מספקים מידע לגבי השפעותיהם הרעילות של כימיקלים על אורגניזמים יכולים לשפוך אור על האפקט הביולוגי המשולב של תערובות חומרים בסביבה נתונה. בעבודה זו נעשה שימוש בשני סמנים ביולוגיים: אינדוקציה ציטוכרומי P450 ופרופיל האנזים אצטילכולינאסטרז. אנזימים אלו נבדקו בדגי גרם אשר נחשפו באופנים שונים לשיירי תרכובות בעלות רעילות ביולוגית המצויות במי נחל הירקון. בהמשך המבוא, תובא סקירה לגבי עיקרון הפעולה של סמנים אלו ושימושם בעבודות ניטור הסביבה האקוויטית.

### 1.2 מערכת ציטוכרום P450: תפקיד ומנגנון פעולה

ציטוכרומי P450 מהווים על משפחה גדולה ורחבה של אנזימי heme-thiolate המקטלזים ריאקציות המשנות את המבנה של אלפי מולקולות אורגניות, עם השלכות קריטיות על בריאות ותפקוד האורגניזמים (Stegeman and Livingstone, 1998). אפשר לחלק את התפקיד הביולוגי

קבוצת הידרוקסיל של חומצה אמינית או מים (Goepfar *et al.*, 1995). השם "P450" מקורו בתכונות הספקטראליות של החלבון עוד בטרם היו ידועות תכונותיו הקטליטיות. Omura and Sato (1964) טבעו לראשונה את המונח P450 עקב אופי הבליעה של הפיגמנט, שמגיע לשיאו באורך גל של 450 nm כאשר הוא מחוזר וקשור לחד תחמוצת הפחמן. תכונה ייחודית זו נובעת מנוכחותו של הליגנד הציסטאני מהחלבון הקשור לברזל ה-heme בעמדת *trans* לליגנד CO (Mansuy, 1998).

ציטוכרומי P450 מקטלזים בעיקר ריאקציות חימצון של תרכובות שומניות. הציטוכרום מכניס שני אלקטרונים למולקולת חמצן אטמוספירית שהומסה בציטופלסמה ושובר אותה לשני חמצנים אטומים. האטום שנושא את זוג האלקטרונים, מחוזר למים ואילו החמצן האטומי השני הוא בעל תכונות אלקטרופיליות ומחפש זוג אלקטרונים חופשי בסובסטרט כדי לחמצן אותו.

הריאקציה הכללית העיקרית המקוטלת בידי ציטוכרום P450 נכתבת כך :



כאשר הסובסטרט (R) הנו תרכובת בעלת שייר כמו *alkene*, *alkane*, טבעת הטרופיקלית או ארומטית היכולים לשמש כאתר לחמצון. תהליך זה קרוי מונואוקסיגנציה מאחר ורק אחד מאטומי החמצן עובר אינקורפורציה לסובסטרט בעוד שהשני מחוזר למים. ההוספה של קבוצת OH גורמת לתרכובת להיות יותר קוטבית ולכן מסיסה יותר בסביבה המימית של התא ו/ או חשובה יותר להתקפה בידי אנזימי דטוקסיפיקציה נוספים (Okita and Siler-Masters, 1997).

ציטוכרומי P450 מקטלזים ריאקציות אוקסידטיביות מסוגים שונים בהן הידרוקסילציה, אפוקסידציה, דאלקילציה ועוד (Guengerich and Shimada, 1991). סוגים מסוימים של ציטוכרומי P450 מבצעים קטליזות נוספות, השונות מהעברת אטום חמצן. כך למשל, ישנן ריאקציות חימצון שבהן מעורב ניתוק של קשר C-C או C=N, או ריאקציות חיזור כמו דהידרציה, דהידרוגנציה, ואיזומרציה (Goepfar *et al.*, 1995; Mansuy, 1998). בטבלה 1.1 מסוכם מגוון הריאקציות שמבצעים אנזימי P450 עם דוגמאות לסובסטרטים עיקריים.

**Table 1.1: Reactions types catalyzed by cytochromes P450 and typical substrates:**

<b>Reaction type</b>	<b>Prominent substrates</b>
<b>Monooxygenations:</b>	
Aliphatic hydroxylation	Pentobarbital, n-propylbenzen, n-hexane
Aromatic hydroxylation	PAHs
Epoxidation	Benzene, benzo[a]pyrene
N-dealkylation	Dialkylnitrosamine, aminopyrine, ethylmorphine, dinitriamine
O-dealkylation	7-ethoxy resorufine, 7-ethoxy coumarine
S-dealkylation	Thioesters, methylmercaptan
Oxidative deamination	Amphetamine, arginine
N-oxidation	Phosphoramidates, aniline, 2-acetylaminofluorene
S-oxidation	Phosphorolates, chlorpromazine
Oxydative desulfuration	Phosphorothionates: e.g. parathion, chlorpyrifos
Dechlorination	CCl <sub>4</sub>
Oxidative dehalogenation	Halothane
Reductive dehalogenation	Hexachlorobenzene
Alcohol oxidation	Ethanol, acetone
<b>Atypical oxidation reactions:</b>	
NO synthase type oxidations	Arylamidoximes, ketoximes
Oxidase activity	Results in O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
Peroxidase type oxidation	Phenols
Dehydrogenation	Alkanes
Oxidative deformylation	Aldehydes
<b>Non-oxidative reactions:</b>	
Isomeration	Prostaglandin H <sub>2</sub> , thromboxane
Reductase	Polyhalogenates, nitroaromatics, tertiary amine, arene oxides
Allene oxide synthases	Eicosatetraenoic acid
Dehydration	Aldoximes

The data is derived from: Goepfert *et al.*, 1995; Goksøyr & Förlin, 1992; Mansuy, 1998; Stegeman & Hahn, 1994.

בתרשים 1.1 מופיע מגנון הפעולה של ציטוכרום P450:

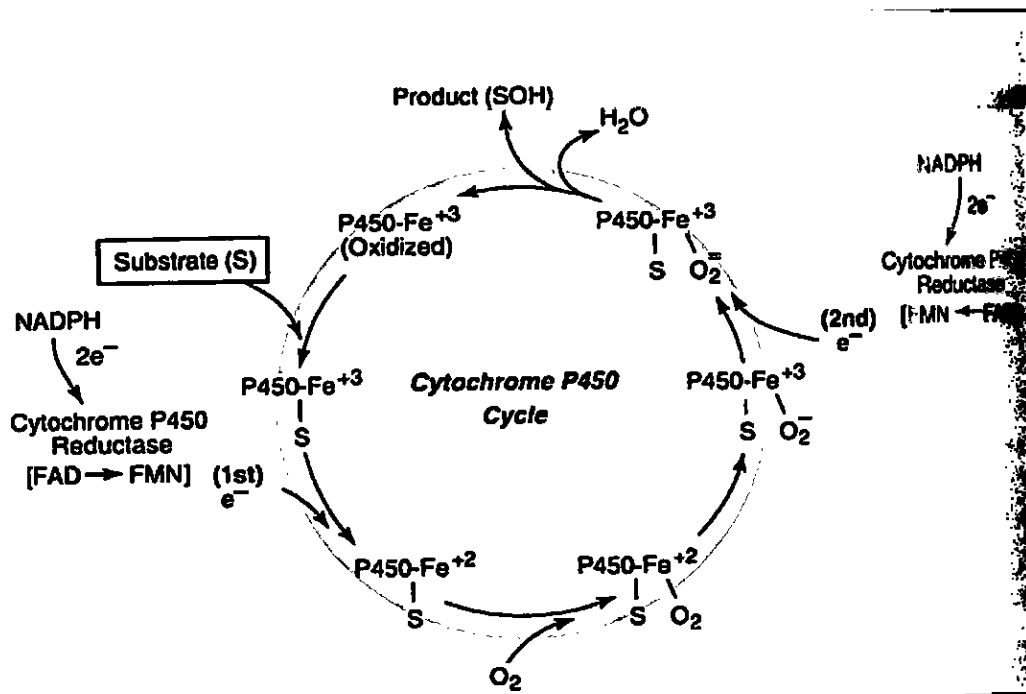


Figure 1.1: Sequence of reaction at cytochrome P450 (after Okita and Siler-Masters, 1997).

השלים הראשוניים של המעגל הקטליטי של אקטיביציית  $O_2$  על ידי P450 נחקרו רבות ואופיינו (Groves and Han, 1995 ; Mansuy and Renaud, 1995 ; Ortiz de Montellano, 1995). במצב המנוחה, בשלב הראשון בתרשים (במרכז, מצד שמאל), מצוי הציטוכרום במצב של שווי משקל בין מצב של שש קואורדינטות (low spin) עם ערכיות  $Fe^{3+}$  כאשר מולקולת מים נמצאת במצב *trans* לליגנד הציסטאין, לבין מצב של חמש קואורדינטות (high spin) כאשר הציסטאין מהווה ליגנד אקסיאלי. התהליך הראשון שמתרחש הוא שחרור מולקולת מים וקישור של הסובסטרט, דבר המביא לעירור מעטפת האלקטרונים סביב אטום הברזל (מצב של high spin), להטיית שיווי המשקל לכיוון המצב של חמש קואורדינטות ולשינוי בפוֹטנציאל החיזור שלו. בשלב השני מקבל הברזל אלקטרון מציטוכרום P450 רדוקטז והופך ל-  $Fe^{2+}$ . במצב זה נקשרת מולקולת חמצן אטמוספירית (למטה בתרשים) לברזל ליצירת קומפלקס אנויס-סובסטרט- $O_2$ . הקומפלקס המשולש מקבל אלקטרון נוסף המחזר את אטום החמצן, נוצר פראוקסידאז ופרוק של הקשר O-O. אטום חמצן אחד מחוזר למולקולת מים בעוד השני נקשר לסובסטרט ומחמצנו. בשלב האחרון מתבצעת הידרוקסילציה של הסובסטרט והמעגל מתחדש.

חלבוני ציטוכרום P450 הם חלק ממערכת הולכת אלקטרונים מיקרוזומלית הקשורה לרטיקולום האנדופלסמי העדין (איור 1.2). ריאקצית הקטליזה שמבצעים אנוימי P450 דורשת, כאמור, שני אלקטרונים על מנת להשלים את המעגל הכולל של חיזור ברזל ה- heme, קישור

החמצן וחיתוך הסובסטרט המחומצן. נוקלואטידי Pyridine, תורמים שני אלקטרונים בו זמנית ואילו ציטוכרום P450 הוא בעל קבוצה פרוסטטית אחת ולכן יכול לקבל רק אלקטרון אחד ברגע נתון. על כן נדרש מתווך ביניים, אנונים שיודע לקבל שני אלקטרונים בו זמנית מחד ומאידיך יודע לתרום אלקטרון אחד. NADPH-dependent flavoprotein reductase, המעוגן לרטיקולום האנדופלסמי בסמיכות לציטוכרום P450, עונה על דרישות התפקיד. הוא מקבל סימולטנית שני אלקטרונים מ-NADPH ומעביר אלקטרון יחיד לציטוכרום P450. אנונים זה הוא התורם של האלקטרון הראשון במעגל הקטליטי של ציטוכרום P450, אך התרומה של האלקטרון השני אינה באה ממנו בהכרח אלא לעיתים התורם הוא ציטוכרום  $b_5$ . לא ידוע באילו נסיבות ותחת אילו תנאים תורם ציטוכרום  $b_5$  אלקטרון לציטוכרום P450.

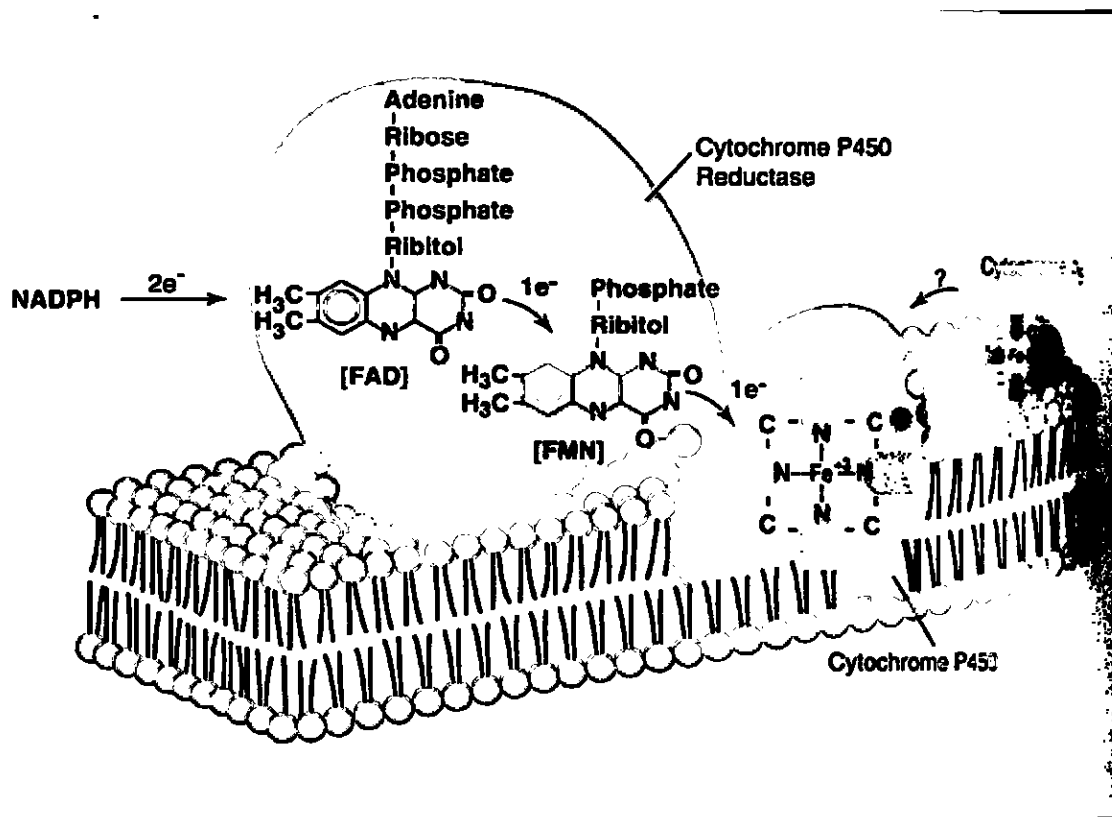


Figure 1.2: Components of the microsomal cytochrome P450 system (after Okita and Siler-Masters, 1997).

### 1.3 תפקיד ציטוכרום b<sub>5</sub>

ציטוכרום b<sub>5</sub> הוא חלבון heme קטן המעוגן לממברנה המיקרוזומלית בסמיכות לציטוכרום P450 ומחזור על ידי NADPH reductase או על ידי flavoprotein מיקרוזומלי נוסף-NADH cytochrome b<sub>5</sub> reductase (Okita and Siler-Masters, 1997). תפקידו הפונקציונלי העיקרי של ציטוכרום b<sub>5</sub> הוא להשתתף בריאקציות מעברי אלקטרונים שונות, כאשר הוא מהווה נשא של אלקטרון אחד. כך למשל, ציטוכרום b<sub>5</sub> משתתף בריאקציות פיסיולוגיות חשובות כמו דסטורציה של חומצות שומן, ויסות סינתזת סטרואידים, חיזור של מטהמוגלובין להמוגלובין, והשתתפות בריאקציות שונות של חימצון מיקרוזומלי המקוטלזות באמצעות ציטוכרומי P450 שונים (Chudaev *et al.*, 2001). ציטוכרום b<sub>5</sub> יכול ליצור קומפלקס ספציפי יחד עם ציטוכרום P450, דבר המעלה את האפיניות של ציטוכרום P450 לסובסטרט ומייעל את ה- turn over של הסובסטרט. הוצע שהקישור של ציטוכרום b<sub>5</sub> לציטוכרום P450 הופך את האחרון למקבל של שני אלקטרונים ובכך הוא מגביר את יעילותו (Schenkman, 1993).

### 1.4 אבולוציה ונומנקלטורה של ציטוכרומי P450

תפוצת משפחת ציטוכרום P450 היא אוניברסלית מחיידקים לצמחים ועד בעלי החיים (Nelson *et al.*, 1996). עצם העובדה שאנזים זה קיים כבר בבקטריות, מלמדת על קיומו של אב קדמון משותף שהתקיים לפני למעלה מ- 3.5 ביליון שנה, עוד בטרם התפצלו הפרוקריוטים והאוקריוטים (Nelson *et al.*, 1993; Nelson and Strobel, 1987). ככל הנראה, עוד טרם הפיצול, חלבוני P450 שימשו בביוסינתזה של כולסטרול ונגזרותיו (Nelson and Strobel, 1987). הוצע שאנזימי P450 הראשונים היו מעורבים בסינתזה של תרכובות שומניות וסטרואידים החיוניים לתחזוק שלמות הממברנות (Nebert and Gonzalez, 1987).

שתי קבוצות כלליות של ציטוכרום P450 קיימות בהתבסס על זהות האנזים שתורם להן את האלקטרונים. בנוסף, באוקריוטים, קיים גם הבדל במיקומן התוך תאי (Gonzalez, 1993). ציטוכרומי P450 בקטריאליים ואוקריוטים מסוימים מקבלים אלקטרונים דרך חלבון ברזל-גופרית שנקרא adrenodoxin, שבעצמו מקבל אלקטרונים מאנזים נוסף adrenodoxin reductase הכולל קבוצת FAD (Nelson and Strobel, 1987). בפרוקריוטים, המערכת מצויה במצב מסיס ואילו באוקריוטים, ציטוכרומי P450 אלו מצויים באופן ייחודי רק בממברנה הפנימית של המיטוכונדריה. אנזימים אלו מעורבים בביוסינתזה ספציפית של סטרואידים ואינם מעורבים



במטבוליזם של קסנובויוטים (Gonzalez, 1993). הקבוצה העיקרית השניה של ציטוכרום P450 מצויה באאוקריוטים, קשורה לממברנות המיקרוזמליות כאשר האלקטרונים הנתרמים לאנזימים אלו באים כאמור, מ-NADPH cytochrome P450 reductase ולעיתים גם מציטוכרום b<sub>5</sub>.

משפחת העל של P450 עברה במהלך האבולוציה התפצלויות למשפחות ותת משפחות של גנים. מיון וסיווג משפחות הגנים השונות נעשה כיום על ידי קביעת רצף חומצות האמינו בחלבונים או רצף הנוקלאוטידים ב-DNA של הגן (Nebert *et al.*, 1989). על פי הנומנקלטורה המקובלת כיום לעל המשפחה נקראת CYP, אתר כך באים: מספר ערבי המייצג את המשפחה של הגן, אות גדולה (capital) המייצגת את תת המשפחה ומספר המייצג את הגן הספציפי (לדוגמא, CYP1A1). גנים ו-cDNA מסומנים בשורש איטלקי (CYP) בעוד שחלבונים ו-mRNA נכתבים בסגנון רגיל. חלבוני CYP בעלי דמיון של מעל ל-40% ברצף חומצות האמינו מוגדרים כשייכים למשפחה אחת. כאשר רמת הדמיון בין הרצפים עולה על 55%, האנזימים מוגדרים כשייכים לאותה תת משפחה (Nelson *et al.*, 1993). על כל פנים, לעיתים ישנה בעייתיות עם כללים אלו כאשר משווים בין גנים אורתולוגים ממינים הרחוקים זה מזה מבחינה אבולוציונית (Stegeman and Hahn, 1994). לאחרונה, הוצע על ידי Nelson (1998) להשתמש במינוח CLAN, שהוא רמה גבוהה יותר של ארגון הכוללת צברים של משפחות גנים הקרובות זו לזו מבחינת דמיון הרצפים. מינוח זה דרוש לשם דיון ברמה האבולוציונית, בניסיון לאתר את הדומה והשונה בסוגי אנזימי P450 הקיימים בממלכות השונות של עולם החי.

אנזימי P450 האחראים למטבוליזם של תרכובות קסנובויוטיות התפתחו ככל הנראה, מאוחר יותר מאלו האחראים למטבוליזם של סטרואידים. משפחות 1-4 הן החשובות ביותר מבחינה תפקודית, בביצוע מטבוליזם של תרכובות קסנובויוטיות (Nelson *et al.*, 1996). התיאוריה המקובלת היא שאבן הדרך להתפתחות זו היא עליית בעלי החיים ליבשה לפני כ-800-400 מליון שנה. בין בעלי החיים לבין הצמחים שהקדימו אותם בעליה ליבשה החל "מרוץ חימוש אבולוציוני" התיאוריה, כאשר החלו בעלי חיים להיזון מן הצמחים סינתזו הללו כימיקלים רעילים לשם הגנה מרעייה. בעלי החיים פיתחו בתגובה מגוון חדש של אנזימי P450 לביצוע פירוק ונטרול של תרכובות אלו.

מאה גני CYP או יותר עשויים להתקיים במין נתון, כאשר אופן הביטוי ורמתו משתנים ברקמות ובסוגי התאים השונים (Stegeman and Livingstone, 1998). על פי העדכון האחרון (08/2001), (Dr. David Nelson of the P450 Nomenclature Committee, <http://drnelson.utm.edu>) זוהו וסווגו עד היום 265 משפחות CYP: 75 משפחות בחיידקים, 72 באאוקריוטים ירודים, 52 בצמחים ו-69 משפחות בממלכת בעלי החיים. המספר הכולל, הידוע כיום, של אנזימי P450 עולה

על 1000 (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001). מספר האנזימים במינים שונים שונה באופן מהותי דבר הנובע, ככל הנראה, מצרכים פונקציונליים שונים. כך למשל, בבקטריות מספר האנזימים אינו עולה על 20, באדם הוא עומד על כ- 60, ואילו בצמחים מספר האנזימים המשוער במין אחד בלבד, *Arabidopsis thaliana*, הוא מעל 300 (Nelson, 1999).

## 1.5 בקרת הביטוי של ציטוכרומי P450

גני *CYP* נתונים לוויסות על ידי גורמים פיסולוגיים וסביבתיים רבים. מספר גנים מבוטאים באופן קונסטיטוטיבי כאשר אחרים, ובעיקר אלו שמעורבים במטבוליזם של קסנובויוטים, עוברים אינדוקציה (Denison and Whitlock, 1995). בקרת האינדוקציה באמצעות סובסטרטים קסנובויוטים, מאפשרת לתא יכולת הסתגלות לשינויים בסביבתו הכימית (Stegeman, 1993). האינדוקציה היא למעשה, מנגנון הגנה שבאמצעותו התא יכול לטפל בתרכובות שומניות זרות שאלמלא כן היו עשויות להצטבר לרמות מזיקות (Whitlock, 1999). יחד עם זאת, בריכוזי סובסטרט גבוהים, כאשר מסלול הדטוקסיפיקציה עשוי להיות רווי, האינדוקציה יכולה להגביר את הייצור של מטבוליטים פעילים מעבר ליכולות ההגנה התאיות ובכך לגרום להרעלה או ל-*neoplasia* (Miller and Miller, 1981).

מנגנוני בקרת הביטוי של ציטוכרומי P450 מגוונים ונעים בין שפעול ברמת השעתוק או ויסות ברמה של לאחר השעתוק, קרי ייצוב ברמת החלבון או ייצוב ה- mRNA (Bresnick, 1993). מאחר ומנגנוני האינדוקציה הנם מגוונים אין אפשרות לחזות מראש את אופן האינדוקציה בהתבסס על תרכובת המשרן (Okita and Siler-Masters, 1997). הביטוי של המשפחות העיקריות של גני *CYP* מווסת באופן ספציפי על ידי קולטנים המשופעלים באמצעות ליגנדים אנדוגניים ואקסוגניים. ציטוכרומי P450 מקטלזים לעיתים קרובות הן את היצירה והן את הפירוק של ליגנדים אלו ומשפיעים על העוצמה ומשך הזמן שבו פועלים הסיגנלים (Honkakoski and Negishi, 2000). עבור מספר משרנים שנחקרו קיים ידע רב לגבי המנגנון המדויק שבו הם פועלים על ציטוכרומים ספציפיים. דוגמא טובה לכך הוא החומר המסרטן 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin שהאינטראקציה שלו עם הקולטן הציטוסולי AhR נחקרה רבות (Hahn, 1998). בשנים האחרונות נתגלו קולטנים גרעיניים המתווכים אינדוקציה של ציטוכרומי P450 הפטיים השייכים למשפחות CYP2, CYP3, CYP4. קולטנים אלו שייכים כולם למשפחה אחת (NR1), שמותיהם בהתאמה, הם CAR, PXR, ו-PPAR והם מתווכים אינדוקציה של CYP2B, CYP3A ו-CYP4A (Waxman, 1999).

## 1.6 משפחות ציטוכרומי P450 בדגים

מספר רב של סוגי P450 בודדו בדגים בעיקר מרקמת הכבד, אך גם מן הכליה ורקמות נוספות (Goksøyr and Husøy, 1998). פרופיל קטליטי ופעילות אימונית צולבת מצביעים על קשר בין סוגי P450 בדגים שונים ובין הסוגים בדגים וביונקים (Stegeman, 1993). עד כה בודדו בדגי גרם גנים מתת המשפחות 1A/B, 2 K/M/N/P, 3A, 4T, 11A, 17A, 19A, 26A (Nelson, 1998). משפחות P450 העיקריות המעורבות במטבוליזם של תרכובות קסנוביוטיות ובאינאקטיבציה של סטרואידים הן משפחות 1-4 (Stegeman, 1993). בטבלה 1.2 מוצגים מאפייני משפחות אלו בדגי גרם מבחינת התהליכים הביולוגים שבהם הן מעורבות, משרנים ומעכבים בולטים, והתבחינים הביולוגיים האופטימלים לזיהוי רמת הפעילות האנזימטית.

ביחס למחקר ביונקים, הידע על ציטוכרומי P450 בדגים מועט יחסית אך בשנים האחרונות המחקר הולך ומתרחב. הפעילות והביוכימיה של ציטוכרום P450 נחקרה במינים רבים של דגים, ממשפחות דגים שונות. טרוטת עין הקשת (*Oncorhynchus mykiss*), הוא המין הנחקר ביותר מבין המינים האקוויטים וממנו בודדו עד כה 14 אנזימים של P450 (Buhler and Wang-Buhler, 1998). בטבלה 1.3 מוצגים מיני P450 השונים שהופקו ושובטו עד היום בדגים המהווים מיני מפתח בתחום מחקר זה. בנוסף, מוצגות בטבלה עבודות מחקר הנוגעות למיני הדגים המשמשים אותנו למחקר בנחל הירקון.

**Table 1.2: Xenobiotics-inducible P450 subfamilies in teleost**

P450 designation	Processes involved	Prominent Inducers	Prominent Inhibitors	Prominent prototypes	Comments	References
CYP1A	detoxification ; chemical carcinogenesis	PAHs, planar PCBs, PCDDs, PCDFs,	ANF, ISF, imidazoles, parathion, Cd	EROD, ECOD, AHH, NSMD, MROD, DMBA-OH	Evidence was present for the existence of two distinct CYP1A genes (1A1, 1A3) in rainbow trout but in most examined fish there is only one gene.	Buhler and Wang-Buhler, 1998; Miranda <i>et al.</i> , 1998; Siegeman and Hahn, 1994.
CYP1B	chemical carcinogenesis	7,12-dimethylbenz[a]anthracene (P AH)	unresponsive to $\beta$ -NF	NR	Recently, CYP1B has been characterized and sequenced in two fish species.	Goddard <i>et al.</i> , 2000; Leaver and George, 2000.
CYP2B	steroids metabolism	might be dietary natural compounds	NR	Might be PROD & BROD but this has not been proven.	Chemical induction of CYP2B-like proteins in fish has not been identified. Unlike mammalian P450s, the fish P450s are not induced by PB compounds.	Bainey <i>et al.</i> , 1999; Klotz <i>et al.</i> , 1986; Miranda <i>et al.</i> , 1990; Siegeman <i>et al.</i> , 1997.
CYP2E-like	chemical carcinogenesis, hepatic toxicity	N-nitroso-diethylamine, ethanol, diabetes, starvation	NR	chlorzoxazone and <i>p</i> -nitrophenol hydroxylation	Antibodies to rat 2E1 cross reacted with topminnow (fish) liver induced by ethanol.	Kaplan <i>et al.</i> , 1991; Siegeman, 1993; Wall and Crivello, 1998, 1999.
CYP2K	steroids metabolism	AFB1, testosterone, diethylthiocarbamate	imidazoles, ANF, ellipticine	BEND, LA-OH,	Troul 2K1 cross reacted with antibodies to rat 2B1 and 4A, 2K1 catalyze the formation of the carcinogenic AFB1-8,9 epoxide.	Buhler and Wang-Buhler, 1998; Cok <i>et al.</i> , 1998; Haasch <i>et al.</i> , 1998; Miranda <i>et al.</i> , 1998.
CYP2M	fatty acids metabolism	PPAs (chlorinated compounds)	NR	LA-OH	Antibodies to rat 2B1 cross reacted with trout 2M1.	Buhler and Wang-Buhler, 1998; Cok <i>et al.</i> , 1998; Haasch <i>et al.</i> , 1998; Yang <i>et al.</i> , 1998.
CYP2N	fatty acids metabolism	benzphetamine, arachidonic acid.	TPA	BEND, minimal ARODs activities	Related to mammalian CYP2J2 and similar function as fatty acid epoxidase and hydroxylase.	Oleksiak <i>et al.</i> , 1997, 2000.
CYP2P	fatty acids metabolism	benzphetamine, arachidonic acid.	NR	NR	New CYP subfamily founded in killifish. Related to mammalian CYP2P3.	Oleksiak <i>et al.</i> , 1997; Siegeman, 2000.
CYP3A	steroids and drugs metabolism, salt balance	therapeutic drugs, steroids, glucocorticoids, PCN	parathion, ANF, ISF, imidazoles, PBO, ABT	Steroid 6 $\beta$ -OH, BEND, EMND, T6H, PROG-OH	Fish and mammalian 3A are immunologically related proteins. Multiple CYP3A proteins may exist in some teleost fish species.	Buhler and Wang-Buhler, 1998; Cok <i>et al.</i> , 1998; Lee <i>et al.</i> , 1998; Miranda <i>et al.</i> , 1998.
CYP4T	NR	NR	NR	NR	A new subfamily which is closest resemblance to mammalian CYP4B family.	Falckh <i>et al.</i> , 1997.

Abbreviation used: ABT, 1-aminobenzotriazole; AHH, aryl hydrocarbon hydroxylase; ANF,  $\alpha$ -naphthoflavone; APND, aminopyrine N-methylase; BEND, benzphetamine-N-demethylase; BROD, benzyloxyresorufine O-dealkylase; Cd, cadmium; DMBA-OH, 7,12 dimethylbenz[a]anthracene hydroxylase; ECOD, 7-ethoxycoumarine O-deethylase; EE<sub>2</sub>, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol; EMND, ethylmorphin N-demethylase; EROD, 7-ethoxyresorufine O-deethylase; ISF, isosafrol; LA-OH, lauric acid hydroxylase; MROD, methoxyresorufine O-dealkylase; NDEA, N-nitrosodethylamine; NR, not recorded; NSMD, N-nitrosodimethylamine demethylase; PBO, piperonyl butoxide; PCN, pregnenone  $\alpha$ -carbonitrile; PROD, pentoxyresorufine O-dealkylase; PROG-OH, progesterone hydroxylase; T6H, testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

**Table 1.3: Purified or cloned CYP family members from selected teleost\***

Designation	Species	Protein or cloned	References
CYP1A1/1A3	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Protein + cloned	Benrston and Chen, 1994; Heilman <i>et al.</i> , 1988; Williams and Buhler, 1982, 1984.
CYP1A1	Scup ( <i>Stenotomus chrysops</i> )	Protein + cloned	Klotz <i>et al.</i> , 1983; Morrison <i>et al.</i> , 1995.
CYP1A	Common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Catalytic analyses	Machala <i>et al.</i> , 1997; Marionnet <i>et al.</i> , 1997; Taysse <i>et al.</i> , 1998; van der Weiden <i>et al.</i> , 1994.
CYP1A, 2B-like, 3A-like CYP1A	Thinlip mullet ( <i>Liza ramada</i> ) Leaping mullet ( <i>Liza saliens</i> )	Catalytic and immuno-chemical analyses Purified protein	Yawetz <i>et al.</i> , 1998. Arinc and Sen, 1999; Sen and Arinc, 1998, 2000.
CYP1A	Tilapia ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	Catalytic and immuno-chemical analyses	Ueng <i>et al.</i> , 1995.
CYP1A	Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Catalytic and immuno-chemical analyses	Bainy <i>et al.</i> , 1999; Pathiratne and George, 1996; Wong <i>et al.</i> , 2001; Zapata-Perez <i>et al.</i> , 2000.
CYP1A1	Hybrid tilapia ( <i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i> )	Purified protein	Ueng and Ueng, 1995.
CYP1B1	Scup ( <i>Stenotomus chrysops</i> )	Cloned	Goddard <i>et al.</i> , 2000.
CYP2B	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Purified protein	Miranda <i>et al.</i> , 1989.
CYP2B-like	Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Catalytic and immuno-chemical analyses	Bainy <i>et al.</i> , 1999.
CYP2E-like	Topminnow ( <i>Poeciliopsis</i> spp.)	Immunochemistry analyse	Kaplan <i>et al.</i> , 1991, 1999.
CYP2E-like	Winter flounder ( <i>Platyonectes americanus</i> )	Catalytic analyses	Wall and Crivello, 1998, 1999
CYP2K1	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Protein + cloned	Miranda <i>et al.</i> , 1989; Buhler <i>et al.</i> , 1994.
CYP2K2	killifish ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	Cloned	Oleksiak <i>et al.</i> , 1997.
CYP2M1	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Protein + cloned	Miranda <i>et al.</i> , 1989; Yang <i>et al.</i> , 1998.
CYP2N 1/2	Killifish ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	Cloned	Oleksiak <i>et al.</i> , 1997.
CYP2P 1/2/3	Killifish ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	Cloned	Oleksiak <i>et al.</i> , 1997.
CYP3A27	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Protein + cloned	Lee <i>et al.</i> , 1998; Miranda <i>et al.</i> , 1989
CYP3A-like	Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Catalytic and immuno-chemical analyses	Bainy <i>et al.</i> , 1999; Pathiratne and George, 1996.
CYP3A	Scup ( <i>Stenotomus chrysops</i> )	Purified protein	Klotz <i>et al.</i> , 1986.
CYP3A30	Killifish ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	Cloned	Celander and Stegeman, 1997.
CYP4T1	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Cloned	Falckh <i>et al.</i> , 1997.
CYP11A1 (P450scc)	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Cloned	Takahashi <i>et al.</i> , 1993.
CYP17 (P450c17)	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Cloned	Sakai <i>et al.</i> , 1992.
CYP19 (P450arom)	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Cloned	Tanaka <i>et al.</i> , 1992.
CYP26	Zebra fish ( <i>Brachydanio rerio</i> )	Cloned	White <i>et al.</i> , 1996.

\*Some data are derived from Dr. David Nelson of the P450 Nomenclature Committee (<http://dmnelson.utmem.edu>)

## 1.7 תת משפחת P4501A

תת משפחת ציטוכרום P4501A היא בעלת תפקיד מרכזי בביוטרנספורמציה של תרכובות קסנוביוטיות רבות כולל קבוצות מזהמים פטרוכימיות כגון:

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), Polychlorinated biphenyls (PCBs), Polychlorinated dibenzofuranes (PCDFs), and Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Stegeman and Hahn, 1994).

התכונה המאפיינת את תת משפחה זו היא האינדוקציה, קרי סינתזה *de novo*, שהיא עוברת באמצעות קסנוביוטטים. הביטוי הקונסטיטטיבי (רקע) של הגן *CYP1A1* הוא נמוך בעוד שרמת הביטוי בתגובה למשרנים היא גבוהה (Whitlock, 1999). גנים מתת המשפחה *CYP1A*, מושרים ע"י אותם סובסטרטים שעליהם הם פועלים, כלומר הסובסטרטים מהווים משרנים לגנים המקודדים לסינתזה של הציטוכרומים עצמם. חשיפה של המערכת למשרן כזה גורמת לביטול הרפרסיה שבה מצויים הגנים ולסינתזה מוגברת של הציטוכרומים.

ביונקים, תת משפחת P4501A כוללת שני גנים, *CYP1A1* ו-*CYP1A2* אשר אחראים למטבוליזם של PAHs ו- aromatic amines, בהתאמה (Bresnick, 1993). מנגנון ויסות השעתוק של שני גנים אלו נחשב שונה זה מזה. הביטוי האינדוקטיבי של הגן *CYP1A1* הוא ברקמת הכבד, וברקמות חוץ הפטיות כמו ריאה, כליה ועור, בעוד שהביטוי האינדוקטיבי של הגן *CYP1A2* מוגבל לכבד בלבד (Sogawa and Fujii-Kuriyama, 1993).

בדגים, מספר חלבוני CYP אשר נראים שייכים לתת משפחת 1A בודדו מכבדים של מינים שונים (ראה טבלה 1.3). נוגדנים ספציפיים לאנזימי *CYP1A* אלו הגיבו תגובה אימונית צולבת בכל מיני הדגים שנבדקו כמו גם עם סוגי *CYP1A* ביונקים (Stegeman, 1989). Heilmann *et al.* (1988) בודדו וריצפו לראשונה cDNA מכבד טרוטת עין הקשת שטופל במשרן 3-methylcholanthrene. השוואת רצף חומצות האמינו עם אנזימי P450 מיונקים העלתה שזהו גן אורתולוגי ל-*CYP1A1* היונקי. המחברים הסיקו שישנו רק גן אחד בטרטוט עין הקשת ושזהו *CYP1A1* ולא *CYP1A2*. התקדמות בנושא זה הושגה כאשר Berndston and Chen (1994) דיווחו על השלמת ריצופם של שני גנים, *CYP1A1* ו-*CYP1A2*, שהופקו מהכבד של דג זה. אולם, מאוחר יותר הסיק הועד לנומנקלטורה של ציטוכרומי P450 (Nelson *et al.*, 1996) ששמות גנים אלו מוטעים ויש צורך לשנותם ל-*CYP1A3* ו-*CYP1A1*, בהתאמה. למעשה, רק גן *CYP1A* אחד זוהה ברוב מיני הדגים שנבדקו עד כה ותכונותיו המבניות והקטליטיות דומות יותר ל-*CYP1A1*, אבל ישנן תכונות

הדומות לתכונות *CYP1A2*. כל זה מוביל לסברה הרווחת שהגן *CYP1A* בדגים קדום יותר מהפיצול בין *CYP1A1/1A2* ביונקים (Stegeman, 2000).

האינדוקציה של תת משפחת *CYP1A* ביונקים כמו גם בדגים מתווכת באמצעות קולטנים ציטופלסמטיים הנקראים Aryl hydrocarbon receptors (AhR) (Hahn, 1998). קולטנים אלו זווה כשייכים למשפחת bHLH-PAS, משפחה של פקטורי שעתוק המשופעלים באמצעות ליגנדים (PAHs) (Hahn, 1998). המודל המוצע לתהליך זה (ראה איור 1.3) מציע שהליגנדים (למשל, PAHs) חודרים לתא, ונקשרים ל-AhR המצויים בקומפלקס עם חלבון hsp90 ופקטורים ציטופלסמטיים אחרים הנקראים AIP (AhR interacting protein). לאחר קישור הליגנד משתחררים ה-hsp90 ו-AIP, ונוצר קומפלקס ליגנד-AhR שנווד לגרעין התא, שם הוא יוצר הטרודימר עם חלבון נוסף הנקרא ARNT. ההטרודימר שנוצר נקשר לרצפים ספציפיים באזור ההגברה לגן *CYP1A1* הנקראים XRE (Xenobiotics Responsive Elements) enhancer. הפרומוטור לגן *CYP1A1* מושתק בהיעדרו של ה-enhancer. לאחר הקישור של AhR/Arnt מועבר אות לאינדוקציה מן ה-enhancer לפרומוטור, מתחיל שעתוק של הגן ולאחריו עליה ברמות ה-*CYP1A* mRNA, סינתזה מחודשת של החלבון *CYP1A* ולבסוף, הגברה של הפעילות הקטליטית של *CYP1A*.

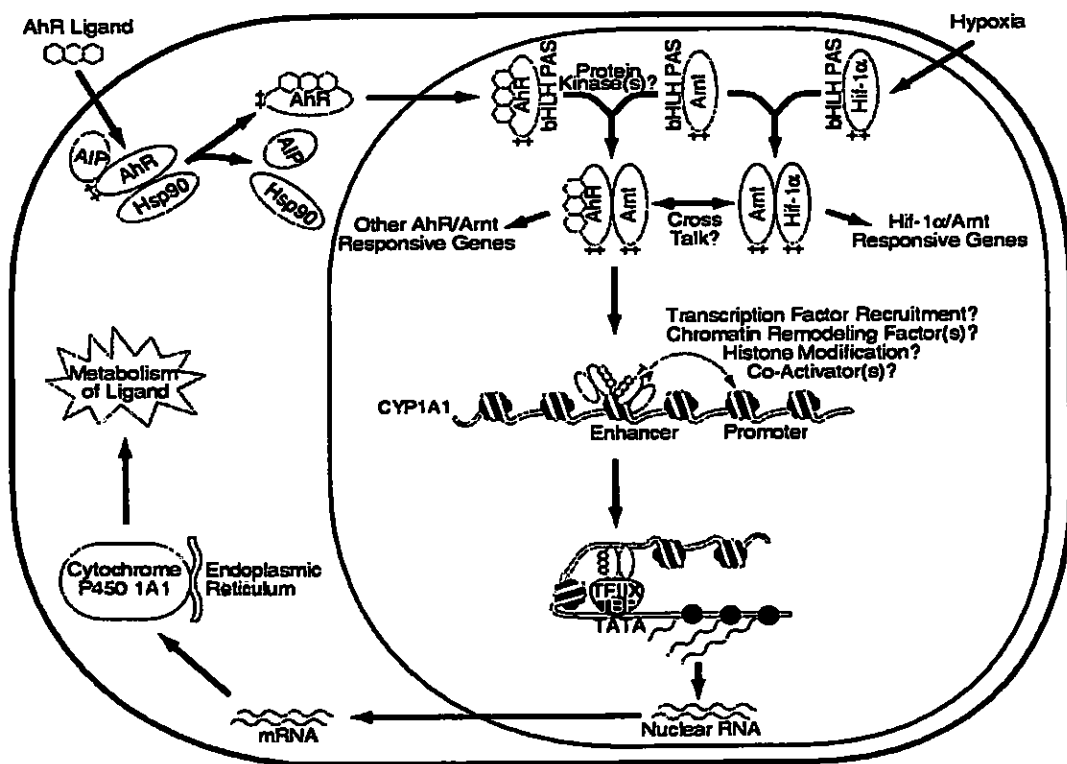


Fig. 1.3: A model for cytochrome P4501A1 induction (derived from Whitlock, 1999).

הביטוי של הגן *CYP1A1* הוא בעיקר באמצעות שפעול של AhR אך מספר גורמים נוספים כמו הורמונים, ציטוקינים וכימיקלים הוכחו כבעלי השפעה על ביטוי הגן (Safe, 1998). גורמים נוספים כמו טמפרטורת הסביבה, עונתיות והמצב הפיסיולוגי של הדגים יכולים אף הם לשנות את התגובה של מערכת *CYP1A* (Machala *et al.*, 1997).

הכבד הנו האיבר העיקרי בדגים שבו ישנה פעילות *CYP1A* אבל האנזים מבוטא במספר רב של רקמות נוספות כולל כליה, לב, זימים, המערכת האולפקטורית, גונדות, מוח ורקמות אנדוקריניות (Saraquete and Senger, 2000). ברוב המחקרים שנעשו עם משרנים ל-*CYP1A1* נעשה שימוש בתבחינים הקטליטיים AHH ו-EROD וזאת בשל נוחיותם ועקב כך שפעילויות אלו הן פרופורציוניות לרמות החלבון ברקמה (Nelson *et al.*, 1996). מבין שני התבחינים פעילות EROD נחשבת ספציפית יותר וזאת מכיוון שפעילות AHH מושפעת מסוגים נוספים של ציטוכרומי P450 (Buhler and Wang-Buhler, 1998).

הביוטרנספורמציה והשיפעול שמבצע *CYP1A1* לתרכובות קסנוביוטיות עשויה לצור תוצרי ביניים הרעילים יותר מתרכובות האם (Goksøyr and Husøy, 1998). יתר על כן, רוב הכימיקלים המסרטנים הם סובסטרטים של *CYP1A1* המגיב רק עם מולקולות בעלות מבנה פלנרי יחסי. המבנה המרחבי הפלנרי מאפשר קישור קוולנטי ל-DNA, דבר העשוי להוביל לשפעול אונקוגנים ולהתחלת פעילות גנוטוקסית (Ioannides and Parke, 1993). במחקרים רבים נמצא מתאם בין אינדוקציה של *CYP1A*, רמות גבוהות של זיהום הסביבה הימית בתרכובות מסרטנות וגידולים סרטניים בדגים ובעלי חיים אחרים (Stegeman and Lech, 1991; Williams *et al.*, 1998). כך למשל, מזהמי סביבה כמו PCBs ו-PAHs, שהם משרנים של *CYP1A1*, עשויים לתפקד כ-tumor initiators ואו פרומוטרים באוכלוסיות דגי בר (Bailey *et al.*, 1984).

## 1.8 תת משפחת P4502E

ביונקים ישנו אנזים אחד, *CYP2E1*, השייך לתת משפחת P4502E. האנזים בודד והגן המקודד לו שובט ממספר מקורות שונים (Koop, 1992). אנזים זה ידוע בעיקר עקב מעורבותו במטבוליזם של ethanol המהווה עבורו סובסטרט ומשרן. חלק מהסובסטרטים לציטוכרום P4502E הם אנדוגנים (חומצות שומן, למשל) אך למעשה, רוב רובם של הסובסטרטים הם תרכובות קסנוביוטיות ועד כה זוהו מעל ל-85 תרכובות (Koop, 1992; Lieber, 1997). בין אלו ישנם ממסים תעשייתיים שחלקם עשויים להיות מזהמי סביבה, כמו הידרוקרבונים ארומטיים (benzene, aniline, trichloroethylene, chloroform, vinyl chloride, toluene, CCl<sub>4</sub>).



לציטוכרום P4502E1 יש יכולת לשפעל תרכובות רבות לתוצרים הפטוטוקסיים, פרוקרצינוגנים ואו מסרטנים (Bresnick, 1993; Lieber, 1997). כך לדוגמא, ציטוכרום P4502E1 משפעל גם ניטרוזמינים (כמו *N,N*-dimethylnitrosamine) הידועים כבעלי פעילויות רעילות וסרטניות חזקות ביונקים ודגים (Brown-Peterson *et al.*, 1999; Kaplan *et al.*, 1991).

הביטוי של ציטוכרום P4502E1 הנו יציב (קונסטיטוטיבי) אך גם אינדוקטיבי. הויסות של הביטוי הוא מורכב ונעשה ברמת השעתוק, לאחר השעתוק ולאחר התרגום (Lieber, 1997). כך למשל, העלייה בכמות החלבון לאחר חשיפה למשך כמו acetone נגרמת בשל ייצוב החלבון ולא עקב עלייה בכמות ה-mRNA (Song *et al.*, 1989). לעומת זאת, במצבים פיסולוגיים כמו רעב או סוכרת רמת ה-mRNA של CYP2E1 עולה כאשר המנגנון האחראי לכך הוא ייצוב ה-mRNA ולא הגברת שעתוק הגן (Song *et al.*, 1987).

P450 בדגי גרם השייך ל-2E נקבע לראשונה במחקר של Kaplan *et al.* (1991) אשר הראו שמיקרוזומים מכבד דגים יכולים לבצע דאלקילציה ושיפעול של המסרטנים alkylnitrosamines. במחקר זה הגיבו נוגדנים ל-P4502E1 של חולדה לחלבון בכבד של דג topminnow (*Poeciliopsis*) אשר טופל קודם לכן ב-ethanol. לאחרונה, (Wall and Crivello, 1998) התקבל דיווח ראשון על פעילות P4502E1 במיקרוזומים מדגי גרם. הפרקציה המיקרוזומלית של רקמת הכבד היתה בעלת הפעילות המטבולית הגבוהה ביותר של הידרוקסילציה של chlorzoxazone. הידרוקסילציה של התרופה לשחרור שרירים, chlorzoxazone (CZX), ל-6-OH CZX נחשבת כסובסטרט הספציפי ביותר לציטוכרום P4502E1 (Lucas *et al.*, 1995). ההתחקות אחר התוצר (6-OH CZX) נעשת באמצעות HPLC. ישנן גם שיטות ספקטרופוטומטריות כמו מדידה של הידרוקסילציה של *p*-nitrophenol ודמתילציה של *N,N*-dimethylnitrosamine אך הן באופן משמעותי (פי עשר) פחות רגישות (Koop, 1992).

במחקר הנוכחי נבדקו החומרים ethanol ו-trichloroethylene (TCE) אשר דווחו כמשרנים של P4502E1 בכבד ארנבון (Koop *et al.*, 1985). האלכוהול ethanol נצרך על ידי האדם בכמויות עצומות ברחבי העולם וידוע כסובסטרט ומשך חזק של P4502E1. המשמעות הטוקסיקולוגית של אינדוקציה P4502E1 בכבד עקב צריכה כרונית של אלכוהול זה, היא בכך שהיא עשויה להאיץ את המטבוליזם ואת ההשפעות הקליניות והרעילות של כימיקלים, כמו למשל, ממסים אורגנים (Klotz and Ammon, 1998). במחקר על חולדות נצפתה אינדוקציה משמעותית של תכולת P4502E1 בכבד, בפרטים שטופלו ב-ethanol לעומת קבוצת הביקורת (Tsutsumi *et al.*, 1993). המנגנון שמציעים חוקרים אלו לתופעה של הגברת הסינתזה *de novo* של האנזים, הוא עלייה

ברמות ה- mRNA ואו הגברה של יעילות תרגומו. לא נצפתה השפעה של ethanol על שיעורי הדגרדציה של האנוזים.

TCE הוא ממס אורגני תעשייתי השייך לקבוצת ה- chloroethylenes. חומרים אלו נפוצים במיוחד עקב שימושם ככימיקלים תעשייתיים (Barton *et al.*, 1995). המקורות להגעת TCE לסביבה הם בעיקר מתעשיות המתכת, צבעים, טקסטיל, מעבדות וממכסות ניקוי יבש (Plunkett, 1976). חשיפה ל- TCE גורמת למגוון הפרעות, כולל פגיעה במערכת העצבים המרכזית, ורעילות לכבד ולכליה (WHO, 1985). כמו כן, דווח ש- TCE או המטבוליטים שלו הם מוטגניים וקרצינוגנים למספר מיני יונקים (NCI, 1976). המסיסות של חומר זה במים היא גבוהה ועומדת על 1,3660 ppm (EPA, 1993). ממס זה נפוץ ביותר במי בארות, מי גשמים, מאגרים יבשתיים ומי שתייה ממקורות שונים (WHO, 1985). התקן המקסימלי המותר במי שתייה בארצות הברית ל- TCE הוא 5 ppb (EPA, 1985). ספיקות מים עם ריכוזים של 9000-27,000 ppb דווחו במקומות שונים בארצות הברית (Fan, 1988). כך למשל, ישנו דיווח ממישיגן, על אנשים שנחשפו לטווחי זמן של 5-20 שנה לרמות TCE של 800-1400 ppb (Bernad *et al.*, 1987). White *et al.* (1997) קושרים במחקרם את זיהום מי שתייה בתרכובת זו לעלייה ברמת הפגיעות הקוגניטיביות באנשים, ובעיקר בילדים, שצרכו את המים. הפגיעות הן מהסוג שנצפה באנשים שמערכת העצבים המרכזית שלהם נפגעה מחשיפה ידועה לממסים. TCE מהווה מזהם מים סביבתי נפוץ גם בארץ. התקן המרבי ל- TCE בישראל על פי תקנות בריאות העם של משרד הבריאות (2000) הוא 50 ppb. במספר בארות שנדגמו באקוויפר החוף נמצאו ריכוזים של 200 TCE ppb (אלחנני ועמיתיה, 2001). אותו צוות מחקר (גרבר ועמיתיו, 2001) מצאו באזור אתר תע"ש "מגן", בפני מי תהום, ריכוז גבוה ביותר של TCE 250,000 ppb. ריכוז זה עולה פי 5,000 על התקן המרבי המותר לשתייה. במי הירקון, לעומת זאת, לא נמצאו עקבות של TCE בסריקה ב- GC/MS של דוגמאות מים מאתרים שונים בנחל (רב אחא ועמיתיו, 2001).

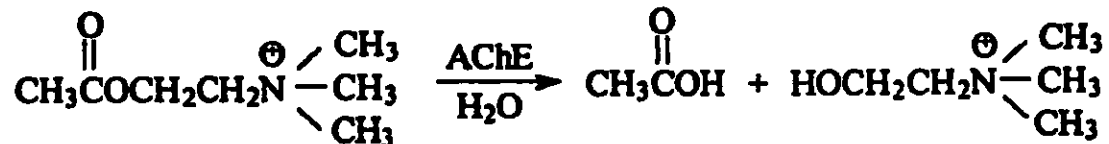
ההשפעה הרעילה החשובה ביותר של TCE היא השפעה נרקותית על מערכת העצבים המרכזית (Maekinen *et al.*, 1988). לאחר בליעה אורלית, ה- TCE נעלם במהירות מן הדם ומצטבר באופן מועדף ברקמות שומן (Anderson, 1985) וברקמות עצביות עתירות שומן (Cohr, 1986 cited in White *et al.*, 1997). הנוירוטוקסיות של TCE עשויה להיות מתווכת על ידי פראוקסידציה של ממברנות תאיות שומניות (Cojocel *et al.*, 1989), או על ידי השפעות ספציפיות על ויסות הרכב חומצות השומן הממברנליות (Kyrklund and Haglid, 1990).

## 1.9 אצטילכולינאסטרז: תפקיד, מבנה ומנגנון פעולה

מסרים במערכת העצבים בגוף בעלי החיים מועברים לאורך תאי העצב בצורה של דחפים חשמליים. ברם, במפגש של שני תאי עצב או בין תא עצב לתא שריר קיים מרווח סינפטי שאופן העברת המסרים בו הוא כימי ומבוצע על ידי טרנסמיטורים. סינפסות שבהן הנוירורנסמיטור הוא אצטילכולין קרויות סינפסות כולינרגיות. כאשר דחף חשמלי מגיע לקצה תא העצב הקדם סינפטי הוא גורם לשחרור הנוירורנסמיטור אצטילכולין אל תוך המרווח הסינפטי. בקצה המרווח הסינפטי, נקשר האצטילכולין לקולטנים מיוחדים בממברנה הפוסטסינפטית וגורם לשינוי בחדירות הממברנה ליוני נתרן ואשלגן. מעבר יונים אלו, גורם לדפולריזציה של הממברנה הפוסט סינפטית ולהמשך העברת השדר העצבי (Eto, 1974).

אצטילכולינאסטרז (AChE) הוא אנזים המתפקד במערכת העצבים המרכזית וההיקפית, בהעברה של פוטנציאל פעולה בסינפסות כולינרגיות. האנזים מעוגן לממברנה הפוסט סינפטית תוך שהוא פונה אל תוך המרווח הסינפטי. תפקידו הפיסיולוגי הוא סיום ההעברה העצבית על ידי הידרוליזה מהירה ביותר של אצטילכולין לאחר שזה הגיב עם הממברנה הפוסטסינפטית (Quinn, 1987). האפקטיביות של פעילות זו נובעת משתי תכונות עיקריות של האנזים: פעילות קטליטית מהירה באופן יוצא דופן, אשר קרובה למגבלת קצב הדיפוזיה, ומגוון מיקומיו התוך תאיים (Legay, 2000).

ריאקציה ההידרוליזה של אצטילכולין באמצעות האנזים AChE מתוארת להלן:



האנזים AChE אינו זקוק לקבוצה פרוסטטית או מתכת לשם פעילותו האנזימטית. הפעילות הקטליטית שלו נובעת ממבנה החלבון עצמו. המבנה המרחבי של המולקולה יוצר אזור פעיל הכולל שני אתרים: כיס קישור לסובסטרט (נקרא גם האתר האניוני) ואתר קטליטי המקטלו את ההידרוליזה של הסובסטרט וקרוי גם האתר האסטרטי (O'Brien, 1976). האתר הקטליטי מורכב מטריאדה קטליטית  $\text{His}^{440}$ ,  $\text{Ser}^{200}$ ,  $\text{Glu}^{327}$  הסמוכים זה לזה מבחינה מרחבית ויושב בעומקו של ערוץ צר ועמוק ( $20^\circ\text{A}$ ). קיר הערוץ מרופד ב-14 שיירים ארומטיים, שמורים אבולוציונית, אשר להם, ככל הנראה, תפקיד בהכוונה חשמלית של הסובסטרט לאתר הפעיל (Sussman *et al.*, 1991). האתר הפעיל כולל שני אתרי קישור לליגנדים: אתר אצילציה בבסיס הערוץ ואתר פריפריאלי בפתחו. הליגנדים יכולים להיקשר באופן סלקטיבי לאחד משני אתרים

אלו, וקומפלקס משולש יכול להיווצר בין הליגנדים השונים ואתרי הקישור (Rosenberry *et al.*, 1999).

הפעילות הקטליטית מתחילה כאשר החומצה האמינית  $Ser^{200}$  עם שייר ההידרוקסיל שלה עוברת שפעול על ידי שיירי טבעות ה-*imidazol* של  $His^{440}$ . לאחר השפעול תוקפת  $Ser^{200}$  נוקלאופילית את הפחמן האצטי, מבקעת את הקשר האסטרי, ויוצרת תוצר ביניים טטרה הזרלי עם קבוצת האציל של האצטילכולין (אציל אנזים). אצילציה של  $Ser^{200}$  באתר הפעיל היא שלב המפתח בהידרוליזה וחומצת אמינו זו היא חומצה השמורה אבולוציונית בהרבה הידרולוזות. בהמשך מתרחשת דה אצילציה - האציל אנזים עובר התקפה נוקלאופילית וישנו שחרור של אצטט וכולין, כך שהאנזים נותר חופשי ומוכן לפעולה נוספת (Silman *et al.*, 1999).

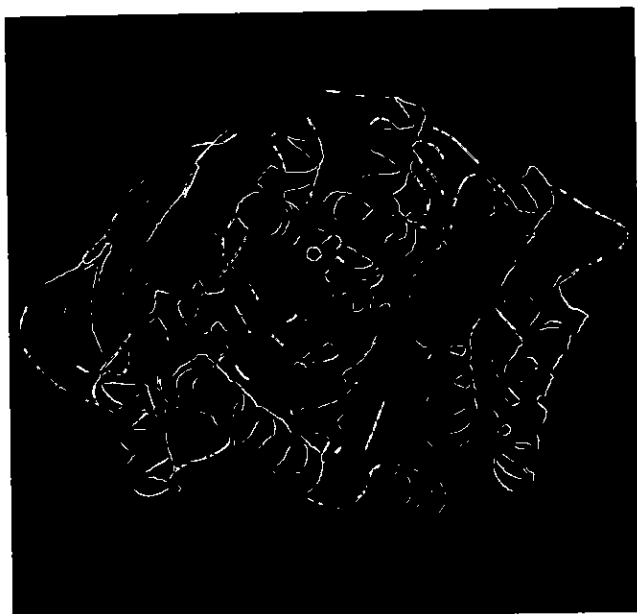


Fig. 1.4: 3D structure of AChE from *Torpedo marmorata* (derived from Legay, 2000).

האנזים AChE קיים במגוון רחב של צורות מולקולריות שונות (ראה איור 1.5), אשר לכולן אותה פעילות קטליטית. היחידה הקטליטית הבסיסית של כל הצורות היא מונומר גלובולרי ( $G_1$ ). צורות גלובולריות נוספות מורכבות משתיים וארבע יחידות קטליטיות ( $G_2$ ,  $G_4$ ). הצורות הגלובולריות הן הטרוגניות, חלקן אמפיפיליות וחלקן לא, והן כוללות תת יחידות קטליטיות שונות (T,H) שנקבעות באמצעות alternative splicing. תת היחידות H יוצרות דימר אמפיפילי (Type I) המעוגן לממברנה באמצעות glycoposphatidylinositol (GPI) ונמצא במערכת העצבים בחרקים, באיבר החשמל של דג ה-*Torpedo* ובשרירים, טסיות דם אדומות ולימפוציטים של יונקים (Silman and Futerman, 1987). תת היחידות מסוג T יוצרות מונומרים

אמפיפיליים (Type II) אשר נמצאים בשפע ברקמות המוח והשרירים של יונקים ועופות (Bon *et al.*, 1991). תת היחידות T יוצרות גם טטרמרים ואוליגומרים שלהם תת יחידות קולגניות או הידרופוביות. טטרמרים בעלי זנב הידרופובי מעוגנים לממברנה ומהווים את הסוג העיקרי של AChE במוח היונקים (Massoulié *et al.*, 1993b). טטרמר יכול להיקשר קוולנטית דרך קשרים דיסולפדיים לזנב קולגן המעגן את האנזים לממברנה התאית. אחד עד שלושה טטרמרים הקשורים לזנב הקולגן יוצרים שלוש צורות אסימטריות המכונות על פי מספר המונומרים שהן כוללות – A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub>, A<sub>12</sub> (Massoulié *et al.*, 1992). בחולייתנים הצורות הגלובולריות הן הפרקציה העיקרית של AChE בעוד שהצורות האסימטריות הן פרקציה קטנה מכלל תכולת האנזים. שיעורן היחסי של צורות אלו הוא ספציפי לרקמה כאשר ברמה התת תאית מגוון הצורות מאפשר לאנזים להיקשר לממברנה או ללמינה הבזלית (Legay, 2000).

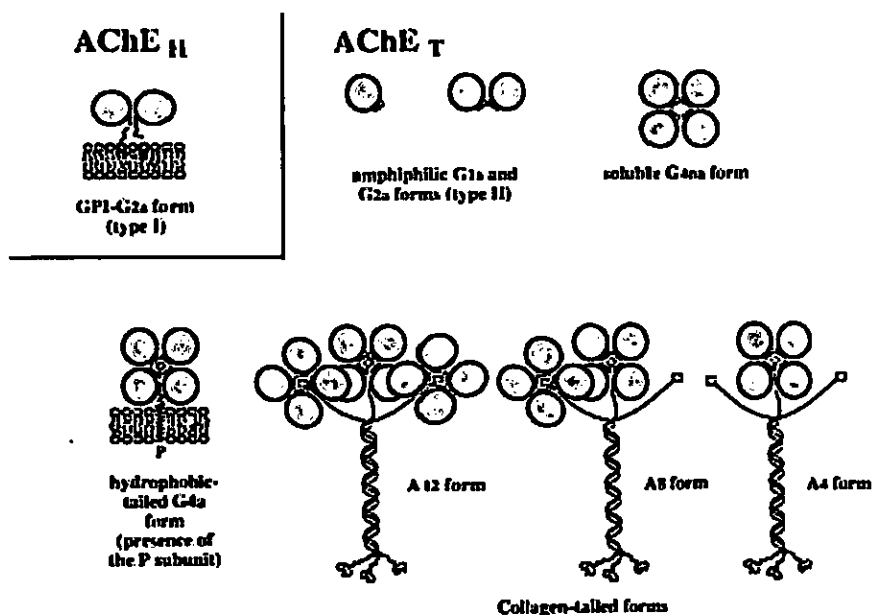


Figure 1.5: Differential molecular forms of AChE (after Massoulié *et al.*, 1993a)

### 1.10 מנגנון עיכוב אצטילכולינאסטרז ע"י אורגנוזרחנים וקרבמטים

בשל חשיבותו של האנזים AChE בתפקוד הגוף התקין הוא היווה מטרה מועדפת ליצירת מעכבים כנגד פעילותו לצרכים שונים כמו רעלי מלחמה, תרופות וקוטלי חרקים (Quinn, 1987). organophosphates ו-carbamates הם קבוצות חומרים של מעכבי AChE המשמשים כקוטלי

חרקים ואשר כיום נפוצים ביותר בעולם (Fulton and Key, 2001). גם בישראל, קבוצות חומרים אלה נמצאות בשימוש נרחב בחקלאות (Richter and Safi, 1997; Sholsberg *et al.*, 2001).

אורגנוזרחנים וקרבמטים הן למעשה סובסטרטים של AChE, אנלוגים לאצטילכולין הטבעי. תרכובות אלו הן אלקטרופיליות והן יוצרות קומפלקס עם האנזים, ומבצעות פוספורילציה או קרבמיזציה של האנזים. הריאקציה מתרחשת על ידי ניתוק של "קבוצה עוזבת" מהסובסטרט ויצירה של קשר קוולנטי עם קבוצת ההידרוקסיל של Ser<sup>200</sup>. כתוצאה מכך, האתר הקטליטי חסום ופעילות האנזים משותקת. יתר על כן, וזאת בשוני מוחלט מהסובסטרט הטבעי, קצב הרגנרציה של האנזים המזורחן או מקורבם הוא איטי ביותר. שלב הדיסוציאציה יכול להימשך ימים עד שבועות במקרה של האורגנוזרחנים (Eto, 1974) בעוד ששלב זה בריאקציה הקרבמטית אורך בין מספר דקות ועד שעות ספורות (Kuhr and Dorough, 1976).

ההשפעות הביולוגיות של עיכוב AChE בידי אורגנוזרחנים וקרבמטים נגרמות עקב הצטברות של אצטילכולין באתרי ההעברה הכולינרגיים, הנובעת מאי יכולתו של ה-AChE המעוכב לבצע הידרוליזה של נוירוטראנסמיטור זה (Sidell, 1994). עיכוב אצטילכולינאסטרז גורם לפעילות יתר באיבר המטרה עקב הגירוי החוזר ונשנה שלו על ידי עודפי האצטילכולין. הדבר גורם להפרעות חמורות בתפקוד מערכות חיוניות בגוף כמו מערכת העצבים האוטונומית, מערכת העצבים הסומטית מוטורית והמוח. עיכוב משמעותי של פעילות האנזים עשוי לגרום לבסוף לקריסת מערכות אלו ולתמותת בעל החיים (Koelle, 1994; Sidell, 1994). הסיבה המרכזית הגורמת לתמותה כתוצאה מחשיפה למעכבי AChE היא בדרך כלל חנק אבל הסיבה לחנק משתנה בין מיני בעלי החיים ואופי התרכובות עצמן. כך למשל, החנק יכול להיגרם מהיצרות דרכי הנשימה, ירידה בלחץ הדם, חסימת צמתי שריר-עצב של הסרעפת והשרירים הבין צלעיים וכשל מרכז הנשימה בגזע המוח (O'Brien, 1976).

ההשפעות ארוכות הטווח של אורגנוזרחנים וקרבמטים על עולם החי קשות להערכה מאחר ולתרכובות אלו יש זמן מחצית חיים קצר יחסית, ומסיסות גבוהה. בשונה מתרכובות אורגנוכלורוניות הנוטות להצטבר ברקמות הגוף ובשרשרת המזון רוב האורגנוזרחנים והקרבמטים אינם יציבים במערכת הביולוגית (Edwards, 1975). יחד עם זאת, ידוע שאורגנוזרחנים במינונים גבוהים, עשויים לגרום לתגובה עצבית מושהית (OPIDN) המאופיינת בהתפתחות עוקבת של דגנרציה של אקסונים, דה מיאליניזציה ושיתוק חלקי לאחר תקופה לטנטית של כשבועיים לאחר החשיפה (Koelle, 1994).

רוב חומרי ההדברה המיושמים בחקלאות עוברים טרנספורציה באמצעות תהליכים פיסיקלים, כימיים וביולוגיים. תהליכים אלו עשויים להוביל להופעה במערכות אקוטיות של תוצרי טרנספורמציה בעלי רעילות דומה או גבוהה יותר משל תרכובות המקור (Belfroid *et al.*, 1999).

דטוקסיפיקציה או דגרדציה של אורגנוזרחנים היא הריאקציה המשמעותית ביותר במטבוליזם שלהם בגוף והיא זו שגורמת לשפעולם וליצירה של תוצרים רעילים מאד (Jokanovic, 2001). ביוטרנספורמציה זו של אורגנוזרחנים שאינם רעילים למטבוליטיים פעילים מתרחשת על ידי מספר ריאקציות עיקריות (Eto, 1974): דסולפורציה חימצונית של קבוצת התיופוספט, חמצון של קבוצות הסולפיד או האמיד, הידרוקסילציה של קבוצת אלקיל ומגוון ריאקציות לא חמצוניות נוספות. תרכובות אורגנוזרחניות רבות הנמצאות בשימוש כיום שייכות לקבוצת ה-phosphorothionate שבה קבוצת הפוספט קשורה לשלושה אטומי חמצן ואטום גופרית אחד. קבוצה זו משופעלת על ידי דסולפורציה חמצונית ( $-P=S \rightleftharpoons -P=O$ ) בתיווכה של מערכת P450. החלפת קבוצת התיוסולפט במולקולת חמצן מביאה ליצירת oxon (למשל, פרתיון הופך לפראוקסון) שבמקרים רבים הנו מעכב AChE רעיל הרבה יותר מתרכובת האם (Milesen *et al.*, 1998).

מאחר וקוטלי חרקים מיושמים באזורים חקלאיים נרחבים במשך השנה, הם מגיעים לעיתים קרובות, באמצעות נגר עילי ושאריות ריסוסים, לאקוסיסטמות אקווטיות המצויות באזורים אלו (Gruber and Munn, 1998). עקב הספציפיות הגבוהה של תרכובות אורגנוזרחניות וקרובמטיות כמעכבי פעילות אצטילכולינאסטרז, הוצע השימוש בזיהוי ומדידה של העיכוב בפעילות אנזימטית זו, לשם ניטור ואומדן של ההשפעות הביולוגיות של חומרים רעילים אלו בסביבה האקווטית (Weiss and Gakstatter, 1964; Bocquene and Galgani, 1991). עבודות מחקר סביבתיות רבות שנעשו בעולם וגם בישראל, עשו שימוש בסמן ביולוגי זה במגוון מיני דגים וסוגי רקמות (Balint *et al.*, 1995; Ferenczy *et al.*, 1997; Kiezer *et al.*, 1995; Yawetz *et al.*, 1993b). בעבודתי זו שימשו רקמות המוח, הזימים והכבד לשם זיהוי עיכוב פעילות AChE במיני דגים שונים שנחשפו למי הירקון.

### 1.11 נחל הירקון

נחל הירקון הוא הגדול מבין נחלי החוף בארץ. אורכו הכולל ממקורותיו בראש העין ועד שפכו לים התיכון הוא כ- 28 ק"מ ושטח אגן ההיקוות שלו כ- 1800 קמ"ר (אביצור, 1957). עיקרו של אגן הניקוז של הירקון הוא באזור הרי יהודה ושומרון, וחלקו בשפלה ובמישור החוף. יובליו העיקריים של הירקון הם נחל קנה, נחל רבה, נחל שילה ונחל איילון. נחל קנה מנקז את מי השופכין והפסולת התעשייתית של הישובים בצפון אגן הניקוז. נחל רבה הוא הקטן ביובלים הנשפך לנחל ליד כפר הבפיטסטים. נחל שילה, הארוך ביובלים, מנקז את מורדות הרי בית אל ונשפך לירקון, לאחר שעבר באזור התעשייה של פתח תקווה. נחל איילון הוא היובל הדרומי הגדול המנקז חלק מהרי יהודה ועמק איילון ונשפך לירקון כ- 3 ק"מ לפני שפכו לים. אגני הניקוז של נחלים אלו ושל הירקון עצמו מאוכלסים בישובים עירוניים (כולל אזורי תעשייה), וישובים חקלאיים המנקזים לירקון שפכים ביתיים ותעשייתיים, כמו גם קולחין ברמות טיהור שונות ממכוני טיהור שפכים אזוריים.

מקורות המים של הירקון עצמו הנם מעיינות ראש העין הנובעים מאקוויפר ירקון-תנינים (בן צבי ועמיתיו, 1995). לפני זרמו בירקון מים זכים כל השנה בשפיעה שעמדה על כ- 220 מלמ"ק לשנה, עד להקמתו בשנת 1955 של מפעל המים "ירקון-נגב" שניצל את עיקר מי המעיינות. כמות המים השפירים המוקצים לירקון הצטמצמה לפחות מ- 10% מהשפיעה ההיסטורית (Gasith, 1992). הודות לזכויות שאיבה של החקלאים המעבדים את שדותיהם סמוך לגדות הירקון הוקצבה הקצאת מים שנתית מינימלית של 2.5 - 1 מלמ"ק. בשנה האחרונה נותקו ארבע משאבות חקלאיות אשר שאבו במעלה הנחל מים מהאפיק לצורך השקיה חקלאית. בעקבות כך הופסקה הזרמת המים השפירים לירקון למעט הקצאה מינימלית לצורכי שמירת טבע בכמות של כ- 350,000 מ"ק (נתוני רשות נחל ירקון, 2001). כתוצאה מכך, ניתן היה לראות בעונת הקיץ קטעים רבים במעלה שהתייבשו. מקור מים נוסף לנחל הוא מי גשמים המגיעים כנגר עילי. לפי נתונים הידרולוגיים יורדים באגן הניקוז של הירקון 1,100 מליון מ"ק גשם בממוצע לשנה אך לפי האומדן רק כ- 3-5% מהמשקעים מגיעים לירקון כמי נגר עילי (בן צבי ועמיתיו, 1995). הירקון, כמו נחלים ים תיכוניים אחרים, מאופיין בוריאביליות עונתית בזרימת המים עם שטף זרימה גבוה במהלך שטפונות החורף ושטף מינימלי עד אפסי במהלך הקיץ (Gasith and Resh, 1999).

מקובל לחלק את נחל הירקון לשלושה קטעים בהתבסס על מקור המים ואיכותם. קטע מעלה הירקון משתרע מאזור ראש העין ועד המפגש עם ערוץ נחל קנה ואורכו כ- 7 ק"מ. איכות המים בקטע זה נחשבת בדרך כלל לטובה, כאשר מקורם הנו מים שפירים מקידוחי ראש העין או מי מוביל. הקטע התיכון של הנחל מתחיל במפגש ירקון-קנה ומתפתל לאורך כ- 16 ק"מ עד לאתר שבע טחנות. קטע זה מקבל את הספקת מימיו העיקרית מנחל קנה ונחל הדירים המנקזים את קולחי מכוני טיהור השפכים כפר סבא- הוד השרון ורמת השרון, בהתאמה. המים בקטע זה הנם מזוהמים ובעלי עומס אורגני גבוה, עם כי איכותם משתפרת במורדו כתוצאה מתהליכי טיהור עצמי. מורד הנחל מהווה את הקטע השלישי, הירקון המלוח, ואורכו כ- 4 ק"מ. מקור המים העיקרי הוא מי ים התיכון החודרים עד אתר שבע טחנות שם הם מתמזגים עם מי הקטע התיכון. לקטע זה מתנקזים גם מימי ושופכי נחל איילון. הקטע המלוח מאופיין במליחות משתנה עקב היותו תחת משטר של גיאיות ושפל (קרוס ועמיתיה, 2001).

מטי"ש כפר סבא הוד השרון מזרים לירקון באמצעות נחל קנה מי קולחים באיכות שניונית בספיקה ממוצעת של כ- 600 מק"ש. מטי"ש רמת השרון מספק לירקון מי קולחים באיכות שלישונית לאחר הכלרה בספיקה ממוצעת של כ- 200 מק"ש. מטי"ש ניר אליהו (קולחי קלקיליה ואלפי מנשה) החל לפעול בשנת 2001 והוא מזרים למעלה נחל קנה קולחים באיכות ירודה, לכל היותר ראשונית (רשות נחל ירקון, 2001). מקורות נקודתיים נוספים הם גלישות ביוב עירוני, שפכים ישירים של מפעלי תעשייה, מצבעות, בתי מלאכה, מפעלי מזון וכיוצא בזה. מקורות לא נקודתיים אפשריים המזהמים את הנחל הנם לרוב נגר עילי של שדות חקלאיים אך גם נגר עילי מהתעשייה ומן הכבישים.



עיקר הזיהום בנחל הירקון מגיע מהזרמה ישירה של שופכים עירוניים ותעשייתיים לערוץ הנחל, והגעה לעיתים מזומנות של שאריות חומרי דיזון וריסוס מהחקלאות (בר אור, 1995). במרחב ירקון מהווים השטחים החקלאיים 60%-70% מהשטח והם כוללים גידולי שדה, מטעים ופרדסים (קפלן, 1996). נגר עילי משטחים חקלאיים כולל בדרך כלל שאריות חומרי הדברה וחומרי דיזון התורמים לסביבה תרכובות מעכבות AChE ותרכובות חנקתיות וזרחתיות אחרות (Carpenter *et al.*, 1998). באזורים חקלאיים בהם מיושמים קרבמטים ואורגנוזרחנים לתקופות ארוכות של השנה, בעלי חיים אקוטים שאינם מהווים מטרה עשויים להיחשף לרמות גבוהות של קוטלי חרקים (Gruber and Munn, 1998). מקור הזיהום העיקרי של הירקון הוא שפכי תעשייה שמקורם נובע כנראה משפכים המוזרמים לנחל קנה (רב אחא ועמיתיו, 2001). מקורות הזיהום הנקודתיים הקבועים של הירקון הנם הקולחים של מכוני טיהור השפכים (מטי"ש) כפר סבא- הוד השרון, רמת השרון ולאחרונה גם מטי"ש ניר אליהו. רוב המזהמים העיקריים כמו PAHs, PCBs, ממסים אורגניים, חומרים משטחים ומתכות כבדות נמצאים בדרך כלל בשפכים עירוניים בריכוזים נמוכים ( $10\mu\text{g/l}$ ) (Kosamala *et al.*, 1998). על כל פנים, מספר תרכובות נתגלו במכוני טיהור שפכים ספציפיים בריכוזים גבוהים בהרבה (Nguyen *et al.*, 1994; Petrasek *et al.*, 1983). תרומה נוספת לסביבה האקוטית של תרכובות הידרוקרבוניות מזהמות כגון PAHs ו- PCBs מתקבלת מנגר עילי, נשורת אטמוספרית, ודליפות ממכלי דלק (Porte and Albaigés, 1993).

תפיסת מרבית מי מעיינות ראש העין לטובת מפעל "ירקון-נגב" וזיהום הירקון בשפכים וקולחים ביתיים ותעשייתיים הביאו לשינוי קיצוני במערכת האקולוגית של הנחל. מיני בעלי חיים וצמחים רבים נפגעו דבר המתבטא בירידה דרסטית בעושר ומגוון המינים החיים בנחל ובעיקר בחלקיו המזוהמים. מחקרים בוטניים שנערכו על צמחיית המים והגדות בירקון הראו מתאם חיובי בין איכויות המים למגוון ועושר המינים בנחל. במחקרים אלו נמצא קשר ישיר בין העלמות צמחים לזיהום הנחל בשפכים (אגמי, 1973; מורד, 1999). במחקר שנערך על חברת חסרי החוליות בירקון נמצאה ירידה דרמטית בעושר המינים בקטעו התיכון של הנחל לעומת מעלה הנחל (גזית, 1999). במחקר של Gafny *et al.* (2000) נמצא שלאיכות המים בבית הגידול ישנה השפעה רבה על מבנה והרכב חברת הדגים בנחל הירקון. בתי גידול נקיים מתאפיינים בעושר מינים ובשפיעות פרטים גבוהים בהשוואה לבתי גידול מזוהמים. מלבד הזיהום, חברת הדגים נפגעת מהרס בתי גידול, אינטרודוקציה נשנית של דגים ותמותות דגים המוניות המתרחשות בעיקר בעקבות שטפונות החורף (Gasith *et al.*, 1998). זיהום הנחל, ייבוש מאגר מקורות בראש העין וקטעים במעלה הנחל הביאו את אוכלוסיית דג לבנון הירקון (*Acanthodrama telavivensis*), האנדמי לנחלי החוף בארץ, לסף הכחדה (אלרון, 2000).

## 1.12 מטרות העבודה

### מטרות עיקריות:

1. שימוש באינדוקציה של P4501A ברקמת הכבד בדגי גרם כסמן ביולוגי לזיהום הירקון בתרכובות הידרוקרבוניות רעילות.
2. שימוש באנליזת פרופיל אצטילכולינאסטרו ברקמות המוח, הזימים והכבד בדגי גרם כסמן ביולוגי לזיהום הירקון בשאריות רעלי עצב אורגנוזרחנים וקרבמטים.
3. חקר אינדוקציה ציטוכרום P4502E-like בדגים כסמן ביולוגי פוטנציאלי לתרכובות רעילות ומסרטנות המצויות בסביבה.

### מטרות משנה:

1. קביעת רמות הרקע האנזימטיות של פעילות AChE ואינדוקציה P4501A בדגי המחקר.
  - 1.1 יצירת בנק נתונים לשם השוואה למיני דגים המובאים מאתרים מזוהמים.
  - 1.2 קבלת נתוני ייחוס לניסויים שיתבצעו בהמשך המחקר בדגי האסופה.
  - 1.3 בחינה של רמת החשיפה של דגי האסופה למעכבי AChE ו/או משרני P4501A בברכות גדול הדגים.
2. חקר האינדוקציה של ציטוכרום P4501A באמנון מכלוא.
3. קביעת מיני הדגים המתאימים לניטור ביולוגי של מים מתוקים ו/או מלוחים.
4. בחינת שימוש באנליזת פעילות AChE לשם ניטור מזהם המים trichloroethylene.
5. הערכת תרומתם של מכוני טיהור השפכים לזיהום הירקון בתרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה.

## 2. שיטות

### 2.1 אתרי המחקר

מיקום אתרי המחקר בנחל ירקון ומאפייניהם מבחינת איכות מים ומקורם מופיעים להלן בטבלה 2.1. לאתרים ניתנו שמות מקוצרים המופיעים בעמודה השמאלית ובהם ייעשה שימוש להלן בגוף העבודה. באיור 2.1 מופיעה מפת נחל הירקון ובה מסומנים אתרי המחקר.

**Table 2.1: Location and water characteristic of the sampling sites.**

Site Abb.	Location	Yarqon section	Main water sources	Water characteristics
AM	Rosh HaAyin reservoir	upper	Rosh HaAyin springs	Freshwater (free of wastewater)
AR	Abu-Rabach dam	upper	Rosh HaAyin reservoir	Freshwater (free of wastewater)
Above Y-Q	Above Yarqon-Qane dam	upper	Rosh HaAyin reservoir	Freshwater (free of wastewater)
KH	Kefar Saba-Hod HaSharon WWTP*	middle	domestic and light industry sewage	Secondary effluents
Below Y-Q	Below Yarqon-Qane dam	middle	KH WWTP + domestic sewage	Primary and secondary effluents
Mitug	Transformation station	middle	KH WWTP + domestic sewage	Primary and secondary effluents
RH	Ramat HaSharon WWTP*	middle	domestic sewage	Tertiary effluents
Above 7M	Above "7 Mills" dam	middle	KH + RH WWTPs	Secondary and tertiary effluents
Below 7M	Below "7 Mills" dam	lower	Mediterranean sea + middle Yarqon section	sea water mixed with some effluents
RB	Rokach bridge	lower	Mediterranean sea	sea water
Y-Est.	Yarqon estuary	lower	Mediterranean sea	sea water

*Note:* \*WWTP = WasteWater Treatment Plant.

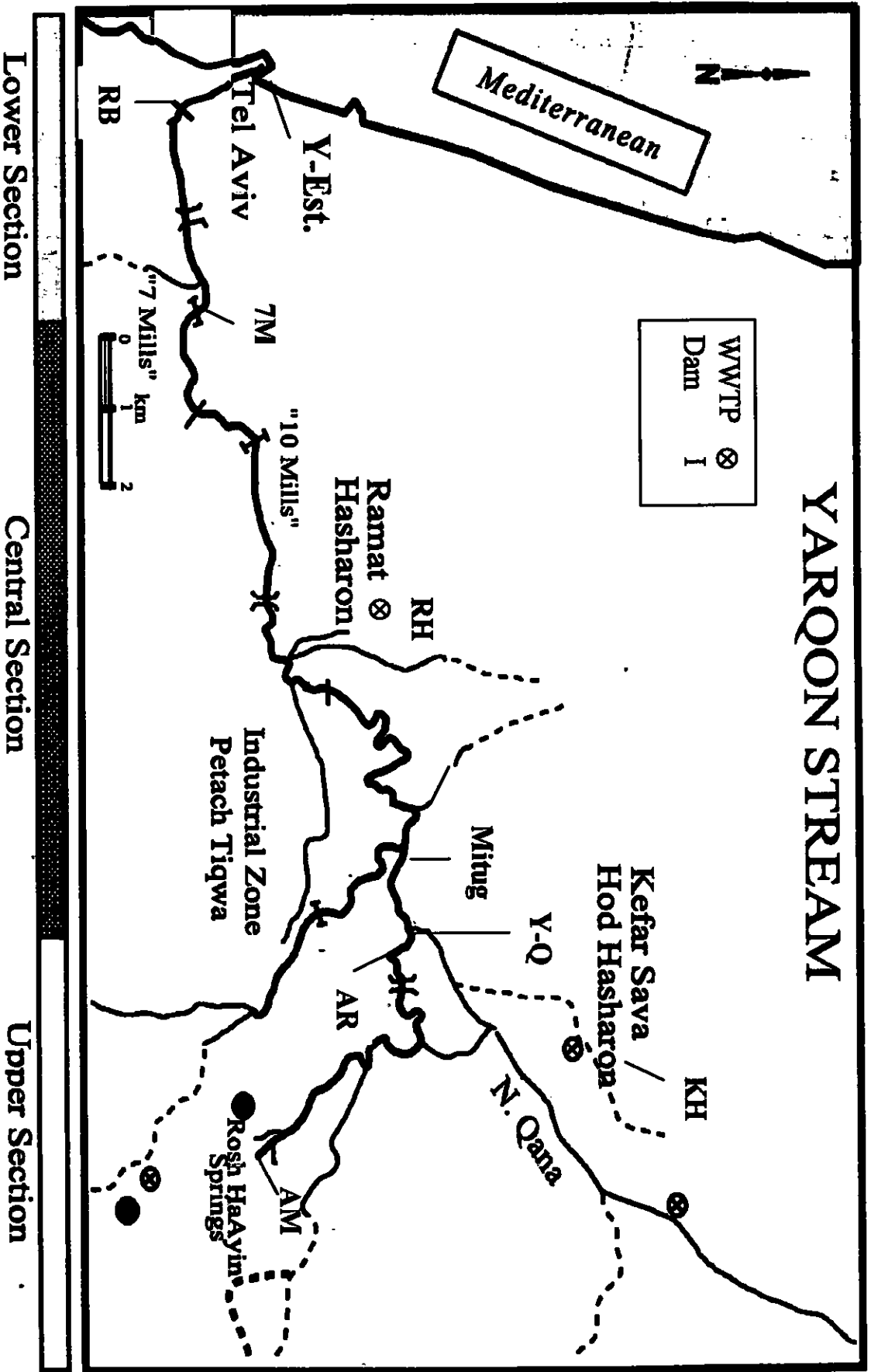


Figure 2.1: Sampling stations along the Yarqon stream basin.

## 2.2 חיות הניסוי

הניסויים בעבודת מחקר זו נערכו רובם באמנון מכלוא שהנו תוצר הכלאה של נקבת אמנון היאור וזכר של אמנון הירדן (*Oreochromis niloticus x O. aureus*). הדגים הובאו למעבדה כשהם בני 6-8 חודשים ובמשקל של 100-200g מבריכות גידול הדגים של הקיבוצים המעפיל ועין חרוד מאוחד. מיני דגים נוספים ששימשו למחקר הם קיפון טובר (*Liza ramada*) שנרכש ממדגה קיבוץ המעפיל וזן אמנון כלאיים נוסף (*Oreochromis mossambicus x O. aureus*) שנרכש מחברת "דגי איכות" בנמל אשדוד.

הדגים הוחזקו במעבדה במכלי פלסטיק בנפח של 690 ליטר, בטווחי טמפרטורה של  $18^{\circ}\text{C}$  -  $24^{\circ}\text{C}$ . המים אווררו באופן רציף באמצעות משאבות אוויר וסוננו באמצעות פילטר ביולוגי. אחת לשלושה ימים ניתנו לדגים פתיתי מזון יבש מאותו סוג שקיבלו בבריכות הגידול. הדגים עברו אקלום לתנאי המעבדה שבועיים לפחות לפני תחילת הניסויים. כל קבוצת דגים שהובאה מן המדגה הוגדרה כאסופה, והניסויים השונים כללו דגים מאותה אסופה. רמת הרקע של הפרמטרים הביוכימיים הנבדקים בעבודה זו נקבעה עבור כל אסופה בנפרד.

באתרים שונים בנחל הירקון נידוגו דגים מהמינים הבאים: אמנון מצוי (*Tilapia zillii*), אמנון גליל (*Sarotherodon galilaeus*), קרפיון מצוי (*Cyprinus carpio*), וקיפון טובר. הדגים הוגדרו על פי המגדיר לדגי נחלים ואגמים בישראל (גורן ועמיתיו, 1999). מייד לאחר הילכדם הושמו הדגים בקרח והועברו ישירות למעבדה לאנליזה ביוכימית. כאתר ייחוס שימש מדגה קיבוץ המעפיל, שנמצא על ידינו כנקי יחסית משאריות תרכובות בעלות רעילות ביולוגית.

אורכם הכללי (TL) של הדגים נמדד בסרגל בדיוק של 0.1 ס"מ ומשקלם נקבע במשקל אנליטי ברמת דיוק של 0.1 גרם. רקמות הכבד, המוח והזימים הוסרו לטובת האנליזות הביוכימיות. מיני הדגים שנלכדו בירקון ומאפייניהם מופיעים להלן בטבלה 2.2.

**Table 2.2: Fish species sampled from the Yarqon stream (Values are means  $\pm$  SD)**

Species	n	Site	T. Length (cm)	Weight (g)	Primary diet*	Habitat*
<i>S. galileus</i>	9	AM	30.0 $\pm$ 1.2	542.9 $\pm$ 56.8	Algae, small benthic fauna and fine organic debris	Slow flowing freshwater, brackish water
	5	Above 7M	13.5 $\pm$ 3.3	65.1 $\pm$ 47.9		
<i>C. carpio</i>	12	AM	15.1 $\pm$ 5.3	64.6 $\pm$ 64.5	Omnivorous, benthic fauna, plankton, algae, aquatic plants	Benthopelagic, freshwater, brackish water
	11	Up Yarqon	11.1 $\pm$ 3.0	32.9 $\pm$ 25.7		
	7	7M	30.8 $\pm$ 5.3	502.3 $\pm$ 190		
<i>L. ramada</i>	20	Y-Estuary	24.5 $\pm$ 2.8	109.7 $\pm$ 36.5	Plankton, detritus, benthic organisms	Neritic, lagoons, river estuaries
	24	Below 7M	14.4 $\pm$ 1.7	31.1 $\pm$ 11.9		
<i>T. zillii</i>	6	Above 7M	17.1 $\pm$ 0.6	89.8 $\pm$ 15.4	Herbivorous, water plants, small fauna	Freshwater, river estuaries

\*Diet & habitat selections derived from "Plants and Animals of the land of Israel", Vol.4, 12.

### 2.3 שיטות חשיפה של דגים למי הירקון ומקורותיו

הדגים ששימשו למחקר זה נחשפו למי הירקון ומקורותיו בארבעה אופנים שונים:

1. דייג - באתרים שונים לאורך נחל הירקון נידוגו דגים באמצעים שונים. הדייג במאגר חברת מקורות בראש העין היה דייג קבוצתי שנעשה באמצעות רשת גריפה (beach seine). רשת זו הנה ארוכה וצרה, בחלקה העליון שזורים מצופים ובתחתון משקולות עופרת. השיטה היא לבודד את הדגים בין הרשת לחוף ואזי לעלות לחוף כשהרשת מתוחה. המוצא היחידי של הדגים הוא שק הנמצא במרכז הרשת. שיטה זו אפשרית רק בגופי מים רדודים יחסית בעלי קרקעית מתונה ולא מסולעת.

במעלה הנחל נעשה שימוש בדייג חשמלי באמצעות אלקטרו-שוקר (EFKO דגם 6000, מתח עבודה 350-450 וולט, זרם ישר של 15-20 אמפר). המכשיר מהמם את הדגים באמצעות זרם חשמלי ואלו עולים וצפים על פני המים ואזי מתאפשר איסופם. השימוש במכשיר אפשרי רק באזורים רדודים בחלקו המתוקים של הנחל.

קיפונים משפך נחל הירקון התקבלו באדיבותם של דייגים חובבים אשר השתמשו בתכות וברשת קלע (cast net) שהיא רשת עגולה המושלכת בתנועה מהירה על להקת הדגים.

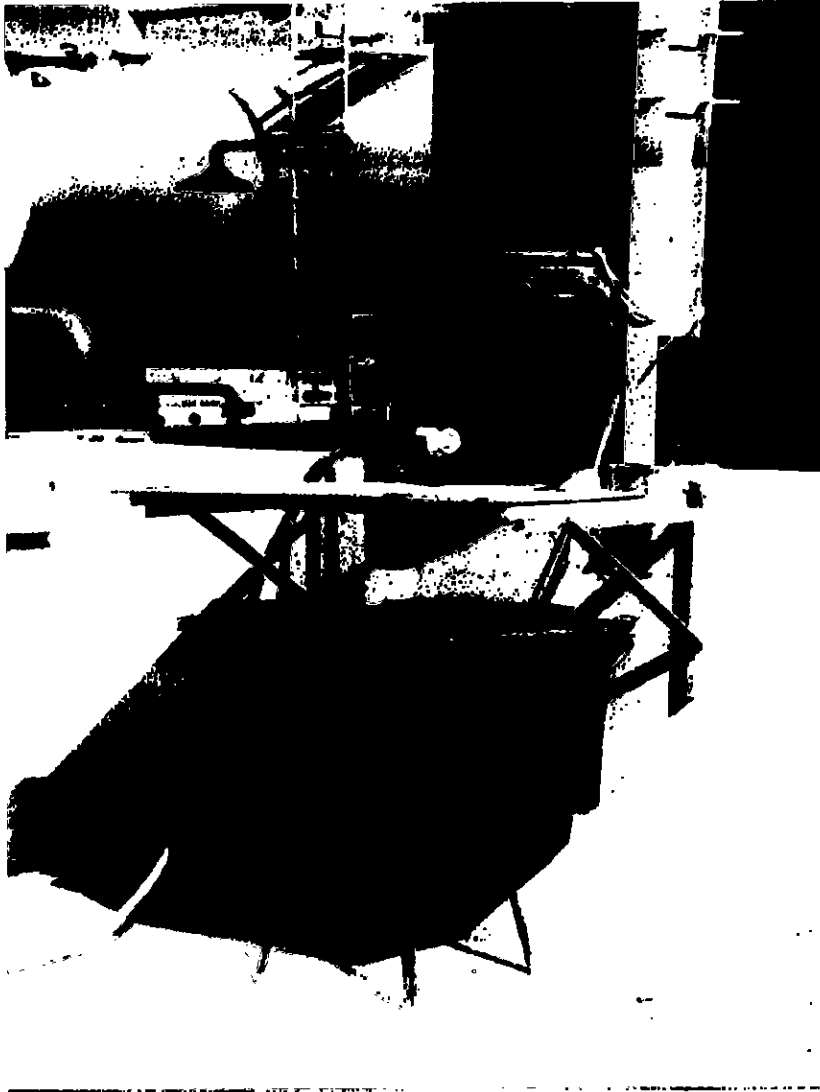
במסגרת עבודות ארכאולוגיות שהתבצעו, בספטמבר 2001, באתר שבע טחנות בירקון נותקה ורוקנה בריכת המים מתחת למפל שבע טחנות. במקום נלכדו מאות דגים ממינים שונים. נעשה איסוף מדגמי של המינים הרלבנטיים למחקר כאשר שאר הדגים הועברו לנחל במעלה המפל. אמנון מצוי וקיפון טובר, היו המינים הדומיננטיים ביותר מבחינה מספרית בבריכה זו. מיני דגים

נוספים שנמצאו במקום היו צלופח אירופי (*Anguilla anguilla*), גמבוזיה (*Gambusia affinis*), אמנון גליל, אמנון מכלוא, קרפיון מצוי ושפמנון מצוי (*Claris gariepinus*). הדגים שנתפסו בשיטות הדייג השונות הושמו בקרח מייד לאחר הילכדם והועברו ישירות למעבדה לשם ביצוע האנליזות הביוכימיות.

2. חשיפת דגים בכלובים - דגים הושמו בכלובי רשת (*in situ*) במי הנחל באתרים שונים לפרקי זמן של יומיים ועד 21 יום בהתאם לשרידות הדגים. כלובי הרשת ששימשו לחשיפת אמנוני המכלוא היו במבנה תיבה בגודל של 45x30x21 ס"מ. עבור הקיפונים נבנו כלובים גדולים יותר מרשת פלסטיק בעלת חורים בגודל 2x2 ס"מ. כלובים אלו נבנו בצורת גליל באורך 1.2 מטר ובקוטר של 0.5 מטר.

3. חשיפת דגים לדגימות מים - דגי אמנון מכלוא נחשפו באקווריום במעבדה לדגימות מים שנלקחו במכלים מאתרים שונים בירקון. משך החשיפה בניסויים השונים השתנה ממספר שעות ועד 30 יום בהתאם לאיכות המים כפי שהתבטאה בשרידות הדגים. מדגמי מים מאתרים מזהמים אשר גרמו למוות של דגי הניסוי דוללו במי ברז עד להתייצבות שיעור התמותה. דגים מאותה אסופה שנחשפו במקביל למי ברז מאווררים היוו את קבוצת הביקורת לניסויים.

4. מערכת זרימה רציפה (Continuous flow through system) - במכון טיהור השפכים ברמת השרון הוקמה על ידי מערכת ניטור ביולוגית בזרימה רציפה *on site* (איור 2.2). צינור שחובר למי המוצא של המכון היוצאים לנחל הירקון הזין באופן רציף את המערכת. מי המוצא של מכון רמת השרון עברו בתום הטיפול השלישוני חיטוי באמצעות כלור. אחת ליממה, בשעות קבועות נעשתה הכלרה מסיבית יותר במטרה לטהר את מסנני החול של הטיפול השלישוני. רמות הכלור הנותר הגיעו בעיקר בשעות הבוקר לרמות שהן קטלניות (מעל 2 mg/l) עבור הדגים. לכן היה צורך להוריד את רמת הכלור הנותר לרמה הנמוכה מ- 0.3 mg/l. על מנת לפתור את בעיית רמת הכלור הגבוהה הוזרמו המים תחילה למיכל השהיה לשם אוורור ונידוף הכלור החופשי. ממיכל השהיה המים ירדו בכוח הגרביטציה אל מיכל בנפח 130 ליטר שבו שהו הדגים. הספק המערכת הממוצע היה כ- 1/2 ליטר לדקה כך שנפח מיכל הדגים התחלף אחת לארבע שעות לערך. בבדיקות שערכנו, רמות הכלור הנותר אכן ירדו לאחר השהיה לרמות שאינן קטלניות עבור הדגים (0.1-0.2 mg/l).



**Figure 2.2:** On-site continuous flow-through system at Ramat HaSharon wastewater treatment plant.

#### **2.4 חשיפה מבוקרת למזהמים המשרים אינדוקציה של ציטוכרומי P450**

חשיפה מבוקרת למזהמים הידועים כמשרנים לציטוכרומי P450 ספציפים התבצעה בשני אופנים :

1. **חשיפה בהזרקה** – בניסויים אלו הוזרק המשרן ישירות לחלל הבטן של הדג (intraperitoneal), כאשר שמן תירס משמש כנשא. המנה הכוללת ניתנה בפעם אחת או בשלוש פעמים כאשר במקרה האחרון המרווח בין מנה למנה היה שלושה ימים. ארבעה ימים לאחר המנה האחרונה נקטלו הדגים. לדגי הביקורת הוזרק שמן תירס בלבד.



2. חשיפה במערכת זרימה כימוסטטית – במעבדה נבנתה מערכת זרימה רציפה (איור 2.3). המערכת מקבלת אספקת מי ברז רצופה העוברים תחילה סינון בפחם פעיל. המים המסוננים מוזרמים למיכל השהיה המאוורר ברציפות באמצעות צינוריות אוורור. ההשהיה והאוורור נועדו לשם הבטחת דכלורינציה ורווית חמצן מומס במים. ממיכל ההשהיה יורדים המים באמצעות משאבה זו ראשית השואבת מים לאקווריום הדגים וממנו החוצה בהספק זהה. נפח אקווריום הדגים הוא 80 ליטרים וקצב תחלופת המים תוכנן כך שתכולת האקווריום כולה התחלפה אחת לשעתיים לערך. האקווריום חולק לארבעה תאים באמצעות מחיצות רשת במטרה למנוע תקיפות הדדיות של האמנונים הידועים בהתנהגות טריטוריאלית.

תמיסה המכילה את תרכובת הרעל הנבדקת בריכוז מוגדר הוזרמה בהספק קבוע ישירות לאקווריום הדגים באמצעות משאבת מינון פריסטטלית. משאבת יניקה שאליה חובר צינור מחורר שהונח לרוחבו של האקווריום, הבטיחה את פיזור התמיסה באופן דומה בין ארבעת התאים. דגי הניסויים השונים עברו אקלום של שלושה, ארבעה ימים במערכת טרם התחלת החשיפה לתמיסת הרעל. זמני החשיפה נעו בין שלושה לחמישה ימים. קבוצות הביקורת נחשפו במערכת למים בלבד לאותם פרקי זמן. בתום החשיפה נלקחו הדגים לאנליזה ביוכימית.

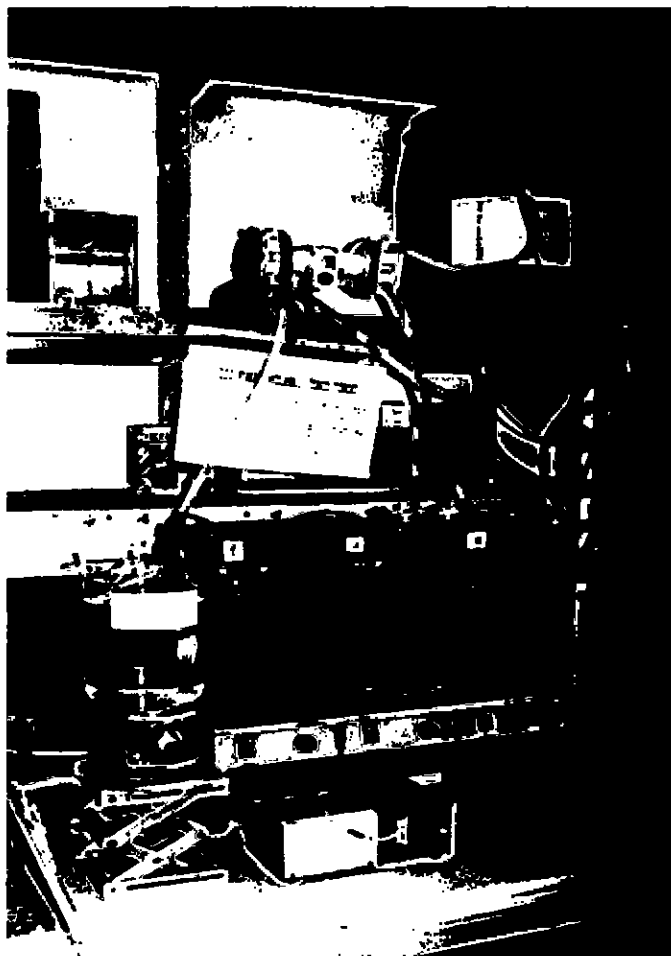


Figure 2.3: Chemostatic continuous flow through system at the laboratory.

