

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  
מכון לחקר שמירת הטבע

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).

ציטוכרום 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 / או חשופה יותר להתקפה בידי אנזימי דטוקסיפיקציה נוספים (Okita and Siler-Masters, 1997).

ציטוכרום P450 מקטלזים ריאקציות אוקסידטיביות מסוגים שונים בהן הידרוקסילציה, אפוקסידציה, דאלקילציה ועוד (Guengerich and Shimada, 1991). סוגים מסוימים של ציטוכרום P450 מבצעים קטליזות נוספות, השונות מהעברת אטום חמצן. כך למשל, ישנן ריאקציות חימצון שבהן מעורב ניתוק של קשר C-C או N=C, 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:

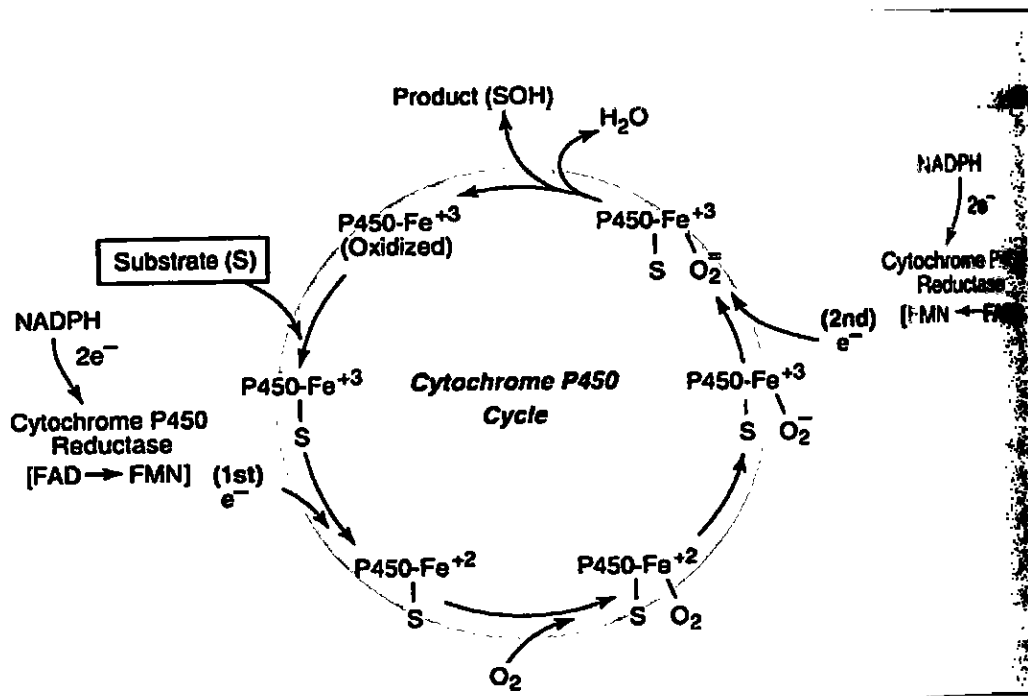


Figure 1.1: Sequence of reaction at cytochrome P450 (after Okita and Siler-Masters, 1997).

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 בפוטנציאל 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.

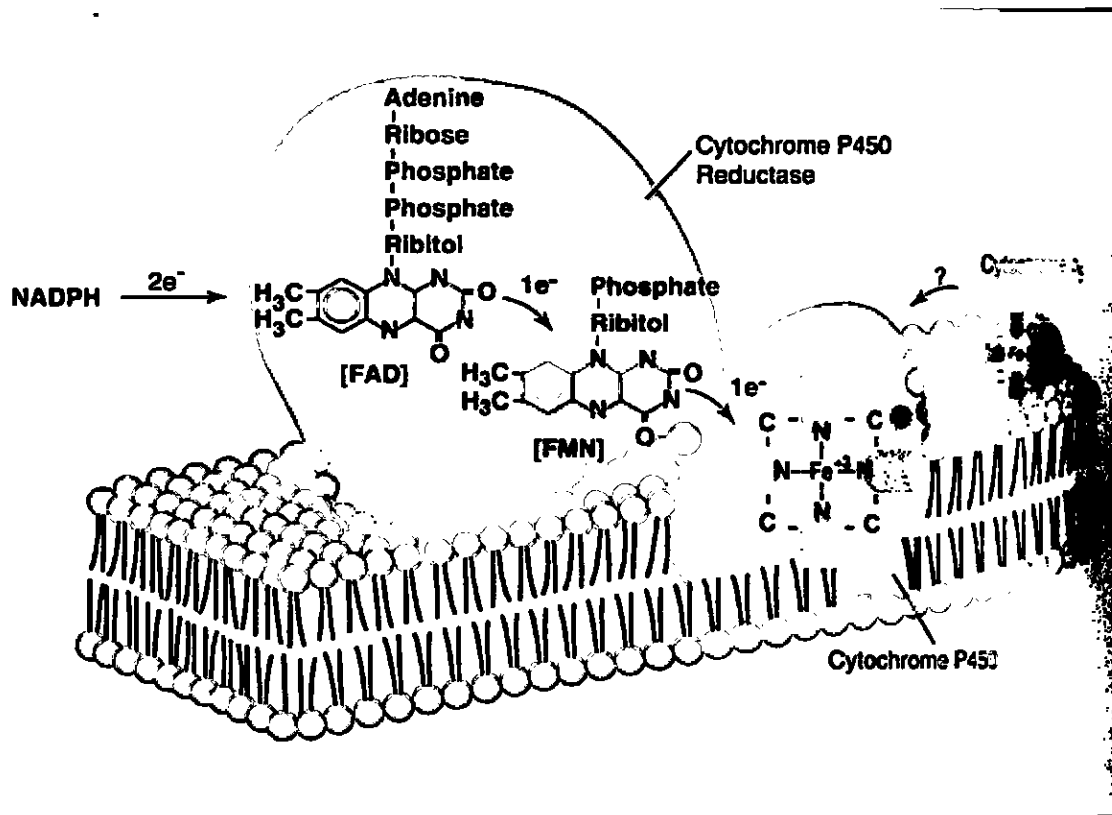


Figure 1.2: Components of the microsomal cytochrome P450 system (after Okita and Siler-Masters, 1997).

### 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.

מאז 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 קונסטיטוטבי 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, parathion, Cd	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 et al., 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 et al., 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 et al., 1999; Klotz et al., 1986; Miranda et al., 1990; Siegeman et al., 1997.
CYP2E-like	chemical carcinogenesis, hepatic toxicity	N-nitroso-diethylamine, ethanol, diabetes, starvation	NR	chlorzoxazone and p-nitrophenol hydroxylation	Antibodies to rat 2E1 cross reacted with topminnow (fish) liver induced by ethanol.	Kaplan et al., 1991; Siegeman, 1993; Wall and Crivello, 1998, 1999.
CYP2K	steroids metabolism	AFB1, testosterone, diethylthiocarbamate	imidazoles, ANF, ellipticine	BEND, LA-OH,	Trouit 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 et al., 1998; Haasch et al., 1998; Miranda et al., 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 et al., 1998; Haasch et al., 1998; Yang et al., 1998.
CYP2N	fatty acids metabolism	benzphetamine, arachidonic acid.	TPA	BEND, minimal ARODs activities	Related to mammalian CYP2J2 and similiary function as fatty acid epoxigenase and hydroxylase.	Oleksiak et al., 1997, 2000.
CYP2P	fatty acids metabolism	benzphetamine, arachidonic acid.	NR	NR	New CYP subfamily founded in killifish. Related to mammalian CYP2P3.	Oleksiak et al., 1997; Siegeman, 2000.
CYP3A	steroids and drugs metabolism, salt balance	therapeutic drugs, steroids, glucocorticoides, PCN	parathion, ANF, ISF, imidazoles, PBO, ABT	Steroid 6 $\beta$ -OH, BEND, EMND, T6H, PROG-OH	Fish and mammalian 3A are immunochemically related proteins. Multiple CYP3A proteins may exist in some teleost fish species.	Buhler and Wang-Buhler, 1998; Cok et al., 1998; Lee et al., 1998; Miranda et al., 1998.
CYP4T	NR	NR	NR	NR	A new subfamily which is closet resemblance to mammalian CYP4B family.	Falckh et al., 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 למשך 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 במשך 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. הפרומטור לגן *CYP1A1* מושתק בהיעדרו של ה-enhancer. לאחר הקישור של AhR/Arnt מועבר אות לאינדוקציה מן ה-enhancer לפרומטור, מתחיל שעתוק של הגן ולאחריו עליה ברמות ה-*CYP1A* mRNA, סינתזה מחודשת של החלבון *CYP1A* ולבסוף, הגברה של הפעילות הקטליטית של *CYP1A*.

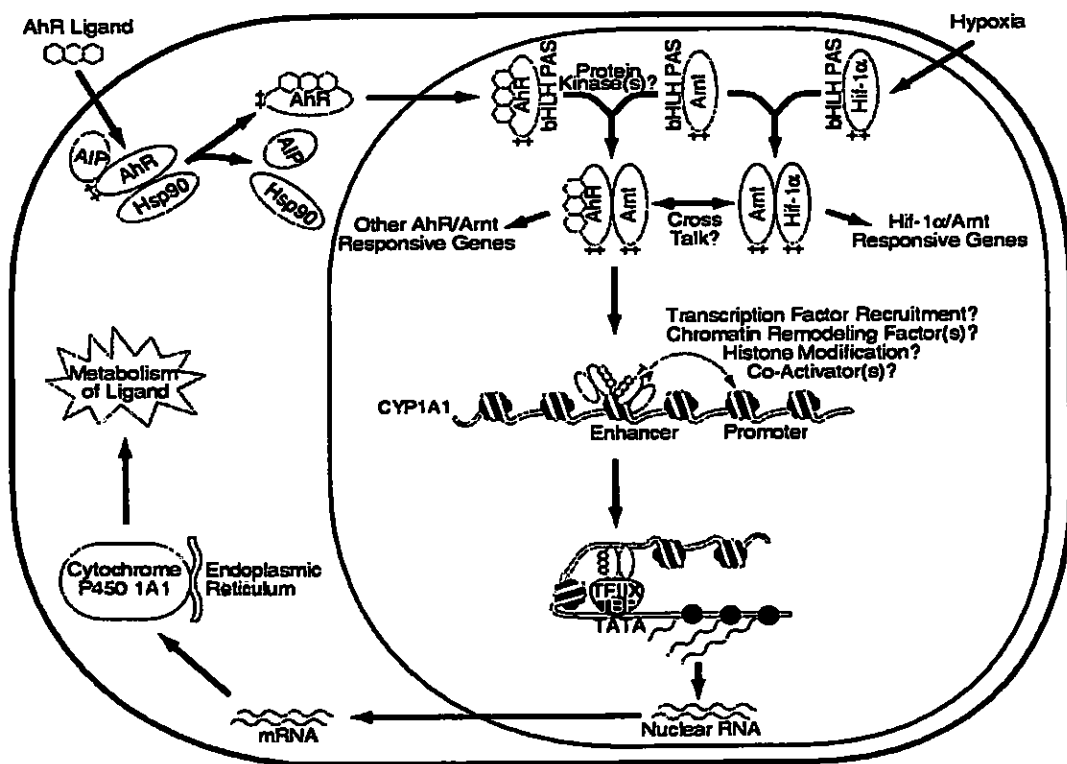


Fig. 1.3: A model for cytochrome P4501A1 induction (derived from Whitlock, 1999).

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 זווחו 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 האנזים.

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).

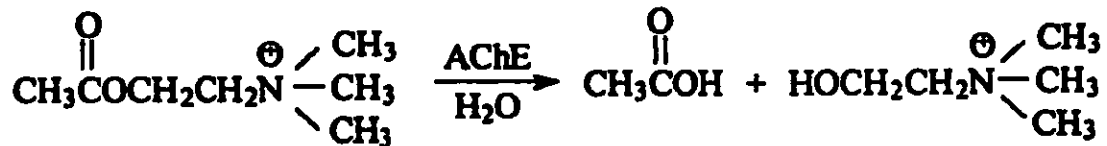
ההשפעה הרעילה החשובה ביותר של TCE היא השפעה נרקותית על מערכת העצבים המרכזית (Maekinen *et al.*, 1988). לאחר בליעה אורלית, ה- TCE נעלם במהירות מן הדם ומצטבר באופן מועדף ברקמות שומן (Anderson, 1985) וברקמות עצביות עתירות שומן (Cohr, 1986 cited in White *et al.*, 1997). הנוירוטוקסיות של TCE עשויה להיות 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).

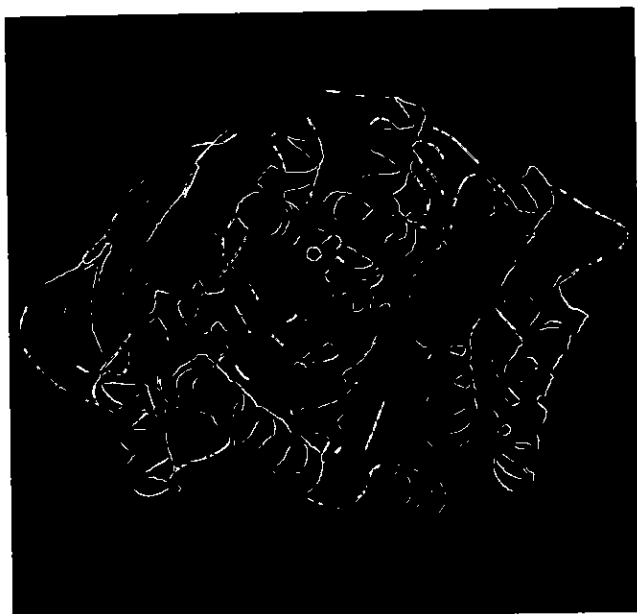


Fig. 1.4: 3D structure of AChE from *Torpedo marmorata* (derived from Legay, 2000).

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).

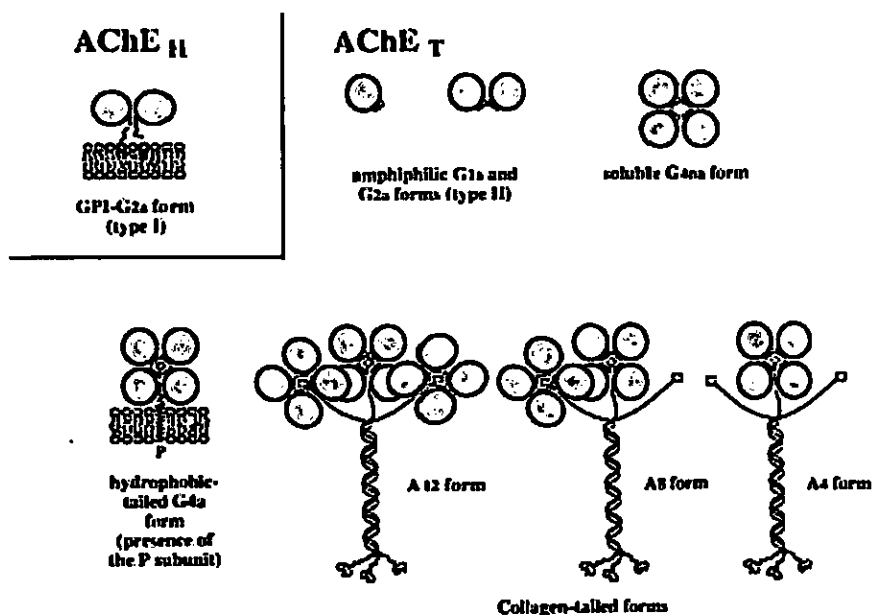


Figure 1.5: Differential molecular forms of AChE (after Massoulié *et al.*, 1993a)

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

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 למטבוליטים 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.

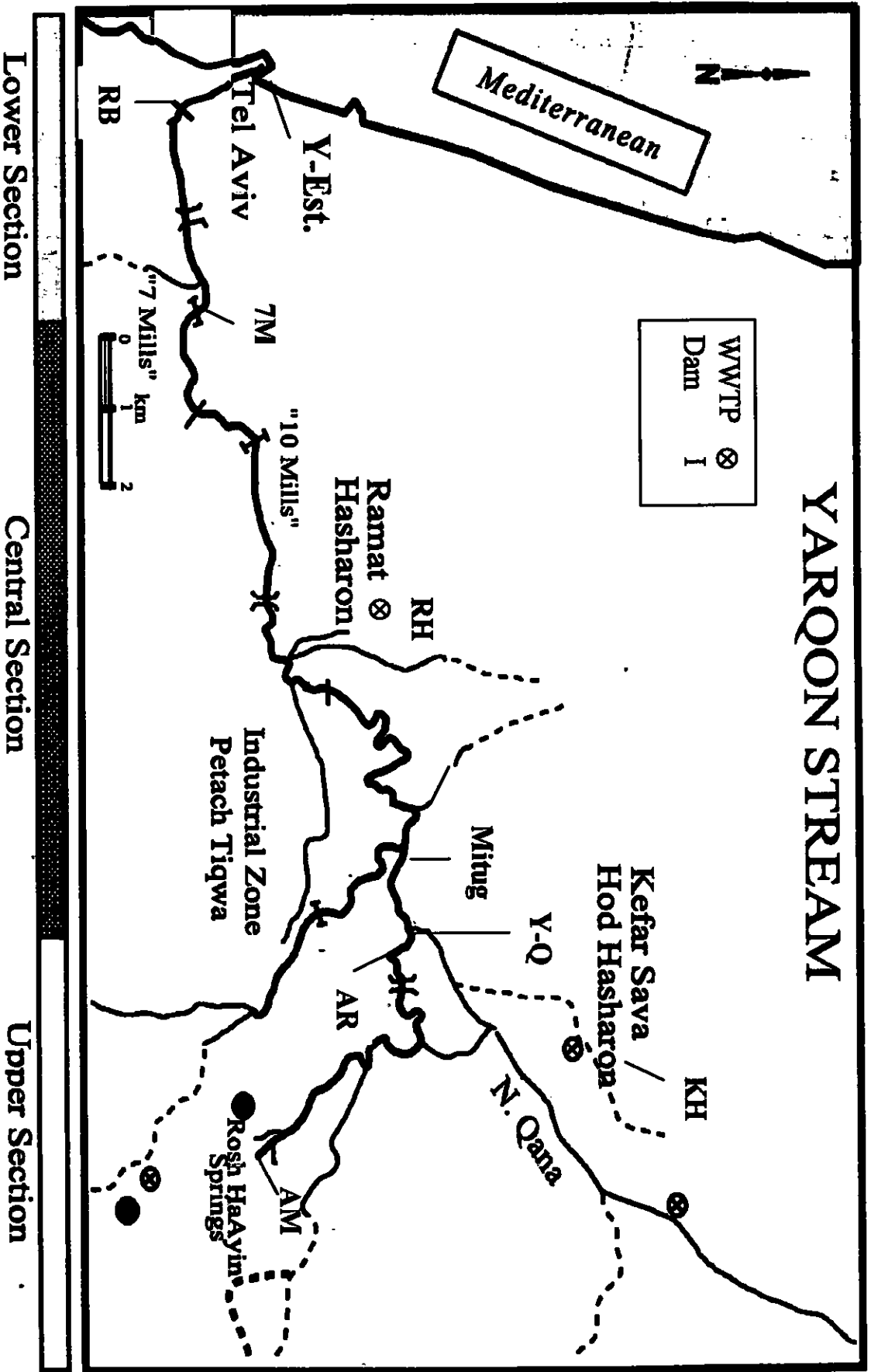


Figure 2.1: Sampling stations along the Yarqon stream basin.

## 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 בחלקי 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.

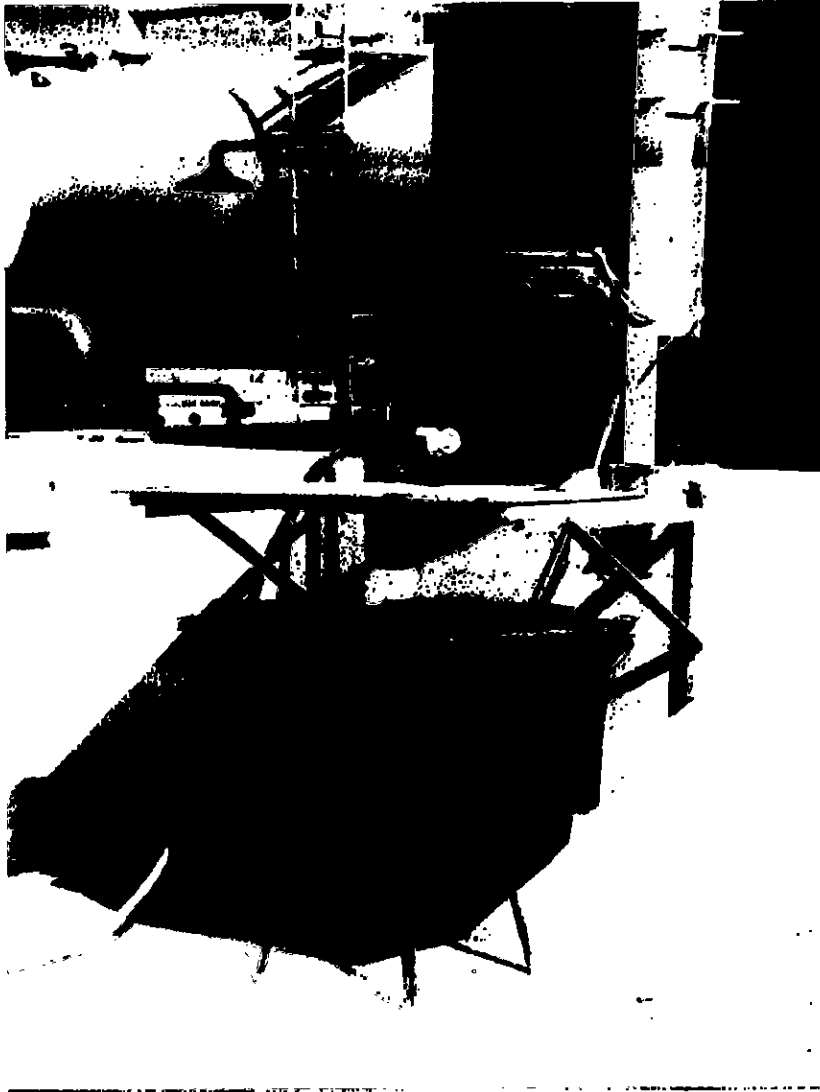
במסגרת עבודות ארכאולוגיות שהתבצעו, בספטמבר 2001, באתר שבע טחנות בירקון נותקה ורוקנה בריכת המים מתחת למפל שבע טחנות. במקום נלכדו מאות דגים ממינים שונים. נעשה איסוף מדגמי של המינים הרלבנטיים למחקר כאשר שאר הדגים הועברו לנחל במעלה המפל. אמנון מצוי וקיפון טובר, היו המינים הדומיננטיים ביותר מבחינה מספרית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

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.

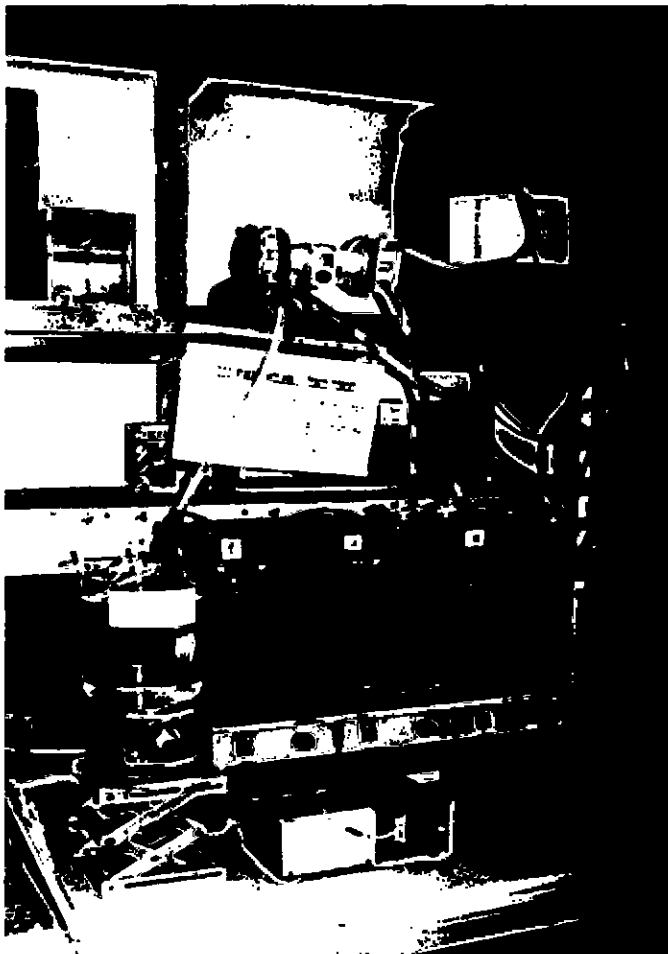


Figure 2.3: Chemostatic continuous flow through system at the laboratory.

## 2.5 אנליזת פעילות האנזים אצטילכולינאסטראז.

רקמות הזימים והמוח הוסרו לשם אנליזה ביוכימית של אצטילכולינאסטראז. בשלבים מאוחרים יותר של העבודה נבדקה פעילות האנזים גם ברקמת הכבד. קשתות הזימים הוסרו בשלמותן ונוקו היטב משאריות הדם. לאחר מכן הופרדו עלעלי הזימים (gill filaments), מקשת הזימים הסחוסית. רקמת הכבד נשטפה לאחר הוצאתה בבופר (pH=7.4) 50mM Tris HCl עם 0.15M KCL לשם ניקוי שאריות הדם והמרה. הרקמות השונות נשקלו ונכתשו באמצעות הומוגניזר חשמלי עם בוכנת טפלון. בופר ההומגניזציה כלל (pH=7.4), 0.1M  $K_2HPO_4$ , ביחס 0.1 גרם רקמה ל- 1 ml בופר מקורר ל- 0°C (Yawetz *et al.*, 1993b). ההומוגניזציה נעשתה על פי השיטה הספקטרופוטומטרית של האנזים אצטילכולינאסטראז. קביעת הפעילות נעשתה על פי השיטה הספקטרופוטומטרית של Ellman *et al.* (1961). השיטה מתבססת על עליה בצבע הצהוב הנוצרת מתגובה בין הסובסטר acetylthiocholine iodide לראגנט הצבע 5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid ב- 2.5ml בופר 0.1M  $K_2HPO_4$  (pH = 8.0). הריאקציה החלה ע"י הוספה של 50  $\mu$ l מהומוגניזט הזימים או הכבד ולחילופין 25  $\mu$ l מהומוגניזט מוח. מעקב אחר התפתחות הריאקציה נעשה במשך 3 דקות, באורך גל של 412 nm בספקטרופוטומטר ממוחשב בעל קרן כפולה דגם V-530, תוצרת JASCO, יפן.

## 2.6 הכנת מיקרוזומים מרקמת הכבד

לאחר הדיסקציה של רקמת הכבד היא נשטפה בבופר כמתואר לעיל. לצורך הכנת המיקרוזומים נלקחו עד 2gr מהרקמה. במקרים שבהם משקל הכבד היה נמוך מ- 0.5g אוחדו רקמות ממספר פרטים. הרקמות נכתשו בהומוגניזר חשמלי בבופר (pH=7.4) 50mM Tris HCl עם 0.15M KCL. ההומוגניזציה שהתקבלו סורכזו באולטרצנטריפוגה מסוג BECKMAN Model L5-50 למשך 10 דקות ב- 9,000xg ולאחר מכן 10 דקות נוספות ב- 12,000xg. בשלב זה, ההומוגניזטים עברו סינון דרך גזה רפואית להרחקת המשקעים והנוזל העליון הוכנס לסרכוז נוסף במשך 90 דקות ב- 105,000xg. התהליך כולו נעשה בתנאי קור. בסופו של תהליך זה מתקבל משקע של הממברנות של הרטיקולום האנדופלסמי (קרי מיקרוזומים), אליהן קשורים בין היתר חלבוני מערכת P450. המיקרוזומים הורחפו בבופר (pH=7.4) 50mM Tris HCl שהכיל 1mM EDTA, 1mM DTT ו- 20% גליצרול. היחס בין בופר ההרחפה למשקל הכבד שנכתש היה 1ml : 1gr. מבחנות המיקרוזומים הוחזקו בחנקן נוזלי (-170°C) עד ביצוע הבדיקות השונות.

## 2.7 תכולת חלבון כללית

תכולת החלבון הכללית במיקרוזומים מן הכבד נקבעה לפי שיטת Bradford (1976), תוך שימוש בסרום אלבומין (BSA) כסטנדרט.

## 2.8 קביעת תכולת ציטוכרום b<sub>5</sub>

קביעת תכולת ציטוכרום b<sub>5</sub> נקבעה בהתאם לשיטה של Omura and Sato (1964). התכולה נקבעה באמצעות ספקטרום הפרש הבליעה בתחום אורכי הגל 400-450 nm בין מיקרוזומים מחוזרים עם NADH לבין מיקרוזומים מחומצנים. לשם ביצוע הבדיקה דוללו המיקרוזומים בבופר 0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=7.4). ספקטרום הפרש הבליעה מתקבל בין 409-424 nm תוך שימוש במקדם בליעה של 185 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Estabrook and Werringloer, 1978). התכולה הספציפית התקבלה לאחר חילוק התוצאה בתכולת החלבון הכללית.

## 2.9 קביעת תכולת ציטוכרום P450

תכולת P450 נקבעה מספקטרום ההפרש עם CO בהתאם לשיטה של Omura and Sato (1964). 100µl מהפרקציה המיקרוזומלית דוללו פי 15 בבופר 0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH= 7.4). אל המבחנה בועבע גז CO במשך 60 שניות. הדוגמה חולקה לשתי קיווטות ולאחת מהן הוספו מספר גרגרים של החומר המחזר sodium dithionite. תכולת ציטוכרום P450 נקבעת על פי ספקטרום הפרש הבליעה בין מיקרוזומים קשורי CO למיקרוזומים שקשרו CO אך לא חוזרו. הקריאה התבצעה בספקטרופוטומטר בתחום אורכי הגל 400-500nm כאשר מקדם הבליעה המולרי שבו השתמשנו היה 91 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Estabrook and Werringloer, 1978). התכולה הספציפית התקבלה לאחר חילוק התוצאה בתכולת החלבון הכללית. קביעות תכולת החלבון הכללית והספציפיות נעשו באמצעות ספקטרופוטומטר ממוחשב בעל קרן כפולה דגם V-530, תוצרת JASCO, יפן.

## 2.10 קביעת הפעילות הקטליטית של ציטוכרום P4501A באמצעות ריאקציה (EROD) 7-ethoxyresorufin-O-deethylase

בריאקציה זו מוסיפים את הסובסטרט 7-Ethoxyresorufin לפרקציה המיקרוזומלית. חומר זה ידוע כסובסטרט העובר דאלקילציה על ידי האנזים P4501A. ריכוז הסובסטרט היה 2 µM, וכמות החלבון המיקרוזומלי 100 µg. שלבי העבודה היו כמתואר על ידי Burke and Mayer (1974). הסובסטרט הוכן בריכוז המתאים בתוך תמיסה שהכילה: 7.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35 mM

Glucose-6- $\text{P}$  ו-  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH=7.4), 0.25mM NADP, 2.5mM Glucose-6-Phosphate  
Phosphate dehydrogenase : 2 unit/ml. בריאקציה NADP הופך ל- NADPH בצורה רציפה  
בעקבות הריאקציה המתרחשת בין G-6-P לבין האנזים G-6-P-D.

#### אופן ביצוע הריאקציה:

1. הכנת מבחנות עם 100 $\mu\text{g}$  חלבון מיקרוזומלי אשר נפחם הושלם ל- 100 $\mu\text{l}$  עם בופר המכיל  
0.8mM HEPES 200mM Sucrose ו-20% גליצרול, pH=7.4.
2. אל מבחנות המיקרוזומים הוסף 1ml סובסטרט הכולל G-6-P-D 2 unit/ml. הריאקציה  
התפתחה באמבט טלטול במשך 5 דקות ב- 30 $^{\circ}\text{C}$ .
3. 2ml אצטון קר הוסף לשם סיומה המיידית של הריאקציה.

מבחנת הרקע מכילה אותם מרכיבים אך ללא האנזים G-6-P dehydrogenase. לאחר הוספת  
האצטון המבחנות עורבבו היטב בוורטקס והוכנסו לצנטריפוגה ב- 9,000xg למשך 5 דקות במטרה  
להשקיע את החלבונים. בסיום הסרכוז מתקבלת תמיסה צלולה שנלקחת לקריאה בפלואורומטר.  
כדי לקבוע את רמת הפעילות נקבע סטנדרט של 100pmol Resorufin, שהוא תוצר הפרוק של-7  
ethoxyresorufin. הסטנדרט הכיל 100 pmol resorufin, מומס ב- DMSO, בתוך 1 ml בופר  
(pH=7.4) 0.8 mM HEPES, 200 mM Sucrose, 20% glycerol, ו- 2ml אצטון קר. אורך הגל  
של ה- excitation (עירור האלקטרונים ומעבר ממצב בעל אנרגיה נמוכה יותר למצב בעל אנרגיה  
גבוהה יותר) היה 537 nm. ואילו אורך הגל של ה- emission (אורך הגל של פליטת האנרגיה) היה  
583 nm. על ידי חילוק בכמות החלבון הכללית התקבלה הפעילות הספציפית.

### **2.11 קביעת תכולה ספציפית של ציטוכרומי P450 באמצעות נוגדנים (Immunoblotting)**

קביעת התכולה הספציפית של ציטוכרומי P4501A ו- P4502E-like בכבד הדגים נעשתה  
באמצעות שימוש בנוגדנים. הפרדת חלבונים נעשתה על גבי Bis-Tris gels, מסוג Nupage Mops  
של חברת Novex. התהליך משמש להפרדת שרשרות פוליפפטידיות על פי מישקלן המולקולרי.  
תת היחידות מתקבלות לאחר חיזור גשרי S-S עם DTT או mercapthoethanol והפרדת קשרים  
הידרופובים בעזרת SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). קשירת SDS הופכת את החלבונים  
לטעונים שלילית והם מורצים בשדה חשמלי. התהליך נעשה לפי השיטה של Burnette (1981):  
הגל בנוי מגרדיאנט של 4-12% פוליאקרילמיד.

הכנת המיקרוזומים להרצה כללה מיהול המיקרוזומים בבופר STB : Nupage LDS sample .  
הדגימות חוממו במשך 10 דקות בטמפרטורה של  $70^{\circ}\text{C}$  במטרה לגרום לדנטורציה של החלבון.  
לאחר מכן נעשית הזרקת דגימות של  $15\text{ pmol P450}$  לתוך הברות. ההרצה נעשתה במתח של  
 $200\text{V}$  למשך שעה. החלבונים הועברו לממברנת ניטרוצלולוז תחת מתח של  $30$  וולט במשך  $30$   
דקות. כדי לחסום אתרי פעולה לא ספציפיים עוברת הממברנה אינקובציה למשך שעה באמבט  
מיטלטל בטמפרטורה של  $42^{\circ}\text{C}$  עם  $5\%$ (W/V) אבקת חלב מומסת בבופר PBS המכיל:  
 $0.5\text{M KH}_2\text{PO}_4$  ו-  $1.5\text{M NaCl}$  ( $\text{pH}=7.4$ ). אחר כך עובר הניטרוצלולוז לאינקובציה של  
שעתיים ב-  $25^{\circ}\text{C}$  עם הנוגדנים הראשוניים עם טלטול באמבט.

לשם קביעה של תכולת ציטוכרום P4501A השתמשנו בנוגדנים מונוקלונליים (Mab 1-12-3)  
שהופקו מהדג scup (Kloepper- Sams *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1986). לנוגדנים אלו יש מגוון  
רחב של מינים שעיימם הם מגיבים תגובה צולבת, כולל אדם, מכרסמים, זוחלים, דו חיים, יונקים  
ימיים ודגים (Goksøyr *et al.*, 1991; Stegeman and Hahn, 1994). נוגדנים אלו ניתנו לנו  
באדיבותו של John Stegeman (Wood Hole Oceanographic Institution). על מנת לקבוע  
את תכולת ציטוכרום P4502E-like השתמשנו בנוגדנים פוליקלונליים מסחריים, Rabbit anti  
human/rat P4502E1 (AB1252) של חברת Chemicon.

הנוגדנים נמלו בתמיסת PBS/milk (המתוארת לעיל) בריכוז של  $100\mu\text{g/ml}$ . לאחר מכן נשטף  
הניטרוצלולוז למשך 10 דקות בבופר PBS, למשך 10 דקות בבופר PBS המכיל  $10.5\%$  Tween  
ולמשך 10 דקות נוספות שוב בבופר PBS. לאחר השטיפות הניטרוצלולוז עובר אינקובציה למשך  
שעה בטמפרטורה של  $25^{\circ}\text{C}$  עם נוגדנים שניוניים שהם anti mouse alkaline phosphataes  
conjugated. ואז שוב התבצעו 3 שטיפות: 10 דקות בבופר TBS, 10 דקות בבופר  $10.5\%$  TBS  
Tween ולבסוף 10 דקות בבופר TBS.

פיתוח ריאקציה צבע נעשה על ידי אינקובציה עם בופר  $0.1\text{M NaHCO}_2$ , ( $\text{pH}=9.8$ ) המכיל  $1\text{mM}$   
 $0.5\text{ mg/ml MgCl}_2$  ו-  $0.5\text{ mg/ml nitroblue tetrazolium}$ , לאחר התפתחות הצבע נשטף הניטרוצלולוז  
phosphate מומס ב-  $70\%$  dimethylformamide. לאחר התפתחות הצבע נשטף הניטרוצלולוז  
מספר פעמים במים מזוקקים. הממברנות נלקחות לצילום ולאחר מכן קריאת התוצאות נעשית  
באמצעות סריקה בסורק. כמות החלבון נקבעה על פי צפיפות הצבע (שהתפתח בכל דגימה)  
שנמדדה בהשוואה לצפיפות הצבע של כמות ידועה של חלבון P4501A נקי מדג scup (מתנתו של  
J. Stegeman). השוואה זו מבוססת על הנחת העבודה, המקובלת בספרות בעבודות רבות,  
שהתגובה המולרית של החלבון אותו כימתנו הנה אקוויולנטית לזו של דג ה-scup. על כל פנים,

התוצאות שהתקבלו שימשו לשם השוואה יחסית בלבד. עיבוד הנתונים נעשה באמצעות תוכנת Blot-resolve. בחילוק בכמות החלבון הכללית התקבלה התכולה הספציפית של P4501A.

## 2.12 ניתוח סטטיסטי

המבחנים הסטטיסטיים (Piegorisch and Bailer, 1997; Sokal and Rohlf, 1995) כללו מבחני שונות פרמטריים מסוג t-test, ו-one way ANOVA. לצורך בחינת התפלגות נורמלית של הנתונים שימש מבחן Shapiro-Wilk's. מבחן *a posteriori* להשוואה בין ממוצעים היה Student-Newman-Keuls test. לגבי חלק מהפרמטרים שנבדקו נערכה טרנספורמציה במטרה לנרמל את התוצאות: טרנספורמציה  $\sqrt{\% \sin \text{arc}}$  נעשתה לתוצאות שבוטאו באחוזים או פרופורציות, טרנספורמציה log לתוצאות שהתקבלו ממדידת תכולת P4501A ופעילות EROD. טרנספורמציה לוגריתמית לתוצאות פעילות EROD היא הדרך המומלצת לשם קבלת התפלגות נורמלית ושונויות הומוגניות (Flammarion *et al.*, 1998a). מבחני שונות לא פרמטריים שבהם נעשה שימוש היו Kruskal-Walis test, MannWhitney U-test. בחינת רמת המתאם בין פעילות ותכולת P4501A נבחנה במבחן Spearman rank order correlations. בחינת מובהקות קווי רגרסיה נעשתה על ידי multiple regression test. ערכי מובהקות של  $P < 0.05$  התקבלו כמובהקים.

### 3. תוצאות

#### 3.1 קביעת רמות רקע לסמנים הביוכימיים במיני דגי המחקר

לשם ביצוע ניסויי המחקר נרכשו מיני דגים שונים מחוות גידול דגים מכל רחבי הארץ. כל קבוצת דגים (בין 50 ל- 200 פרטים) שהובאה למעבדה הוגדרה כאסופה נפרדת. מיד לאחר קבלתן של האסופות נלקח מהן מדגם אקראי של 5-6 פרטים לפחות. בדגים אלו נעשתה אנליזה של הסמנים הביוכימיים הרלוונטיים למחקר. נתונים נוספים התקבלו מאנליזות ביוכימיות שביצענו במסגרת פרויקט ניטור המוביל הארצי ומאגרי מים שפירים של חברת מקורות. עבור כל מקור אספקה של דגים אוחדו כלל נתוני הרקע לשם קביעת רמת הרקע הממוצעת של הפרמטרים הביוכימיים הרלוונטים למחקרנו.

#### 3.1.1 קביעת רמות הרקע של פעילות האנזים אצטילכולינאסטראז

קביעת רמות הרקע של פעילות האנזים אצטילכולינאסטראז נעשתה ברקמות שונות במיני דגים שונים. אסופות דגי אמנון מכלוא, זן הדג העיקרי בניסיונות המחקר, התקבלו מבריכות הדגים של קיבוצי המעפיל ועין חרוד מאוחד. בנוסף לכך, התקבלו אמנוני מכלוא שמקורם במדגה המעפיל ואשר שהו במשך כ- 60 יום במערכות זרימה רציפות של מי המוביל הארצי. דגי אמנון מצוי וקרפיון מצוי התקבלו מדייג מדגמי במאגרי מים שפירים של חברת מקורות. בדיקות אלה התבצעו במסגרת ניטור איכות מי המוביל ומאגרי מקורות שמבצעת מעבדתנו באזורים שונים בארץ. ממצאי הבדיקות מופיעים להלן בטבלה 3.1:

Table 3.1: Base line AChE activities\* in various fish species from reference sites.

Species	Sites	Gills	Brain	Liver
A	Kibbutz HaMa'apil	6.57 <sup>b</sup> ± 2.30 (84)	17.19 <sup>a</sup> ± 3.35 (84)	9.45 <sup>b</sup> ± 3.82 (33)
	National Water Carrier	7.94 <sup>a</sup> ± 1.94 (35)	19.13 <sup>a</sup> ± 4.47 (36)	14.99 <sup>a</sup> ± 5.33 (18)
	Kibbutz Ein Harod Meuhad	4.29 <sup>c</sup> ± 0.51 (6)	11.89 <sup>b</sup> ± 2.05 (6)	NM
B	Mekorot freshwater reservoirs	5.46 ± 1.69 (6)	16.37 ± 2.93 (6)	7.76 ± 2.70 (6)
C	Mekorot freshwater reservoirs	1.76 ± 0.63 (17)	12.34 ± 3.58 (17)	1.66 ± 0.25 (10)

\*Activities are express as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{per gram tissue}$ . Values are means  $\pm$  SD (n). NM= not measure. Fish species: A; *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, B; *Tilapia zillii*, C; *Cyprinus carpio*. <sup>a, b, c</sup> are significantly different groups at  $P < 0.05$ .

ממצאי פעילות AChE ברקמות המוח והזימים באמנון מצוי וקרפיון מצוי נמצאו דומים בהשוואה לממצאים קודמים של מעבדתנו (מנליס, 2001). השוואה נערכה בין ממצאי פעילות AChE בדגי אמנון מכלוא ממקורות שונים, ששימשו לעבודה הנוכחית (מין A, טבלה 3.1). אמנוני המכלוא שהובאו מקיבוץ עין חרוד מאוחד היו בעלי פעילות AChE נמוכה באופן מובהק ברקמת הזימים ( $P < 0.05$ ) והמוח ( $P < 0.001$ ) ביחס לפעילות של אותן רקמות בדגי מדגה המעפיל. עליה בפעילות האנזימטית נמצאה באמנוני מכלוא שנחשפו במשך כ- 60 יום בשלוש מערכות זרימה רציפה של מי המוביל הארצי בהשוואה לדגי אותן אסופות. עלייה מובהקת של פעילות AChE ברקמת הזימים ( $P < 0.001$ ) וברקמת הכבד ( $P < 0.01$ ). לעומת זאת, בפעילות האנזימטית ברקמת המוח לא הובחנה עלייה מובהקת ( $P = 0.5$ ).

### 3.1.2 קביעת רמות הרקע של מערכת ציטוכרום P450 וציטוכרום b<sub>5</sub> ברקמת הכבד

רמות הרקע של מערכת ציטוכרום P450 וציטוכרום b<sub>5</sub> נבדקו ברקמת הכבד, במיני הדגים השונים. המטרה העיקרית בבדיקה זו היא לבדוק האם קיימת אינדוקציה של ציטוכרום P450A1 בבריכות גידול הדגים. בטבלה 3.2 מוצגים הממצאים לפי מקורות האספקה שמהן התקבלו הדגים. אסופה נפרדת מהווים אמנוני מכלוא שמקורם במדגה המעפיל ואשר נחשפו במשך כ- 60 יום במערכות זרימה רציפות של מי המוביל הארצי.

**Table 3.2: Hepatic microsomal cytochrome P450 and cytochrome b<sub>5</sub> in various fish species brought from different reference sites.**

Species	Site location	n	Microsomal protein (mg/gr liver)	Cytochrome P450 (nmol/mg)	Cytochrome b <sub>5</sub> (nmol/mg)	EROD activity (pmol/min/mg)	P450A content (pmol/mg)
A	Kibbutz HaMa'apil	18	10.09 ± 3.18	0.16 ± 0.10	0.039 ± 0.021	23.86 <sup>b</sup> ± 21.12	2.05 <sup>a</sup> ± 3.52
A	National Water Carrier	9	9.09 ± 2.99	0.16 ± 0.12	0.054 ± 0.045	3.36 <sup>a</sup> ± 4.02	1.56 <sup>a</sup> ± 2.71
A	Kibbutz Ein Harod	12	7.00 ± 1.65	0.23 ± 0.16	0.066 ± 0.046	174.7 <sup>c</sup> ± 88.47	14.11 <sup>b</sup> ± 11.73
A2	Ashdod port	12	9.72 ± 2.73	0.18 ± 0.08	0.042 ± 0.034	27.18 <sup>b</sup> ± 27.16	0.26 <sup>a</sup> ± 0.86
C	Kibbutz HaMa'apil	6	11.71 ± 2.90	0.20 ± 0.05	0.033 ± 0.012	4.29 ± 2.72	13.53 ± 3.39
D	Kibbutz HaMa'apil	9	19.73 ± 3.53	0.09 ± 0.04	0.02 ± 0.01	17.41 ± 6.77	2.70 ± 3.38

Values are presented as means ± SD. Fish species: A; *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, A2; *O. mossambicus* x *O. aureus*, C; *Cyprinus carpio*, D; *Liza ramada*



השוואה נערכה הממצאים בין האמוניים מסוג *Oreochromis* מהמקורות השונים. לאור אי הצלחה באקלום למי מלח של זן אמנון המכלוא, *Oreochromis niloticus x O. aureus*, (ראה סעיף 3.4.2) הוחלט לנסות ולהביא זן אמנון אחר המותאם יותר לשינויי מליחות. באותה תקופה גודל בהצלחה במי ים, ע"י חברת "דגי איכות", הזן *O. mossambicus x O. aureus*. האפשרות להשוואה בין שני זנים אלו מתבססת על מחקר קודם (Ueng and Ueng, 1995) שבו נמצא דמיון רב מבחינת רמת האינדוקציה של ציטוכרום P4501A ופעילויותיו הקטליטיות באמוניים מהסוג *Oreochromis*. בהשוואה שערכתי בין מדגם של אמנוניים שהובאו מנמל אשדוד לבין דגי קיבוץ המעפיל לא נמצאו הבדלים בין מרכיבי מערכת P450 או בתכולת ציטוכרום b<sub>5</sub> (טבלה 3.2). ממצא זה הוא מעניין לאור העובדה שהדגים הוחזקו בפאתי נמל מטענים סואן.

בדגי אמנון מכלוא ששימשו לניטור מי המוביל הארצי ניכרה ירידה מובהקת ( $P < 0.05$ ) בפעילות ותכולת ציטוכרום P4501A ביחס לממצאי דגים מאותה אסופה שנקטלו זמן קצר לאחר הגיעם ממדגה המעפיל. בהשוואה לממוצע הכללי של מספר אסופות דגים שהובאו ממדגה המעפיל (טבלה 3.2), נמצאה פעילות EROD נמוכה פי 7 ( $P < 0.001$ ) בדגי המוביל אך לא נמצא הבדל סטטיסטי בתכולת P4501A. ניתוח הממצאים של אמנוני עין חרוז מתואר בהמשך העבודה (סעיף 3.2.3).

## 3.2 ניסויי אינדוקציה של ציטוכרום P450 ועיכוב AChE באמנון מכלוא

### 3.2.1 אינדוקציית ציטוכרום P4501A באמצעות $\beta$ -naphthoflavone

על מנת לקבל נתוני ייחוס לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A בדג אמנון מכלוא על ידי תרכובות הידרוקרבוניות בוצעו ניסויי הזרקה של  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) שהנו משרן מקובל לציטוכרום זה. לחלל הבטן של הדגים הוזרקו (intraperitoneal) שלושה מינונים שונים של  $\beta$ NF (25, 50, 75 mg/kg body weight) עם שמן תירס כנשא. טיפול בשמן תירס בלבד היווה את קבוצת הביקורת (vehicle control). המינון הסופי התקבל ממתן 3 זריקות כאשר ביניהן ניתן מרווח של 3,4 ימים. 4 ימים לאחר הזריקה האחרונה נקטלו הדגים. כל הדגים ( $n=20$ ), למעט אחד נותרו בחיים עד תום סדרת הטיפולים. כל הטיפולים ב- $\beta$ NF גרמו לעלייה מובהקת ( $P < 0.001$ ) ברמת פעילות EROD ותכולת ציטוכרום P4501A (איורים 3.1, 3.2). המינון הגבוה מבין השלושה גרם לעלייה המשמעותית ביותר בתכולת הציטוכרום (פי 225, ביחס לביקורת) ולעלייה הגבוהה ביותר בפעילות EROD (פי 32.5), אך לא נמצא שונה באופן מובהק מהמינונים הנמוכים יותר. באיור 3.1 ניתן לראות פרוק של החלבון לתת יחידות בדוגמאות מדגים שטופלו ב- $\beta$ NF.

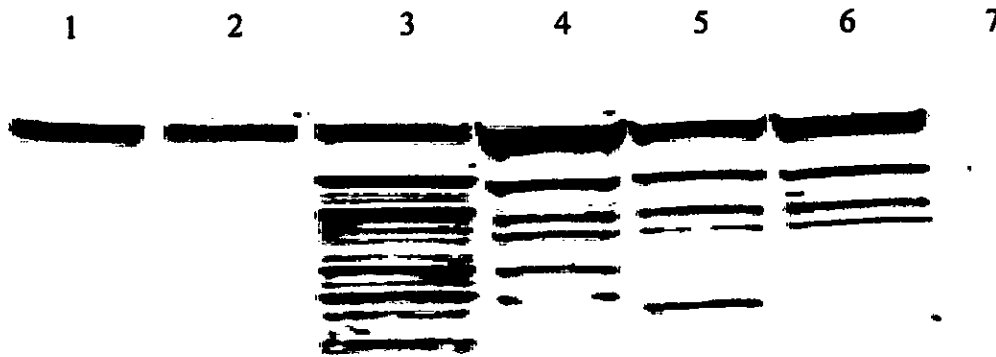
השוואה נערכה הממצאים בין האמוניים מסוג *Oreochromis* מהמקורות השונים. לאור אי הצלחה באקלום למי מלח של זן אמנון המכלוא, *Oreochromis niloticus x O. aureus*, (ראה סעיף 3.4.2) הוחלט לנסות ולהביא זן אמנון אחר המותאם יותר לשינויי מליחות. באותה תקופה גודל בהצלחה במי ים, ע"י חברת "דגי איכות", הזן *O. mossambicus x O. aureus*. האפשרות להשוואה בין שני זנים אלו מתבססת על מחקר קודם (Ueng and Ueng, 1995) שבו נמצא דמיון רב מבחינת רמת האינדוקציה של ציטוכרום P4501A ופעילויותיו הקטליטיות באמוניים מהסוג *Oreochromis*. בהשוואה שערכתי בין מדגם של אמוניים שהובאו מנמל אשדוד לבין דגי קיבוץ המעפיל לא נמצאו הבדלים בין מרכיבי מערכת P450 או בתכולת ציטוכרום b<sub>5</sub> (טבלה 3.2). ממצא זה הוא מעניין לאור העובדה שהדגים הוחזקו בפאתי נמל מטענים סואן.

בדגי אמנון מכלוא ששימשו לניטור מי המוביל הארצי ניכרה ירידה מובהקת ( $P < 0.05$ ) בפעילות ותכולת ציטוכרום P4501A ביחס לממצאי דגים מאותה אסופה שנקטלו זמן קצר לאחר הגיעם ממדגה המעפיל. בהשוואה לממוצע הכללי של מספר אסופות דגים שהובאו ממדגה המעפיל (טבלה 3.2), נמצאה פעילות EROD נמוכה פי 7 ( $P < 0.001$ ) בדגי המוביל אך לא נמצא הבדל סטטיסטי בתכולת P4501A. ניתוח הממצאים של אמוני עין חרוד מתואר בהמשך העבודה (סעיף 3.2.3).

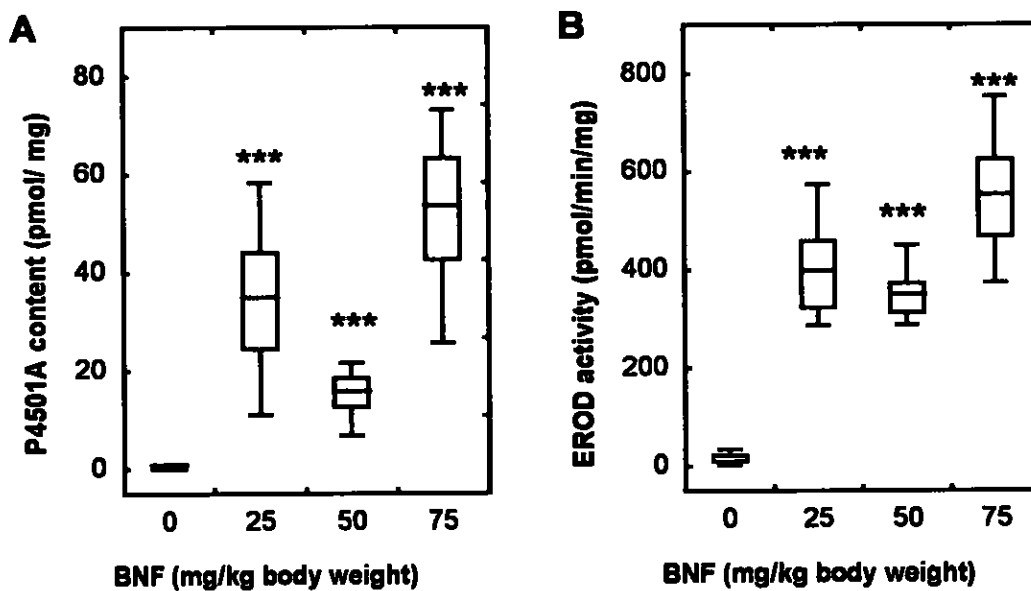
## 3.2 ניסויי אינדוקציה של ציטוכרום P450 ועיכוב AChE באמנון מכלוא

### 3.2.1 אינדוקציית ציטוכרום P4501A באמצעות $\beta$ -naphthoflavone

על מנת לקבל נתוני ייחוס לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A בדג אמנון מכלוא על ידי תרכובות הידרוקרבוניות בוצעו ניסויי הזרקה של  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) שהנו משרן מקובל לציטוכרום זה. לחלל הבטן של הדגים הוזרקו (intraperitoneal) שלושה מינונים שונים של  $\beta$ NF (25, 50, 75 mg/kg body weight) עם שמן תירס כנשא. טיפול בשמן תירס בלבד היווה את קבוצת הביקורת (vehicle control). המינון הסופי התקבל ממתן 3 זריקות כאשר ביניהן ניתן מרווח של 3,4 ימים. 4 ימים לאחר הזריקה האחרונה נקטלו הדגים. כל הדגים ( $n=20$ ), למעט אחד נותרו בחיים עד תום סדרת הטיפולים. כל הטיפולים ב- $\beta$ NF גרמו לעלייה מובהקת ( $P < 0.001$ ) ברמת פעילות EROD ותכולת ציטוכרום P4501A (איורים 3.1, 3.2). המינון הגבוה מבין השלושה גרם לעלייה המשמעותית ביותר בתכולת הציטוכרום (פי 225, ביחס לביקורת) ולעלייה הגבוהה ביותר בפעילות EROD (פי 32.5), אך לא נמצא שונה באופן מובהק מהמינונים הנמוכים יותר. באיור 3.1 ניתן לראות פרוק של החלבון לתת יחידות בדוגמאות מדגים שטופלו ב- $\beta$ NF.



**Figure 3.1:** Western blot analysis of hepatic microsomes of *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* treated with  $\beta$ NF i.p. injection. Blot was stained with anti scup CYP1A1 Mab (1-12-3). Each lane represents one fish and contains 15 pmol P450. Lane: 1,2, 1.5 and 1 pmol scup CYP1A1; 3-6, 75 mg/kg  $\beta$ NF; 7, vehicle control.



**Figure 3.2:** P4501A content (A) and EROD activity (B) in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* treated with various doses of  $\beta$ NF i.p. injection. Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n = 4-5. \*\*\*P<0.001 when compared to vehicle control.

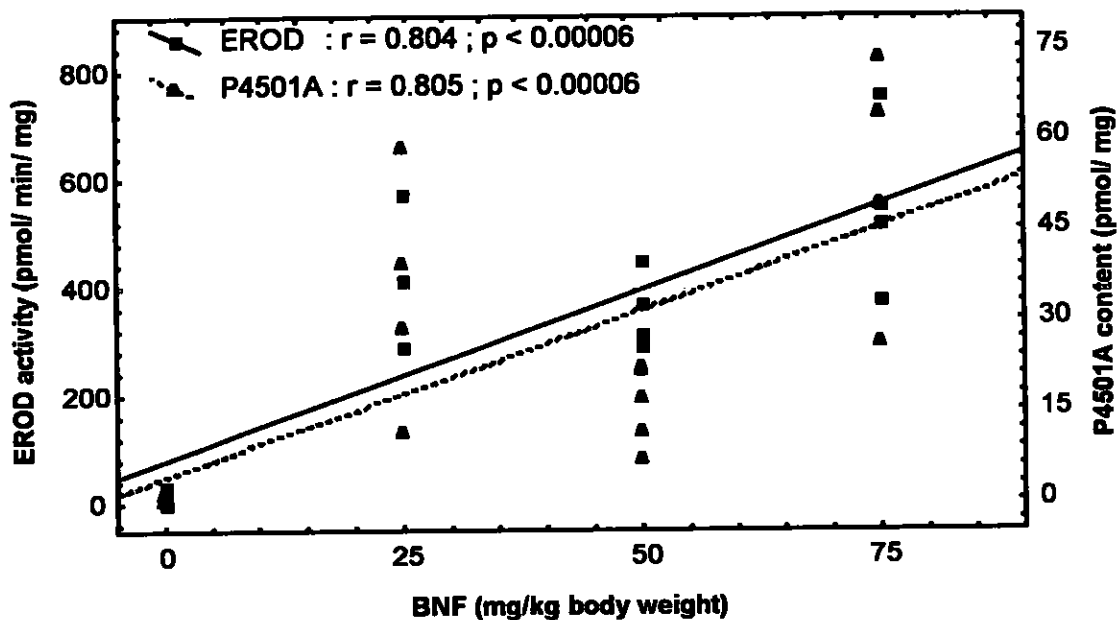


Figure 3.3: P4501A content and EROD activity as a function of  $\beta$ NF doses injected (i.p.) to *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (n = 18).

בבחינה של תכולת ציטוכרום P4501A ופעילות EROD כפונקציה של מנות החומר שהוזרקו לדגים (איור 3.3) נתקבל קשר ליניארי חיובי מובהק (multiple regression,  $P < 0.001$ ,  $r^2 = 0.64$ ). קשר זה מלמד על מגמת עלייה בשני פרמטרים אלו ככל שהמנה גדולה יותר, לכל הפחות בתחומי המינונים שבהם נעשה שימוש.

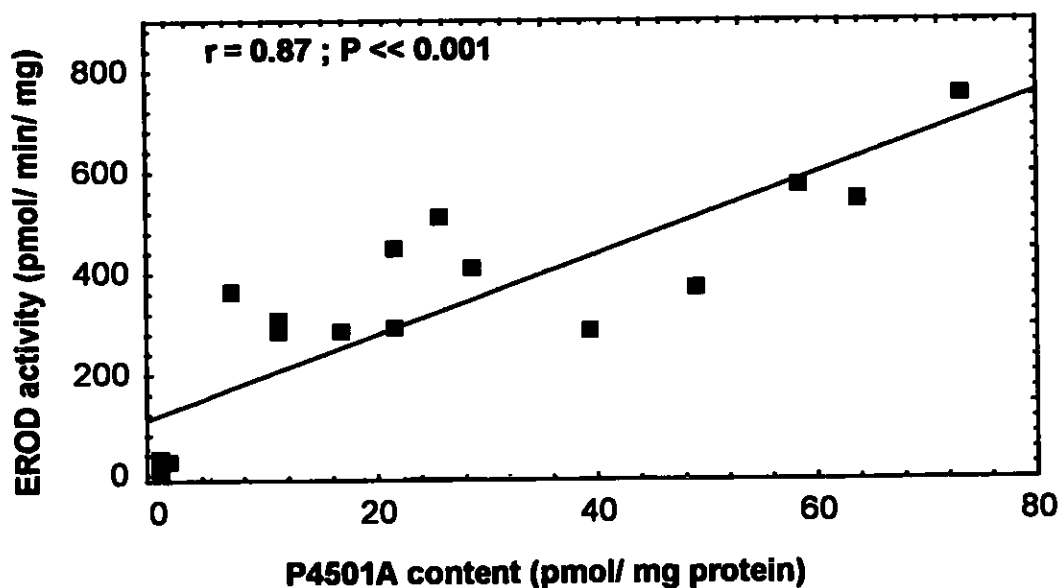


Figure 3.4: Correlation between P4501A and its catalytic activity (EROD) in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* treated with  $\beta$ NF injection (n = 18).

המתאם בין התכולה הספציפית של P4501A לבין פעילות EROD בדגי הניסוי (איור 3.4) נמצא חיובי באופן מובהק (Spearman correlation,  $P < 0.001$ ,  $r^2 = 0.76$ ). ממצא זה מלמד על הספציפיות הגבוהה של הסובסטרט 7-ethoxyresorufin לציטוכרום P4501A ועל הקשר החיובי ההדוק שבין התכולה והפעילות הקטליטית של EROD של המופרוטאין זה.

בהשוואה בין הטיפולים השונים ב- $\beta$ NF לקבוצת הביקורת לא נמצאה עלייה מובהקת בתכולת ציטוכרומי P450 ו- $b_5$ . יחד עם זאת, נסתמנה בעקבות הטיפולים, מגמת עלייה מתונה בתכולה הכללית כפונקציה של מנת החומר המוזרקת (multiple regression,  $P < 0.05$ ) (איור 3.5).

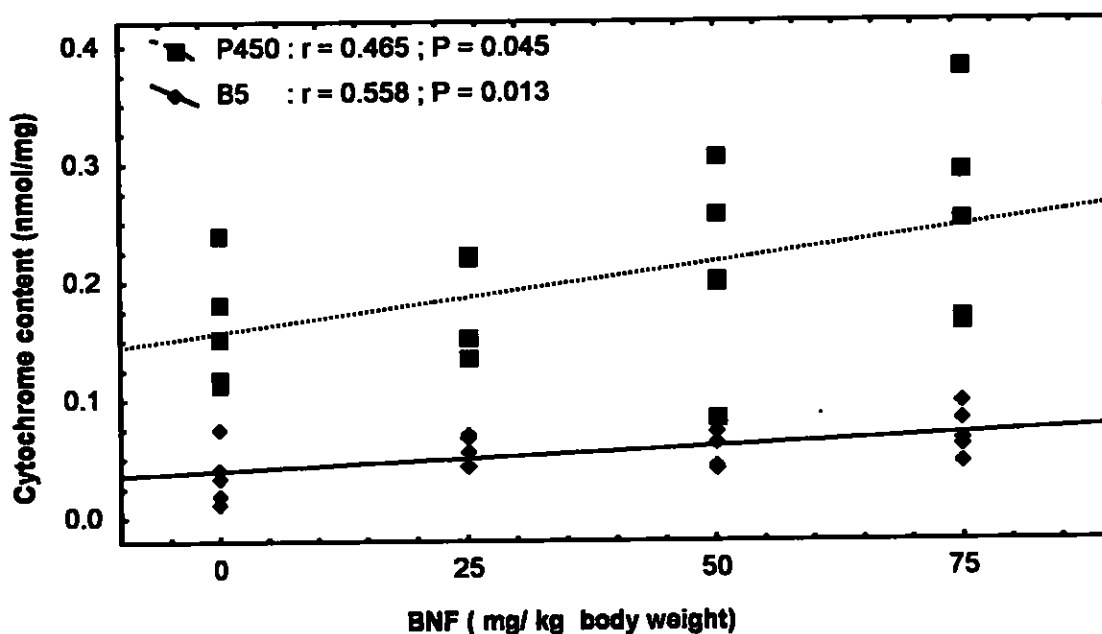


Figure 3.5: Cytochromes P450 and  $b_5$  contents as a function of  $\beta$ NF doses injected (i.p.) to *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* (n = 19).

### 3.2.2 אינדוקציית ציטוכרום P4501A באמנון מכלוא באמצעות חשיפה ל- $\beta$ -naphthoflavone במים.

בניסוי זה נבדקה האפשרות לגרום לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A באמצעות חשיפה במים למשך  $\beta$ NF. דרך חשיפה זו מדמה בצורה טובה יותר את מסלול חדירת המשרן כפי שהוא במציאות מאשר בהזרקה ישירה לחלל הגוף. שלושה דגי אמנון מכלוא נחשפו במשך 5 שעות

במערכת זרימה כימוסטטית ל-  $\beta$ NF 1 ppm. הזרמת החומר הופסקה וארבעה ימים אחר כך נקטלו הדגים ונלקחו לאנליזה. קבוצת הביקורת הורכבה מדגים מאותה אסופה שנחשפו באותה מערכת למים בלבד. בהשוואה לקבוצת הביקורת התקבלה אינדוקציה ממוצעת של ציטוכרום P4501A גבוהה פי 3 ( $P < 0.05$ ) ופעילות EROD גבוהה יותר מפי 10 ( $P < 0.01$ ) בדגים שנחשפו ל-  $\beta$ NF (איורים 3.6, 3.7).

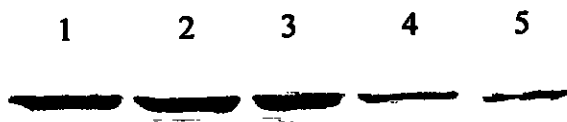


Figure 3.6: Western blot analysis of hepatic microsomes of *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* exposed to 1 ppm  $\beta$ NF in the water. Blot was stained with anti scup P4501A1 Mab (1-12-3). Each lane represents one fish and contains 15 pmol P450. Lane: 1-3, 1 ppm  $\beta$ NF; 4-5, control.

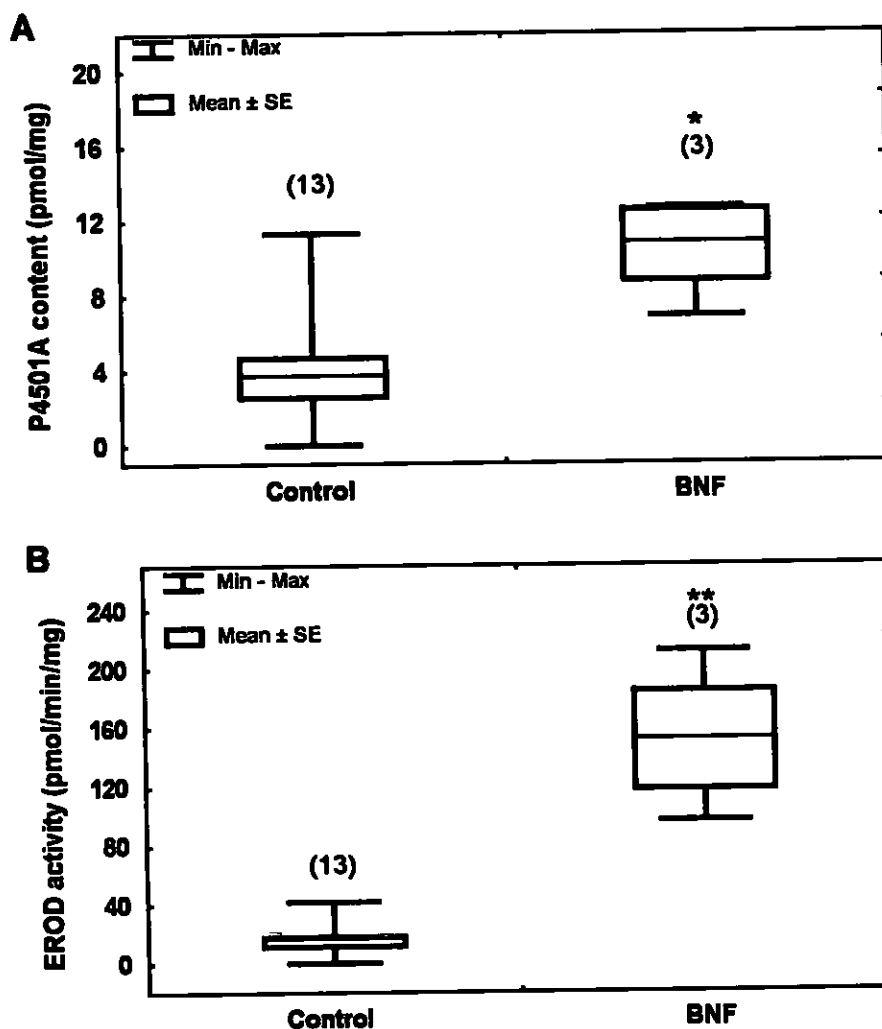


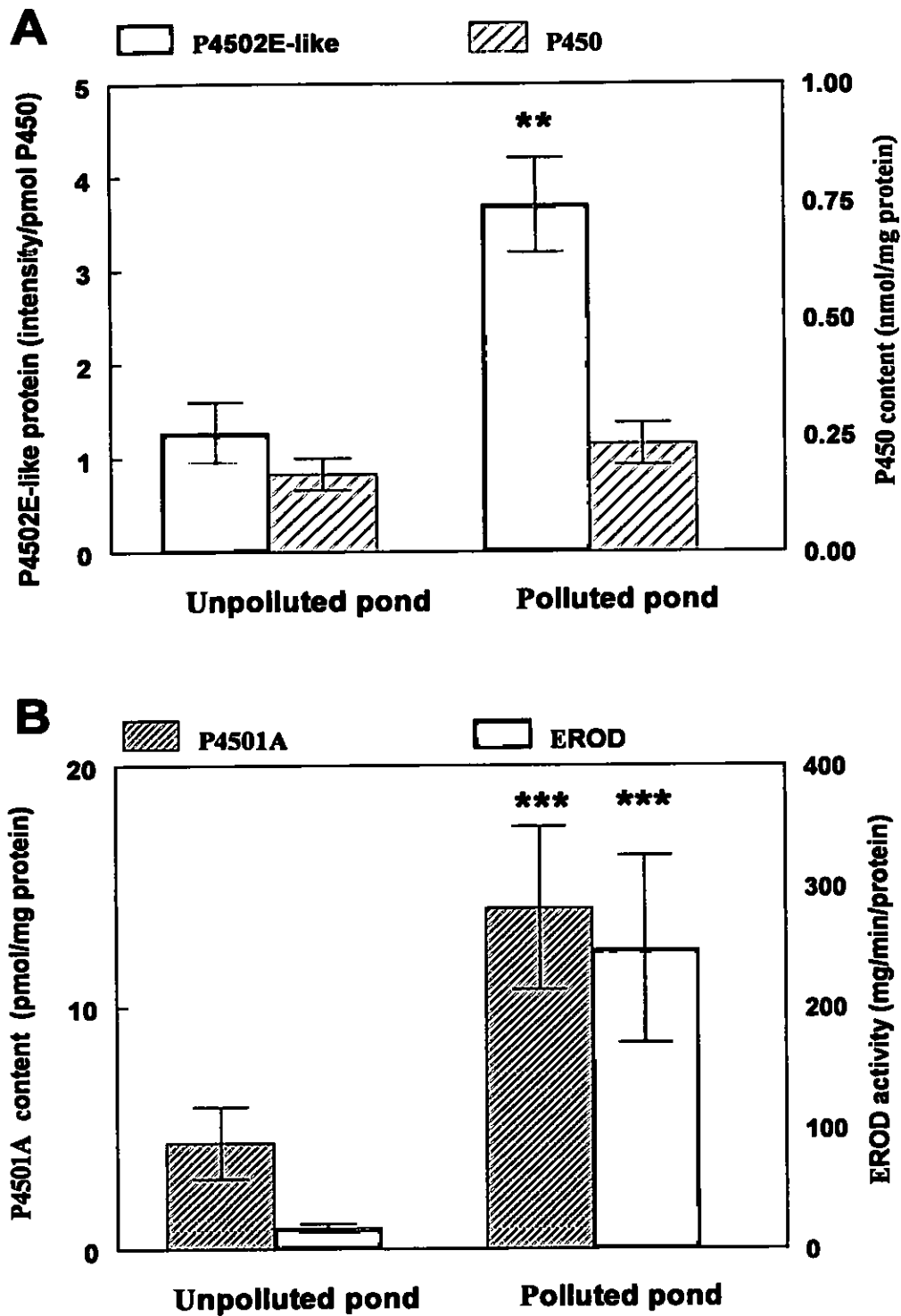
Figure 3.7: P4501A content (A) and EROD activity (B) in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* exposed in chemostatic system to 1 ppm  $\beta$ NF dissolves in the water. n is given in parenthesis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  when compared to control data.

### 3.2.3 אינדוקציית ציטוכרום P4502E-like באמנון מכלוא

תכולות הציטוכרומים P4502E-like ו-P4501A נבדקה בכבדים של דגי אמנון מכלוא משני מקורות: מדגה קיבוץ המעפיל ומדגה קיבוץ עין חרוד מאוחד. המטרה הייתה לזהות את רמת הרקע של ציטוכרומים אלה בדגים שלא עברו טיפול. הממצאים מצביעים על תכולה ופעילות גבוהות יותר של ציטוכרום P4501A באמנונים שהובאו ממדגה עין חרוד מאוחד (איור 3.8). בדגים אלו נקבעה תכולה ממוצעת של ציטוכרום P4501A גבוהה פי 6.9 ( $P < 0.001$ ) ופעילות EROD גבוהה פי 7.3 ( $P < 0.001$ ) ביחס לדגי המעפיל. בין המדגים נמצאו הבדלים גם בביטוי של האנזים P4502E-like. עוצמת התגובה האימונוכימית בדגי עין חרוד הייתה גבוהה באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) מזו שנצפתה בדגי המעפיל. ממצא זה הוא בעל חשיבות מאחר והוא מראה שניתן לקבל אינדוקציה של P4502E-like בדגים מן השטח. העלייה היוצאת דופן בתכולת P4501A ממחישה שדגים אלו נחשפו למזהמים מהסביבה. יש לציין שהעלייה בתכולת שני הציטוכרומים לא גרמה לשינוי בתכולה הכללית של ציטוכרום P450. ממצא זה מעיד שהעלייה בציטוכרומים הללו לוותה ככל הנראה, בירידה של ציטוכרומים אחרים.

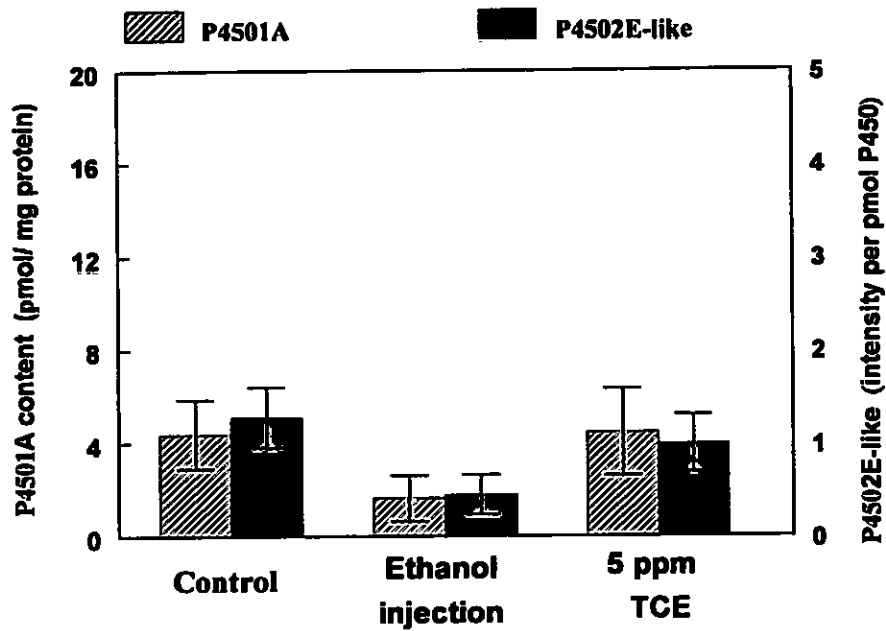
לאור העובדה שנמצא ביטוי של P4502E-like בדגי המעפיל ועין חרוד הוחלט לנסות ולמצוא האם אנזים זה מתבטא במיקרוזומים מכבדי דגים אשר נחשפו למי הירקון. בכל הדגים שנבדקו לא נצפתה תגובה אימונוכימית לנוגדן כנגד P4502E1. הדגים כללו דגי קרפיון מצוי וקיפון טובר מאתרים שונים בירקון, וכן אמנוני מכלוא שטופלו ב- $\beta$ NF.

על מנת לנסות ולקבל אינדוקציה של ציטוכרום P4502E-like בדגי אמנון מכלוא בוצעו מספר ניסויים פרלימינאריים עם משרנים מקובלים לאנזים זה ביונקים. המשרנים שנוסו הם האלכוהול ethanol, והממס האורגני trichloroethylene (TCE). לארבעה דגים הוזרק לחלל הבטן (intraperitoneal) ethanol 1 g/kg נקי. חמישה ימים לאחר ההזרקה הוקרבו הדגים. בניסוי נוסף, נחשפו שתי קבוצות אמנונים, במערכת הכימוסטית, ל-5 ppm TCE. בחזרה הראשונה לאחר פרק זמן של שלושה ימים נמצאו כל הדגים במצב גסיסה והחשיפה הופסקה. בחזרה השנייה נצפתה תופעה דומה כאשר שני דגים נמצאו מתים לאחר שלושה ימים. ראוי לציין שבשתי החזרות נצפו סימנים פיסיוולוגיים (שטפי דם באזור בסיס הזימים וסנפיר הגב) והתנהגותיים (ירידה בתנועתיות והפרשות מרובות) המזכירים, על פי ניסיונו במעבדה, תגובה לרעל עצב. על כל פנים, תכולת ציטוכרום P4502E-like שנמצאה בדגים שטופלו ב-ethanol ו-TCE, לא הייתה שונה בהשוואה לדגים מאותה אסופה שנחשפו במערכת למי ברז בלבד (איורים 3.10, 3.11). כמו כן, בדגים אלו לא נמצאו הבדלים בתכולת ציטוכרום P4501A (איור 3.10).

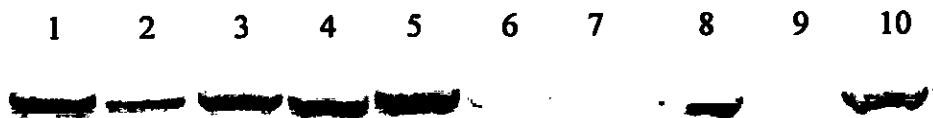


**Figure 3.9:** P4502E-like protein intensity and P450 (A), P4501A content and EROD activity (B) in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* from unpolluted pond (Hama'apil) and polluted pond (Ein Harod). Values are presented as mean  $\pm$ SE. n =5-12. \*P<0.05.





**Figure 3.10:** P4502E-like protein intensity in *Oreochromis niloticus x O. aureus* treated with 1gr/kg ethanol injection (i.p.), or exposed to 5 ppm TCE for 3 days in chemostatic flow-through system. Values are presented as mean  $\pm$ SE, n =4-6.



**Figure 3.11:** Western blot analysis of hepatic microsomes of *Oreochromis niloticus x O. aureus* exposed to 500 ppm ethanol and 1 ppm TCE in the water. The blot was stained with anti human/rat P4502E1. Each lane represents one fish and contains 25 pmol P450. Lane: 1-3, control; 4-7, ethanol treatment; 8-10, TCE treatment.

### 3.2.5 עיכוב AChE באמנון מכלוא באמצעות הממס האורגני Trichloroethylene

כאמור לעיל, נצפו בדגים שנחשפו ל-TCE תגובות המזכירות הרעלת מערכת העצבים. בדיקת פעילות AChE בשני הדגים היחידים שלא מתו העלתה שינוי עיכוב של כמעט 100% ברקמת הזימים וירידה של 67% ברקמת המוח ביחס לקבוצת הביקורת. לאור ממצאים אלו הוחלט לחשוף במערכת הכימוסטטית ארבעה אמנונים לריכוז נמוך יותר של TCE - 0.1 ppm. הדגים לא מתו או גססו כתוצאה מהטיפול ולאחר שלושה ימי חשיפה נקטלו הדגים. בדגים שנחשפו ל TCE (איור 3.12) זוהה בהשוואה לדגי הביקורת, עיכוב מובהק בפעילות ( $P < 0.01$ ) במוח (58%), בזימים (95%) ובכבד (99%). ניתן לראות באיור שטווח הפעילות המקסימלי של דגים אלו היה נמוך מהפעילות המינימלית שנמצאה בדגי הביקורת והיקידה המשמעותית היא ברקמות הזימים והכבד.

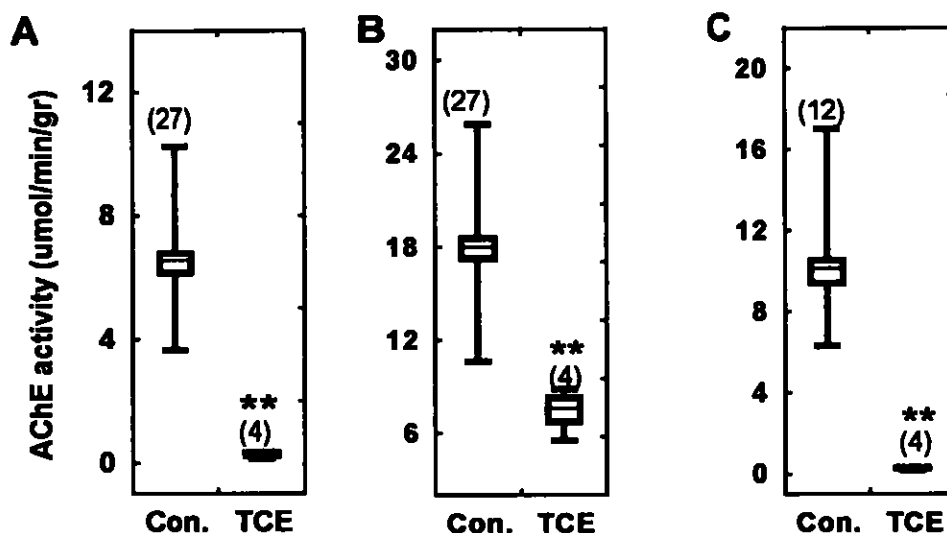
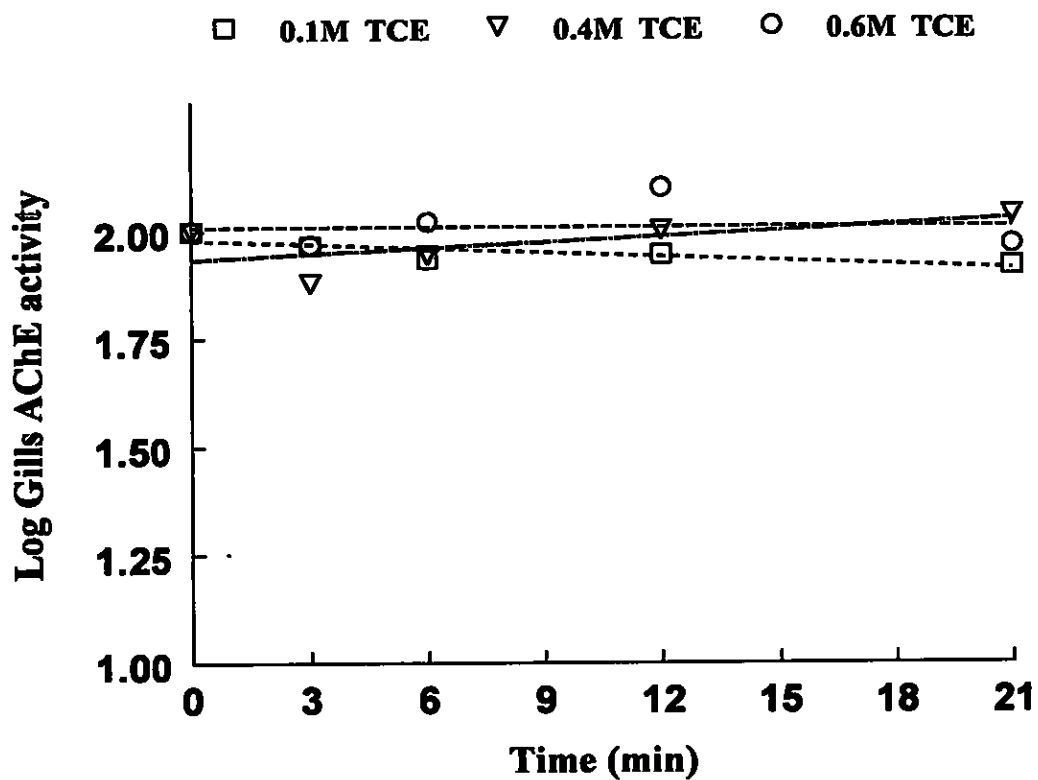


Figure 3.12: Gills (A) brain (B), and liver (C) AChE activity in *Oreochromis aureus x O. niloticus*. Fish were exposed to 0.1 ppm TCE in a chemostatic flow-through system. Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis.  $^{**}P < 0.01$  when compared to control data.

נוכח תוצאות אלו ולאור ממצאים בספרות המצביעים על TCE כמעכב פעילות AChE (Maekinen *et al.*, 1988) הוחלט לנסות ולבחון האם TCE הוא מעכב ספציפי של AChE. אפשרות זאת נבדקה באמצעות ניסוי עיכוב קינטי *in vitro*. בניסוי הוספו ריכוזים שונים של TCE (0.1M, 0.4M, 0.6M) נקי להומוגנט של רקמת זימים מאמנון מכלוא. פעילות AChE של תערובת האנזים TCE+ נבדקה בתחילת הניסוי ולאחר זמני אינקובציה של 3, 6, 12, ו-20 דקות. בכל הריכוזים והזמנים לא הובחנה ירידה משמעותית כלשהי בפעילות האנזימטית (איור 3.13).



**Figure 3.13:** Time course of AChE activity of gills homogenate from *Oreochromis aureus* x *O. niloticus* treated with various concentrations of trichloroethylene (TCE).

### 3.3 ניטור שיירי תרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה בקטעי נחל

#### הירקון המתוקים

##### 3.3.1 דייג בירקון המתוק

מינים שונים של דגי גרם נידונו בשיטות מגוונות בקטעי השונים של נחל הירקון. מתוך כלל המינים נלקחו לאנליזה ביוכימית שלושה מיני דגים (קרפיון מצוי, אמנון גליל ואמנון מצוי) החיים בקטעי המתוקים של הנחל. בפרק השיטות (טבלה 2.2) מפורטים מאפייני הדגים השונים שנתפסו בירקון ונלקחו לאנליזה ביוכימית במעבדה.

פרופיל AChE נבדק באמנוני גליל שנתפסו ב- 09/99 באתר מקורות בראש העין (AM) וב- 09/01 באתר שבע טחנות (7M). הרקמות שנבדקו הן מוח, זימים וכבד. הממצאים מראים (איור 3.14) שבדגי שבע טחנות נמצא עיכוב בפעילות AChE ברקמות הזימים והכבד (40.9% ו- 52.8%, בהתאמה) לעומת דגי מאגר ראש העין ( $P < 0.01$ ). לעומת זאת, באופן מפתיע, ברקמת המוח תמונת המצב היא הפוכה וישנה עלייה בפעילות ב- 34% ( $P < 0.01$ ).

פעילות AChE נקבעה באמנונים מצויים שנידונו (09/01) באתר שבע טחנות (איור 3.15). הממצאים הושוו לממצאי ייחוס (Ref.) מאמנונים מצויים שנדגמו במאגרי מים שפירים של חברת מקורות. באופן דומה לממצאים מאמנוני הגליל הייתה ירידה מובהקת ( $P < 0.01$ ) בדגי שבע טחנות בפעילות AChE ברקמות הזימים והכבד (81.9% ו- 93.5%, בהתאמה) לעומת אתר הייחוס. אין חפיפה בטווחי הפעילות של רקמות אלו בשתי הקבוצות. בשונה מאמנוני הגליל, לא נמצא הבדל בפעילות ברקמת המוח בין שני האתרים.

מין דג נוסף שנתפס באתר שבע טחנות (09/01) היה קרפיון מצוי. פעילות AChE בדגים אלו הושוותה לפעילות בדגים מאותו המין שנדגמו במאגרי מים שפירים של חברת מקורות (Ref.). בדגים אלו הובחנה ירידה של 40% בפעילות הזימים ( $P < 0.05$ ) וירידה קלה יחסית (26.4%) אך מובהקת ( $P < 0.05$ ) בפעילות ברקמת הכבד, לא הובחנו הבדלים ברקמת המוח בשתי קבוצות הדגים (איור 3.16).

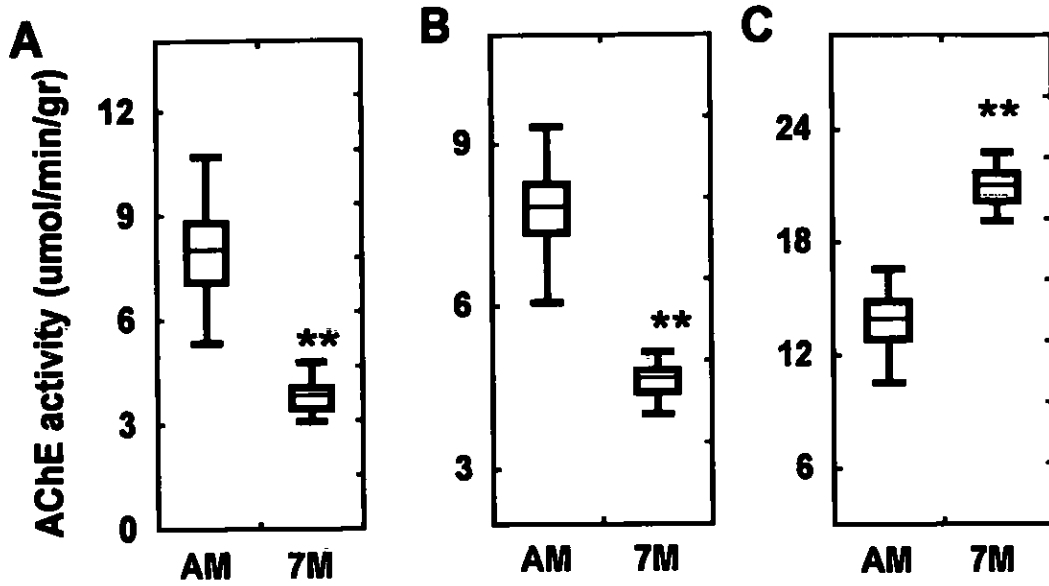


Figure 3.14: Liver (A), Gills (B) and Brain (C) AChE activities of *Sarotherodon galileus* caught at Rosh HaAyin reservoir (AM) and below to “7 mills” dam (7M). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). \*\* $P < 0.01$  when comparison was made between sites.  $n = 5-6$ .

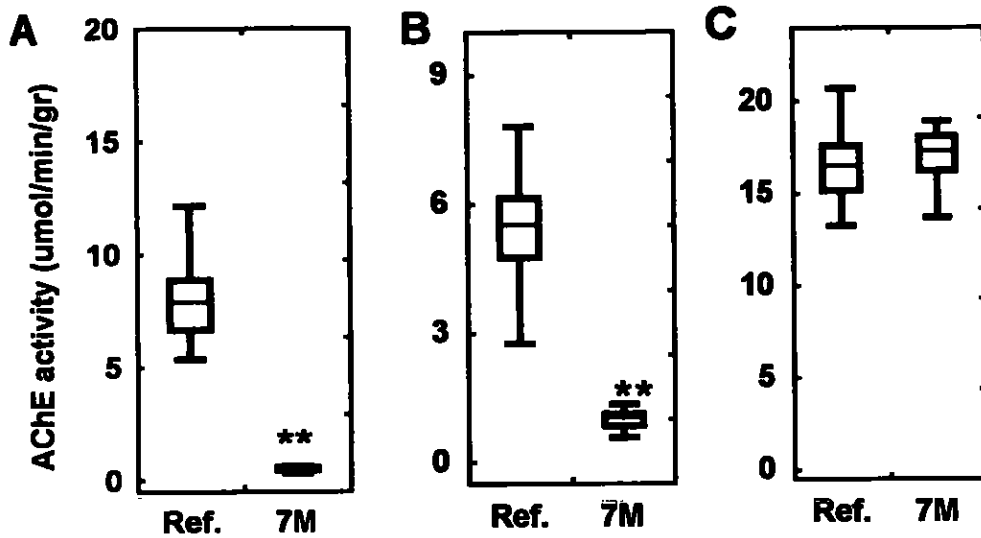
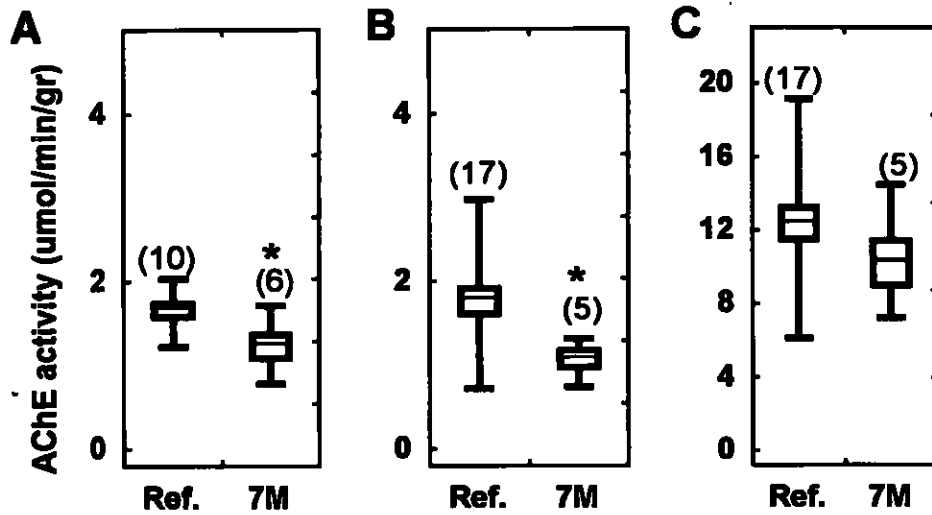
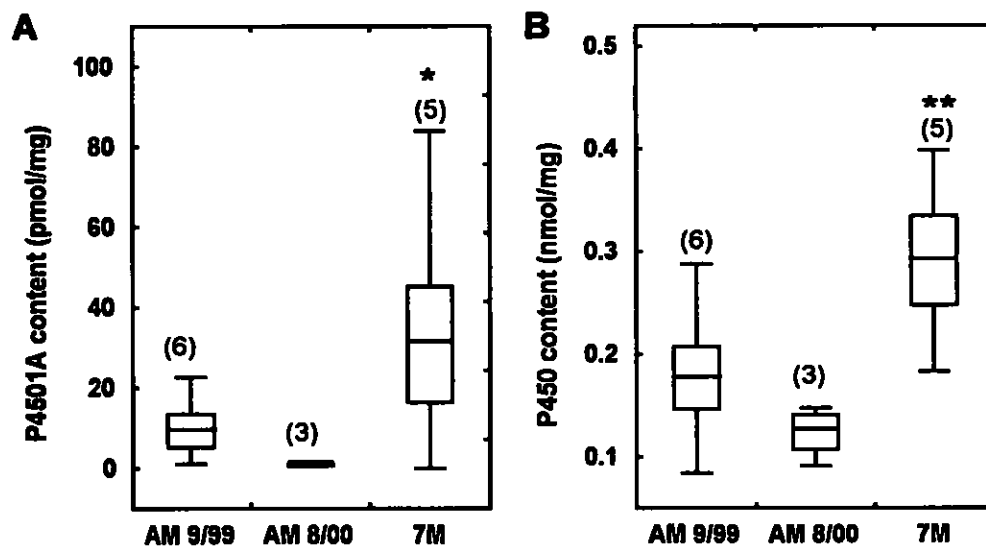


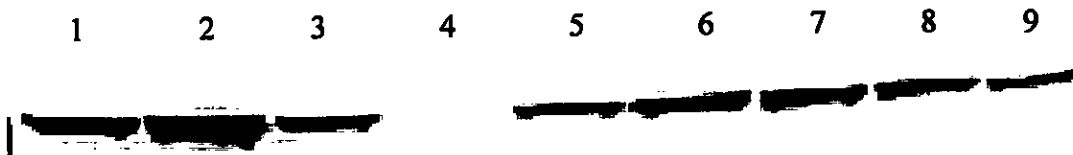
Figure 3.15: Liver (A), Gills (B) and Brain (C) AChE activities in of *Tilapia zillii* caught at Mekorot freshwater reservoirs (Ref.) and below to “7 mills” dam (7M). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). \*\* $P < 0.01$  when compared between sites.  $n = 5-6$ .



**Figure 3.16:** Liver (A), Gills (B) and Brain (C) AChE activities in of *Cyprinus carpio* caught at Mekorot freshwater reservoirs (Ref) and below to “7 mills” dam (7M). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). \* $P < 0.05$ . n is given in parenthesis



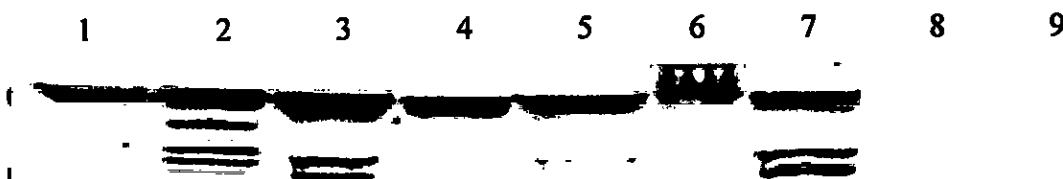
**Figure 3.17:** P4501A specific content (A) and total P450 content (B) in *Sarotherodon galileus* caught at Rosh HaAyin reservoir (AM) and below to “7 mills” dam (7M). Values are presented as range (min-max) and means ( $\pm$ SE). n is given in parentheses. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  when compared to MK 8/00.



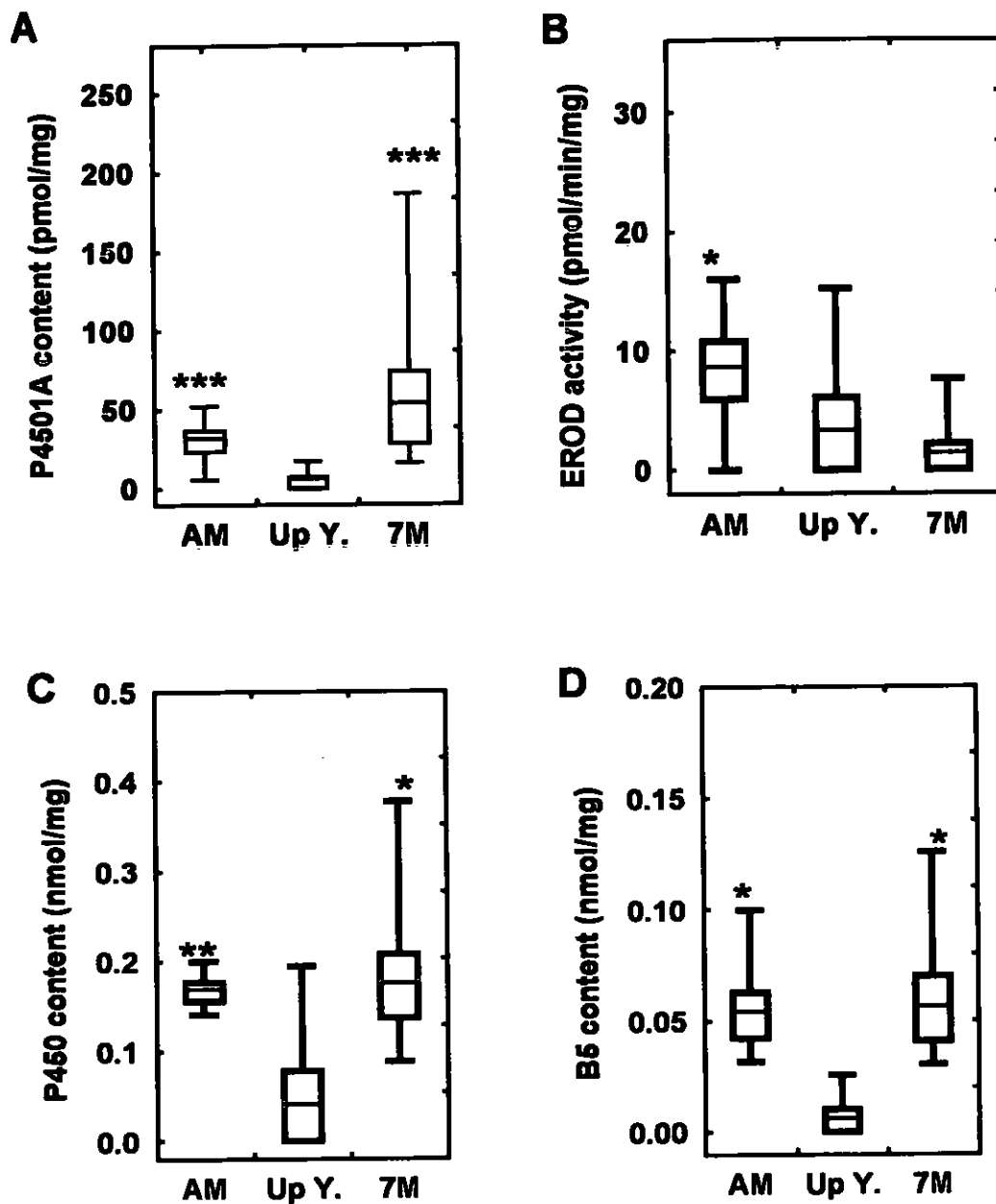
**Figure 3.18:** Western blot analysis of hepatic microsomes of *Sarotherodon galileus* caught at Rosh HaAyin reservoir (AM) and below to "7 mills" dam (7M). Blot was stained with anti scup CYP1A1 Mab (1-12-3). Each lane represents one fish and contains 15 pmol P450. Lane: 1, calibrated microsome (1.8 pmol); 2-6, 7M; 7-9, AM (09/99).

מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 נבדקו בדגי אמנון גליל שנלכדו בחודשים 09/99 ו-08/00 באתר מקורות בראש העין (AM) ובחודש 09/01 באתר שבע טחנות (7M). ממצאי הבדיקות (איור 3.17) מעלים שאין הבדל סטטיסטי בין שני המדגמים בראש העין למרות שאינדוקציה ציטוכרום P4501A הייתה גבוהה פי 12.5 בדיגום של קיץ '99 לעומת קיץ '00. באמנוני שבע טחנות הובחנה עלייה מובהקת בתכולת ציטוכרום P450 הכללי ( $P < 0.01$ ) ובתכולת ציטוכרום P4501A ( $P < 0.05$ ) ביחס לדיגום מחודש 08/00 בראש העין אך לא ביחס לדיגום 09/99 (איור 3.18). פעילות EROD ותכולת ציטוכרום  $b_5$  נמצאו דומות סטטיסטית בין המדגמים.

בבחינה של מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 בקרפיונים מצויים שנתפסו בהזדמנויות שונות בקטעי הנחל המתוקים (איורים 3.19, 3.20) נמצאו הממצאים הבאים: בקרפיוני שבע טחנות נמצאה עלייה משמעותית (פי 13.5) בתכולת ציטוכרום P4501A הספציפית ( $P < 0.01$ ) ובתכולה הכללית של ציטוכרום P450 וציטוכרום  $b_5$  (פי 4.4 ופי 11, בהתאמה) ביחס לקרפיוני מעלה הירקון. מנגד, פעילות EROD איננה שונה בין שתי קבוצות אלו. בדגי מאגר ראש העין יש עלייה בכל הפרמטרים הביוכימיים שנבדקו ביחס לדגי מעלה הירקון לרבות אינדוקציה מובהקת של ציטוכרום P4501A ( $P < 0.001$ ).



**Figure 3.19:** Western blot analysis of hepatic microsomes of *Cyprinus carpio* caught at Upper Yarkon section and below to "7 mills" dam (7M). Blot was stained with anti scup CYP1A1 Mab (1-12-3). Each lane represents one fish and contains 15 pmol P450. Lane: 1, calibrated microsome (1.8 pmol); 2-7, 7M; 8-9, Upper Yarkon.



**Figure 3.20:** P450 components in *Cyprinus carpio* caught at Rosh HaAyin reservoir (AM), Upper Yarqon section (Up. Y), and below to "7 mills" dam (7M). P4501A content (A), EROD activity (B), P450 content (C), and b<sub>5</sub> content (D). Values are presented as range (min-max) and means ( $\pm$ SE). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared to Upper Yarqon group. N = 7-11.



### 3.3.2 חשיפת אמנוני מכלוא בכלובי רשת במי מאגר מקורות בראש העין ואתר שבע טחנות.

מאחר ודייג בקטע התיכון היה אפשרי רק במורדו נבדקה אפשרות של חשיפת דגים בכלובים *in situ* במי הנחל. לצורך הניסוי נבחרו שני אתרים, אחד מכל קטע נחל, שבהם הסבירות התיאורטית לשרידות הדגים נראתה גבוהה ביותר. האחד היה אתר מקורות בראש העין שייצג את מעלה הנחל בעוד האתר השני שנבחר היה שבע טחנות המצוי בקצה הקטע התיכון של הנחל.

לניסוי זה שימשו אמנוני מכלוא שנרכשו בקיבוץ המעפיל. 12 דגים הושמו (02.04.00) בשני כלובי רשת במאגר ראש העין (AM) לפרק זמן של 21 יום. כל הדגים נותרו בחיים, עד תום הניסוי. מפלס המים במאגר, במקום השקעת הכלוב, באותה תקופה היה גבוה יחסית (3-4 מטר). במקביל, הושמו 12 אמנוני מכלוא בשני כלובים במעלה שבע טחנות (7M). כל הדגים נמצאו מתים לאחר מספר ימים. לפיכך הוחלט על ניסיון חשיפה קצר יותר באתר זה. 7 דגי אמנון מכלוא הושמו בכלוב (16.04.00) באותו מיקום לפרק זמן של יומיים בלבד - רק 3 מתוכם שרדו. בסך הכל מתו 85% מהדגים שנחשפו בשבע טחנות לעומת תמותה אפסית במאגר ראש העין.

באיור 3.20 מוצגת השוואה בפעילות AChE בין שני אתרי הטמנת הכלובים. בדגים ששהו באתר שבע טחנות ניתן לראות עיכוב משמעותי ( $P < 0.01$ ) בפעילות ברקמת הזימים (83.4%) לעומת דגי ראש העין. האחרונים היו בעלי פעילות בזימים הדומה לנתוני קו הבסיס המבוסס על נתוני רקע מצטברים (ראה טבלה 3.1) אך נמוכה באופן מובהק ( $P < 0.05$ ) מרמת הרקע של האסופה. ברקמת המוח לא ניכר הבדל ברמת הפעילות בין שני האתרים אך בשניהם הפעילות במוח נמוכה באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) מנתוני קו הבסיס של זן דג זה ומרמת הרקע של האסופה. העיכוב בפעילות האנזים הוא משמעותי במיוחד בדגי שבע טחנות נוכח משך החשיפה הקצר (יומיים בלבד).

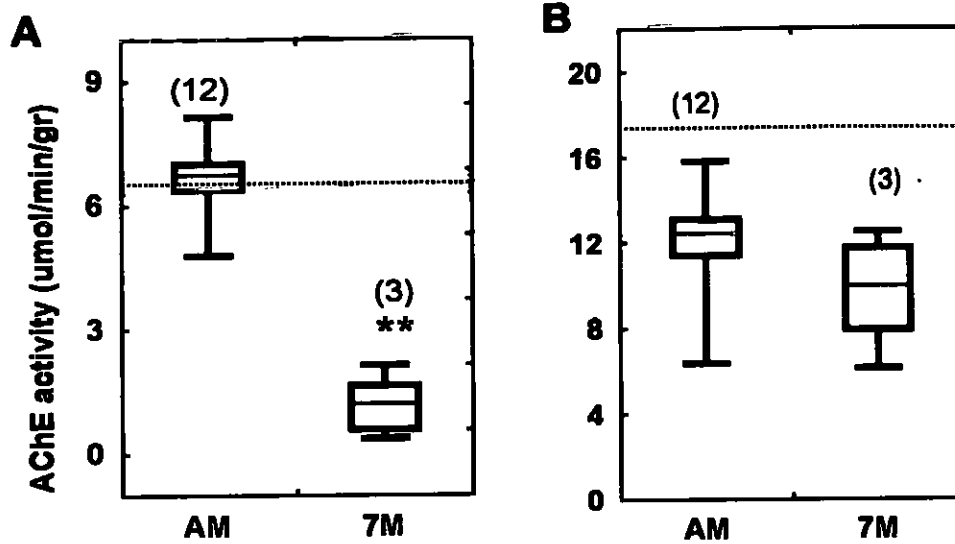


Figure 3.21: Gills (A) and brain (B) AChE activity in *Oreochromis aureus* x *O. niloticus* caged at Rosh HaAyin reservoir (AM) and above “7 Mills” dam (7M). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis. Baseline values are indicated by dash (n=84). \*\*P<0.01 when comparison was made between sites.

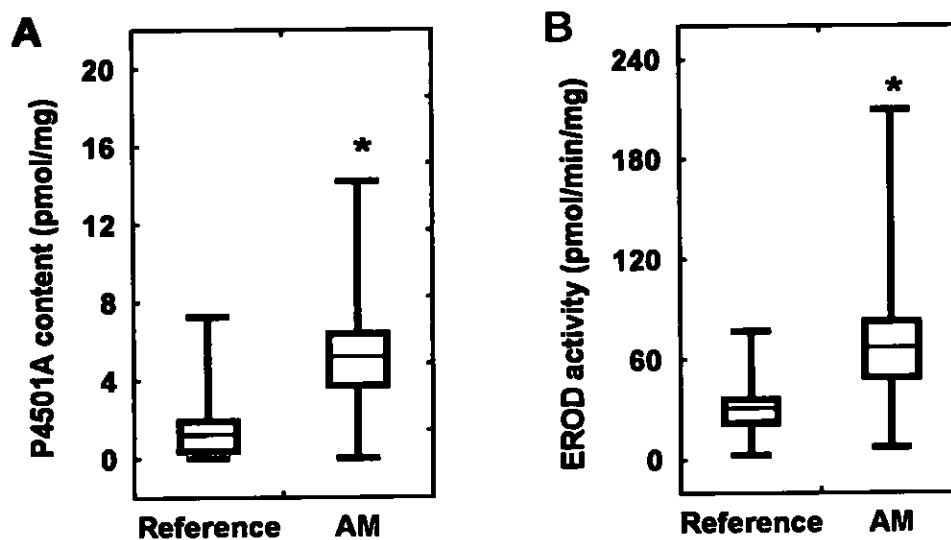


Figure 3.22: P4501A content (A) and EROD activity (B) in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* caged at Rosh HaAyin reservoir (AM). Values are presented as range (min-max) and means ( $\pm$ SE). \*P<0.05, when compared to reference data. n = 11.

באמנונים ששהו בכלובים במאגר ראש העין במשך 21 יום נבדקו מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 (איור 3.22). הממצאים הושוו לממצאי רקע מאמנונים חברי אותה אסופה אשר נקטלו סמוך למועד הבאתם מן המדגה. בכל הפרמטרים הביוכימיים שנבדקו נמצאה עלייה מובהקת בדגים שנחשפו למי מאגר ראש העין. תכולת ציטוכרום P450 הכללי וציטוכרום  $b_5$  עלו פי 2 ( $P<0.05$ ) ופי 1.9 ( $P<0.01$ ), בהתאמה. תכולת ציטוכרום P4501A בדגי ראש העין הייתה גבוהה יותר מפי ארבע ( $P<0.05$ ), ופעילות ה-EROD שלהם עלתה לרמה גבוהה פי שתיים ( $P<0.05$ ).

### 3.3.3. חשיפת אמנוני מכלוא לדגימות מים מאתרים שונים בנחל הירקון

נוכח בעיית השרידות הנמוכה של דגים הנחשפים למים ברמות רעילות גבוהות כמו אלו הקיימות בכמה מחלקי הירקון הוחלט לנסות ולחשוף את הדגים לדגימות מים. החלקים העליונים של הקטע התיכון של הנחל היו הרעילים ביותר והיה הכרח למהול את הדגימות במים נקיים על מנת להגיע לאחוז שרידות סביר (לפחות 50%) של הדגים הנחשפים. בניסוי הובאו דגימות מים משני אתרים: מאגר ראש העין (AM) שבו דגים חיים באופן טבעי שימש כאתר ייחוס ומי מורד מפגש ירקון-קנה (Below Y-Q) יצגו את הקטע המזוהם בנחל. בניסוי, חשפתי בשלושה אקווריומים (בנפח 60 ליטר) 12 דגי אמנון מכלוא לרמות מיהול משתנות (25%, 50%, 100%) של דגימות מים שהובאו ממורד מפגש ירקון-קנה. המיהול התבצע עם מים ממאגר מקורות בראש העין. בתקופה שבה נדגמו המים (10/99) הזרימה ממעלה הירקון הייתה כמעט אפסית כך שדגימת המים כללה למעשה מים ממורד נחל קנה בלבד. אקווריום רביעי בנפח 40 ליטר שימש כביקורת ובו נחשפו 8 דגים למי מאגר ראש העין בלבד. היחס ההתחלתי בכל הטיפולים, בין מספר הדגים לנפח המים בליטרים היה אחד לחמש. המים באקווריומים הוחלפו פעמיים בשבוע במשך שלושים יום. בסה"כ הוחלף נפח המים בכל אקווריום 8 פעמים במהלך הניסוי. אחוז הישרדות הדגים מתואר כפונקציה של רמת המיהול ומשך החשיפה (איור 3.23). כפי שניתן לראות, דגימת המים ממורד מפגש ירקון-קנה שאינה מדוללת הייתה קטלנית עבור הדגים ותוך פחות מיממה מתו כולם. במיהול פי שניים של הדגימה מתו כל הדגים בתוך שבועיים ואילו במיהול פי ארבע נותרו לאחר שבועיים 8 דגים (33% תמותה). באקווריום הביקורת מת דג אחד בלבד (12% תמותה).

הדגים שנחשפו לדגימות מים ממאגר ראש העין (30 יום) ולמי מורד מפגש קנה ירקון (18 שעות) נלקחו לאנליזת פרופיל AChE. הממצאים הושוו לנתוני הרקע של דגי האסופה (איור 3.24). עיכוב מובהק של כ- 55% ( $P<0.001$ ) ו- 40% ( $P<0.01$ ) הובחן ברקמת המוח בדגי מורד מפגש ירקון קנה ומאגר ראש העין, בהתאמה. לא הייתה חפיפה בטווחי הפעילות במוח בין שני טיפולים אלו לזו של דגי האסופה. בדגים שנחשפו לדגימה מראש העין נמצאה ירידה מובהקת ( $P<0.05$ ) של כ- 30% בפעילות הזימים. נתוני הרקע של האסופה לא נמצאו שונים מקו הבסיס הכללי אם כי הפעילות האנזימטית בזימים הייתה נמוכה יחסית.

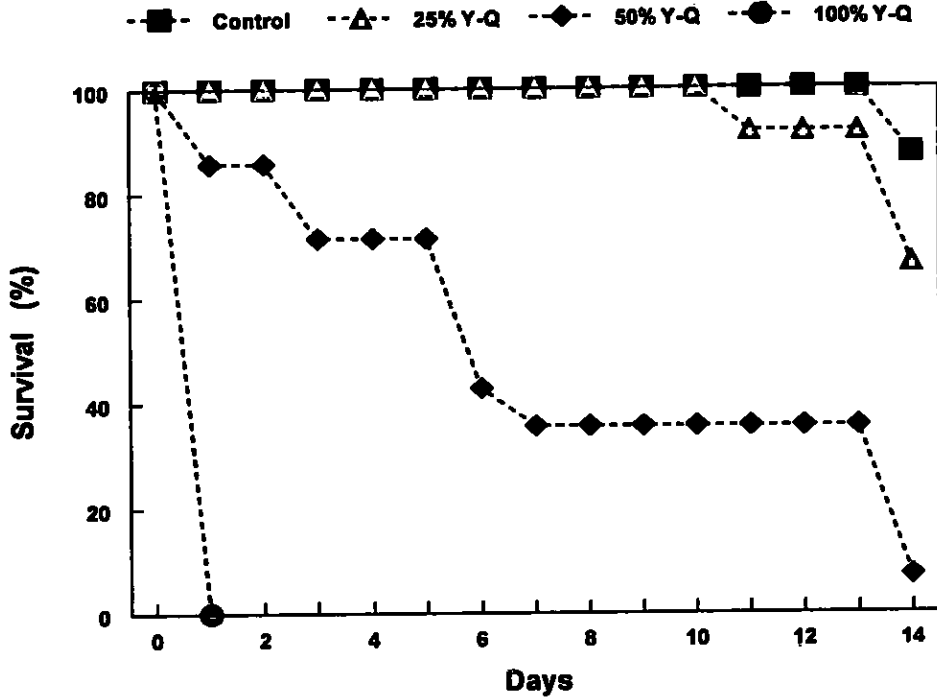


Figure 3.23: Survival (%) of *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* as a function of exposure duration. The fish were exposed to a gradient of diluted water samples taken from below Yarqon-Qana confluence. n=12 per each group except the control group (n=8).

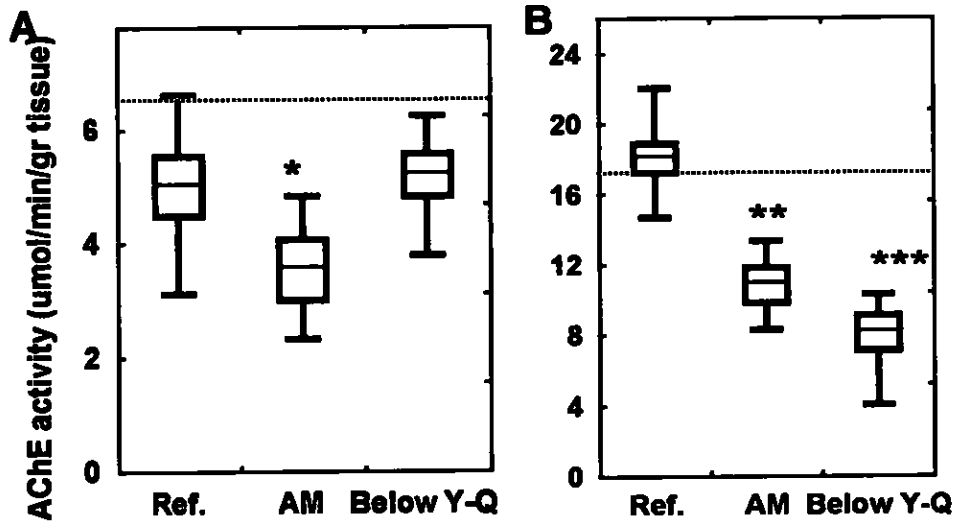
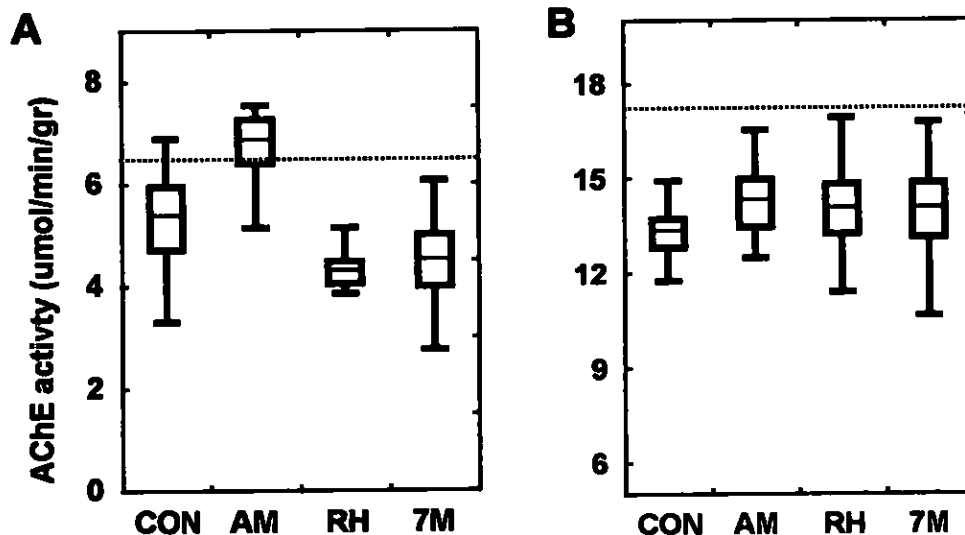


Figure 3.24: Gills (A) and brain (B) AChE activity in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* exposed to water samples taken from Rosh HaAyin reservoir (AM), and below Yarqon-Qana confluence (Y-Q). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n = 6-7. Baseline values are indicated by dash (n=84). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 when compared to reference data.

בניסוי נוסף של חשיפה לדגימות מים שנערך ב- 01/00 הובאו מידי שבוע 60 ליטר מים משלושה אתרים שונים בירקון. הדגימות נלקחו בתקופת שיטפונות חורף חזקים, שיטפונות שסחפו סחף רב והרחיפו כמויות גדולות של סדימנט מן הקרקע. האתרים שנדגמו ייצגו את קטעי הנחל השונים והם מהמעלה למורד, מאגר מקורות בראש העין (AM), מעלה סכר שבע טחנות (Above 7M), ומוצא מי הקירור של תחנת הכוח רידינג (RID). דגימות מים הובאו גם ממכוני טיהור השפכים המזרימים קולחיהם לנחל (ראה סעיף 3.5.1). קבוצת הביקורת נחשפה למי ברז מאווררים (CON). באקווריומים בנפח של 30 ליטר נחשפו שישה דגי אמנון מכלוא (40-70 גרם) במשך 30 יום לאותם מדגמי מים. בטך הכל הוחלף נפח המים כולו שמונה פעמים במהלך החודש.

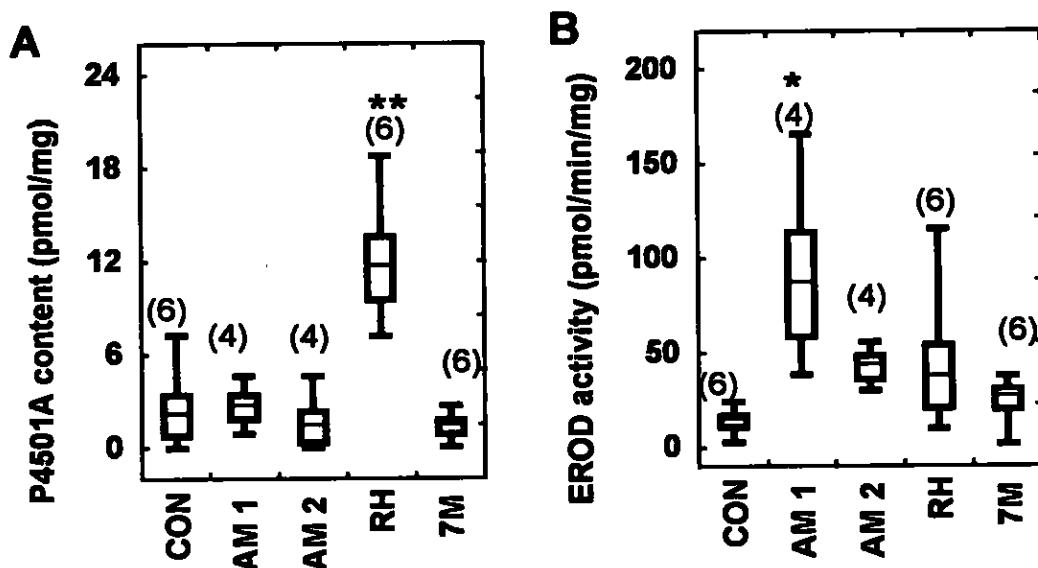
מי הקירור ממוצא תחנת הכוח רידינג דוללו פי ארבע במי ברז בשל מליחותם (37 ppt). למרות הדילול, אמנוני המכלוא לא הצליחו להסתגל למים אלו ומתו כולם בתוך שבועיים. האמנונים שנחשפו למי מט"ש כפר סבא-הוד השרון מתו כולם תוך פחות מיממה. הדגים שנחשפו לשאר מדגמי המים שרדו כולם והוצאו לאחר 30 יום כשהם במצב פיסיולוגי טוב.

פרופיל AChE נקבע בדגים שנחשפו לדגימות המים (איור 3.25). בשתי הרקמות שנבדקו, מוח וזימים, לא נמצא הבדל בין קבוצות הטיפול לקבוצת הביקורת ואו ירידה מובהקת ביחס לקו הבסיס. יחד עם זאת, רמת הפעילות ברקמת הזימים נמוכה באופן מובהק ( $P < 0.05$ ) בדגים שנחשפו למי שבע טחנות ומט"ש רמת השרון ביחס לפעילות בדגים שנחשפו למי מאגר ראש העין.



**Figure 3.25:** Gills (A) and brain (B) AChE activity in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish were exposed for 30 days to water samples from various site in the Yarqon stream. Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE).  $n=6$ . Baseline values are indicated by dash ( $n=84$ ).

מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 נבדקו בדגים שנחשפו לדגימות מים בשני הניסויים שתוארו לעיל (איור 3.26). באמנונים שנחשפו בניסוי החשיפה הראשון (10/99) למי מאגר ראש העין (AM 1) נמצאה עליה מובהקת ( $P < 0.05$ ) של יותר מפי 6 בפעילות EROD, ביחס לקבוצת הביקורת. בדגימות מתקופה מאוחרת יותר (AM 2, 01/00) מאותו אתר לא נמצאה עלייה. לא הובחנה עליה מובהקת באינדוקציה של ציטוכרום P4501A בקבוצות הטיפול השונות למעט הדגים שנחשפו למי מטי"ש רמת השרון (ראה סעיף 3.5.1). באמנונים שנחשפו למי שבע טחנות הייתה עלייה מובהקת ( $P < 0.05$ ) של יותר מפי שתיים בתכולה הכללית של ציטוכרום P450 לעומת קבוצת הביקורת.



**Figure 3.26:** P4501A content (A) and EROD activity (B) in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish were exposed to water samples taken from Rosh HaAyin reservoir (AM1+2), and above "7 mills" dam (7M). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  when compared to control data.

באפריל 2001 התבצע דיגום משותף למספר מעבדות העוסקות בחקר הירקון. בדיגום זה נלקחו ע"י מעבדתנו דגימות מים מהתחנות הבאות: מעלה מפגש ירקון-קנה (Above Y-Q), מורד מפגש ירקון-קנה (Below Y-Q), תחנת מיתוג (Mitug), ומעלה סכר שבע טחנות (Above 7M). בכל תחנה נדגמו 40 ליטר מים מפני המים. דגימות המים נלקחו למעבדה לשם חשיפה של דגים. חמישה אמנוני מכלוא (80-100 גרם) נחשפו במשך 7 שעות בכל אקווריום. 7 שעות חשיפה היה פרק הזמן שחלף עד שהדגים שנחשפו למי מורד ירקון-קנה ותחנת מיתוג החלו להראות סימני מצוקה. בהשוואה בין התחנות מאובחנת ירידה מובהקת ( $P < 0.05$ ) בפעילות בדגים שנחשפו למי מיתוג

לעומת הקבוצות האחרות (איור 3.27). בהשוואה לקו הבסיס הייתה ירידה מובהקת ( $P < 0.05$ ) בפעילות ברקמות אלו רק בדגים שנחשפו למי תחנת מיתוג.

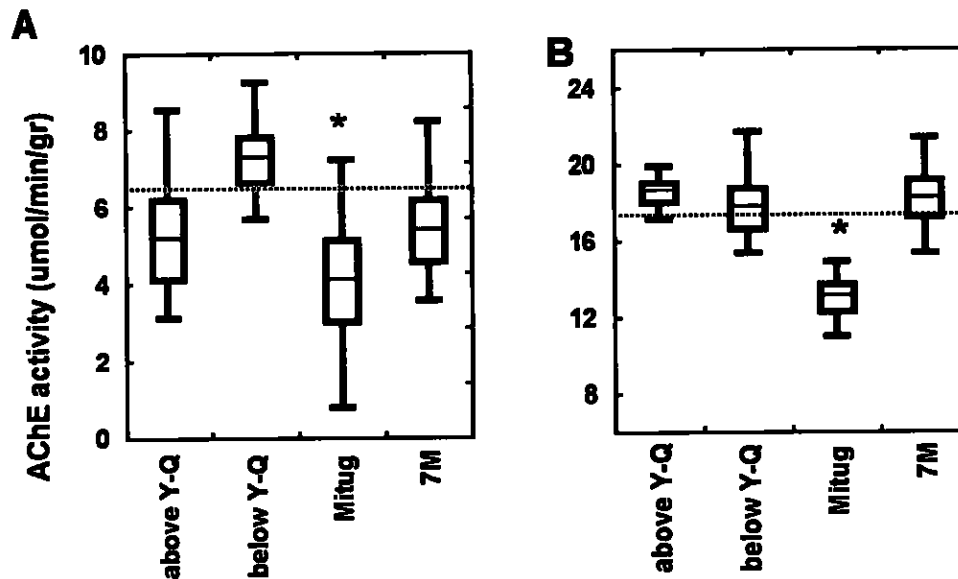


Figure 3.27: Gills (A) and brain (B) AChE activity in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish were exposed for 7 hours to water samples from various sites in the Yarqon stream. Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE).  $n=5$ . Baseline values are indicated by dash ( $n=84$ ). \* $P < 0.05$  when comparison was made between sites.

### 3.4 ניטור תרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה בקטע הירקון המלוח

#### 3.4.1 ניסוי אקלום דגי מים מתוקים למי ים

בניסיון לבחור את מין הדג האופטימלי לניטור ביולוגי של קטע הירקון המלוח נבחנה האפשרות של אקלום מודרג של אמנון המכלוא למי מלח. זן זה, המשמש את מעבדתנו לניטור חלקיו העליונים של הירקון, גדל במים מתוקים וחשיפה לא מודרגת למי ים עשויה להיות קטלנית עבורו. לפיכך, ביצעתי מספר ניסיונות אקלום למליחות על ידי הוספה הדרגתית של מלח ים. בניסויים שערכנו הוכנסו 6 דגי אמנון מכלוא בגודל בינוני (12-15 ס"מ) לשלושה אקווריומים עם מים בריכוז מלח התחלתי של 8-10 ppt (כרבע ממליחות מי הים התיכון). ברמת מליחות זו שרדו כל הדגים. לאחר יומיים החלתי בהעלאה הדרגתית של ריכוז המלח עד להגעה לריכוז הסופי. קבוצת הביקורת נחשפה באקווריום רביעי, במים נטולי מלח. באיור 3.28 מוצג אחוז שרידות הדגים החיים כפונקציה של משך החשיפה בריכוזי המלח השונים.

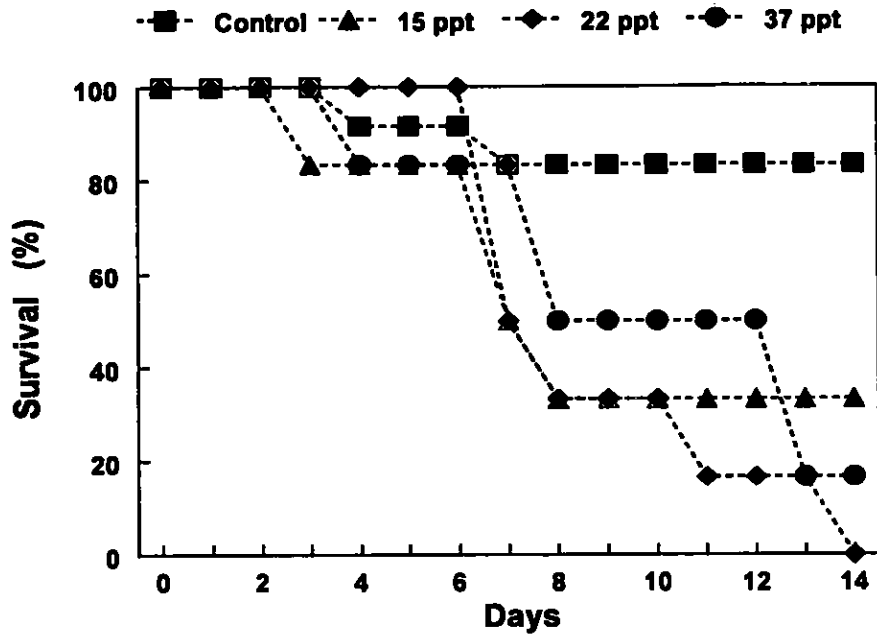


Figure 3.28: Survival (%) of *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, as a function of exposure time in some salt concentrations. n = 6.

הדגים שנחשפו לריכוזי המלח השונים נצפו לאחר חמישה, שישה ימים כסובלים מעקה חריפה. העקה התבטאה באובדן תיאבון, השחרה של צבעי הגוף, הופעת כתמים סגולים, אדמדמים באזור הפה והזימים, אובדן יכולת ויסות שיווי המשקל ולבסוף תמותה. בסך הכל מתוך 18 דגים שנחשפו למליחות בריכוזים שונים רק שלושה דגים (16.66%) שרדו לאחר שבועיים ימים.

לאור תוצאות אלו הוחלט לנסות ולבצע את פעולת ניטור הירקון המלוח באמצעות קיפונים. לשם כך, נרכשו 60 קיפוני טובר שגודלו בבריכת מים מתוקים בקיבוץ המעפיל. הדגים הוכנסו ישירות עם הגעתם למי מלח בריכוז 10 ppt. ריכוז זה הועלה באופן הדרגתי בקפיצות של 5 ppt כל יומיים עד להגעה לריכוז הסופי, היתה למליחות מי הים התיכון – 37 ppt. כל הדגים (100%) נותרו בחיים והוחזקו בריכוז זה חודשיים ימים.



### 3.4.2 דייג קיפונים בירקון המלוח

להקות דגיגים של קיפונים נראות לעיתים קרובות באזור מורד סכר שבע טחנות כאשר הן חודרות פנימה לבריכה שנוצרה מתחת למפל. המעבר מהנחל לבריכה הוא צר למדי (2-3 מטר) עובדה שנוצלה על ידינו על מנת ללכוד את הדגים בעוברם באמצעות רשת גריפה. לכידה כזו התבצעה ב- 30/08/01 ומתוך הדגים שנתפסו היו רובם המכריע קיפוני טובר ומיעוטם דגיגונים של אמנון מצוי. 10 פרטים של קיפון טובר נלקחו לאנליזה ביוכימית במעבדה.



קיפוני טובר נוספים נתפסו עוד קודם לכן, בתאריכים 17/10/99 ו- 14/04/00 על ידי דייגים מקומיים באזור שפך הירקון, בקטע שבין גשר רוקח לגשר ווקופ. הממצאים הביוכימיים משני הדיגומים, בשבע טחנות ובשפך הירקון, הושוו לממצאים שהתקבלו מקיפוני טובר שנרכשו ממדגה קיבוץ המעפיל.

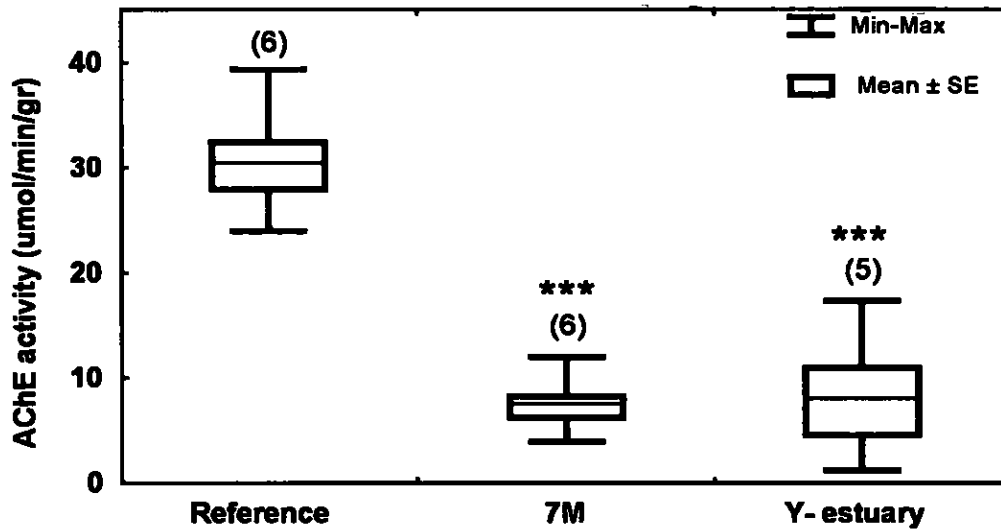
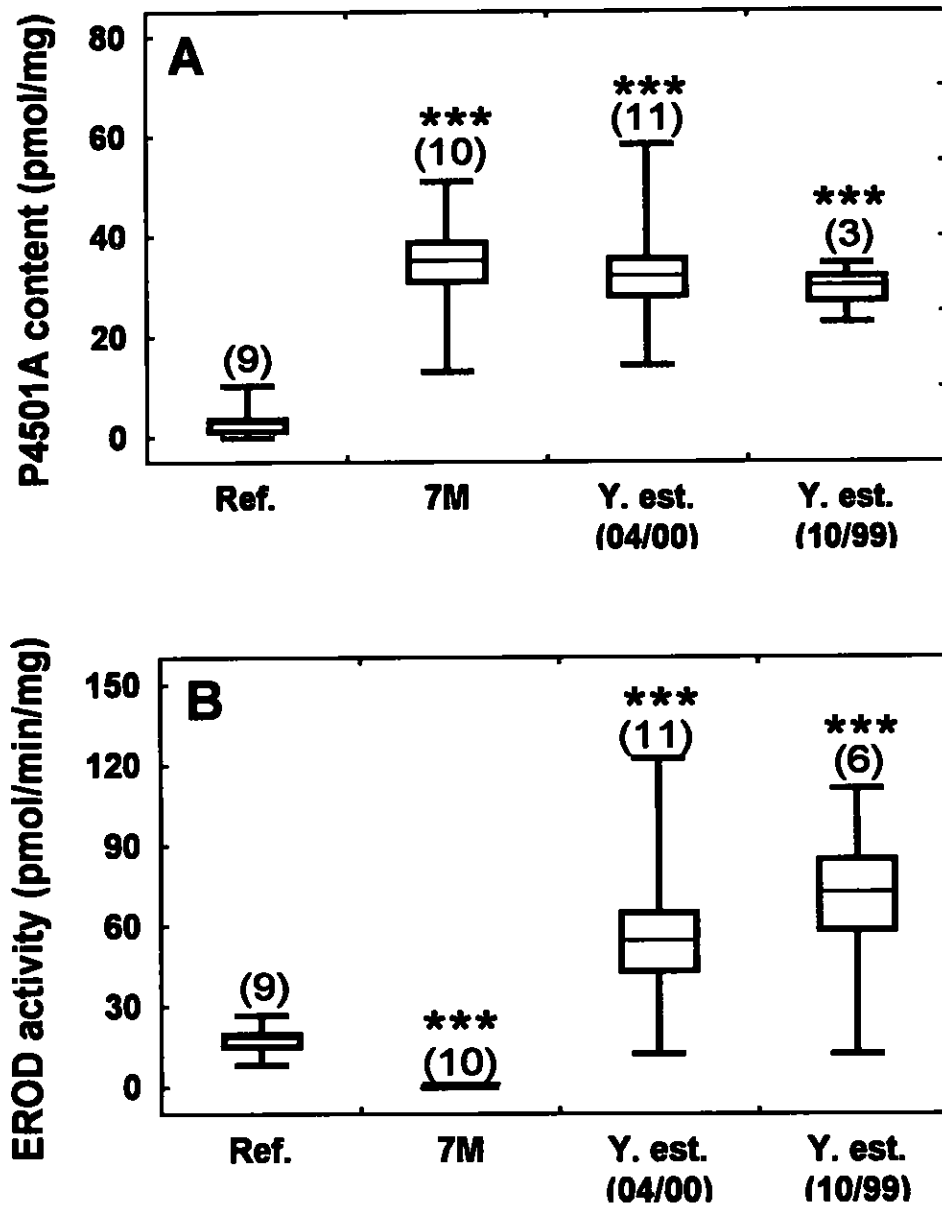


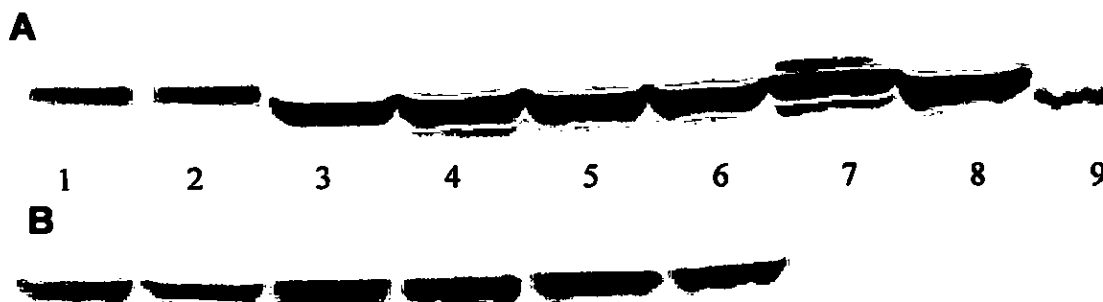
Figure 3.29: Liver AChE activity in *Liza ramada* caught at Yarqon estuary and below “7 mills” dam (7M). n is given in parenthesis. \*\*\*P<0.001 when compared to reference data.

עיכוב משמעותי של כ- 75% ( $P<0.001$ ) נמצא בפעילות האנזים AChE ברקמת הכבד בדגים שנתפסו בשבע טחנות (09/01) ובשפך הנחל (04/00) לעומת הפעילות בדגים שהובאו ממדגה קיבוץ המעפיל (איור 3.29). אין חפיפה בטווחי הפעילות האנזימטית ברקמות השונות בדגי הירקון והמעפיל.



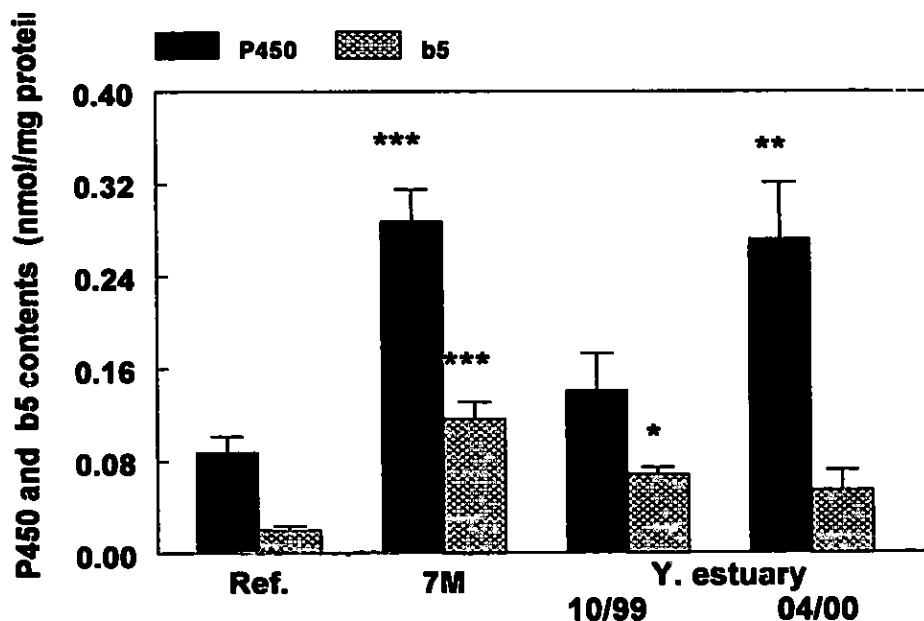
**Figure 3.30:** P4501A content (A) and EROD activity (B) in *Liza ramada* fished at Yarqon estuary and below “7 mills” dam (7M). Values are presented as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis. \*\*\* $P < 0.001$  when compared to reference data.

בהשוואה לדגי המעפיל תכולת P4501A הספציפית נמצאה גבוהה באופן מובהק ( $P < 0.001$ ) בדגי שבע טחנות ובשני הדיגומים בשפך הירקון ודומה בין המדגמים (איורים 3.31, 3.30). בבחינת פעילות EROD (איור 3.29B) נתגלתה תמונה מעניינת כאשר נמצאו שלוש קבוצות סטטיסטיות: בקיפונים שנתפסו בשפך הירקון הייתה עלייה מובהקת ( $P < 0.001$ ) לעומת קבוצת הייחוס, אך בדגי שבע טחנות הפעילות הייתה אפסית (מתחת לגבול יכולת הגילוי) ונמוכה באופן מובהק ( $P < 0.001$ ) מן הקבוצות האחרות לרבות קבוצת הייחוס.



**Figure 3.31:** Western blot analysis of hepatic microsomes of *Liza ramada* from reference and Yarqon sites. Blot was stained with anti scup CYP1A1 Mab (1-12-3). Each lane represents one fish and contains 15 pmol P450. Blot A lanes: 1,2, 1pmol scup CYP1A1; 3-8, Yarqon estuary (04/00); 9, reference site (fish farm). Blot B lanes: 1, calibrated microsome (1.8 pmol); 2-6, 7M; 7-8, reference site (fish farm).

תכולת ציטוכרום P450 וציטוכרום  $b_5$  בקיפוני שבע טחנות הייתה גבוהה באופן מובהק לעומת קיפוני המעפיל (איור 3.32). תכולת ציטוכרום  $b_5$  בדגים אלו הייתה גבוהה באופן מובהק גם מאלו של דגי שפך הירקון. דגי שפך הנחל שנידוגו ב- 10/99 היו בעלי תכולת ציטוכרום P450 ממוצעת דומה לדגי קבוצת הייחוס אך עם תכולת ציטוכרום  $b_5$  גבוהה יותר בקיפונים שנידוגו שישה חודשים מאוחר יותר (04/00) נמצאה עלייה מובהקת בתכולת ציטוכרום P450 אך לא בציטוכרום  $b_5$ .



**Figure 3.32:** Cytochrome P450 and  $b_5$  contents in *Liza ramada* fished at Yarqon estuary and below "7 mills" dam (7M). Values are presented as mean  $\pm$ SE.  $n = 6-11$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when compared to reference data.

### 3.4.3 חשיפת קיפונים בכלובי רשת במי הירקון המלוח

בתאריך 30.05.00 אירעה תקלה חמורה בתחנת הכוח רידינג ובעקבותיה יותר משתי טונות של מזוט עשו דרכן לשפך הנחל באמצעות תעלת מוצא מי הקירור של טורבינות התחנה. מוצא התעלה ממוקם בשפך הנחל ממש בנקודת התמזגותו עם הים התיכון. משטרי הזרימה במקום מושפעים ממחזורי גאות ושפל. על אף ניסיונות לעצור את התפשטות כתם המזוט באמצעות שרוולי ספיגה הייתה חזירה של מזוט כמה מאות מטר פנימה במעלה הנחל.

כשבוע (08.06.00) לאחר אותה דליפת מזוט מתחנת הכוח רידינג, הוטמנו ארבעה כלובי רשת בשלושה אתרים לאורך הירקון המלוח במרחקים שונים ממקור הזיהום. 35 דגים (150-200 גרם) מהמין קיפון טובר שנרכשו מקיבוץ המעפיל ואוקלמו למליחות בריכוז של מי ים שימשו לניסוי. 30 קיפונים הושמו בכלובים ו- 5 נלקחו לאנליזה ביום תחילת הניסוי (Day 0). ארבעת הכלובים הוטמנו כמפורט בטבלה מספר 3.3 שלהלן:

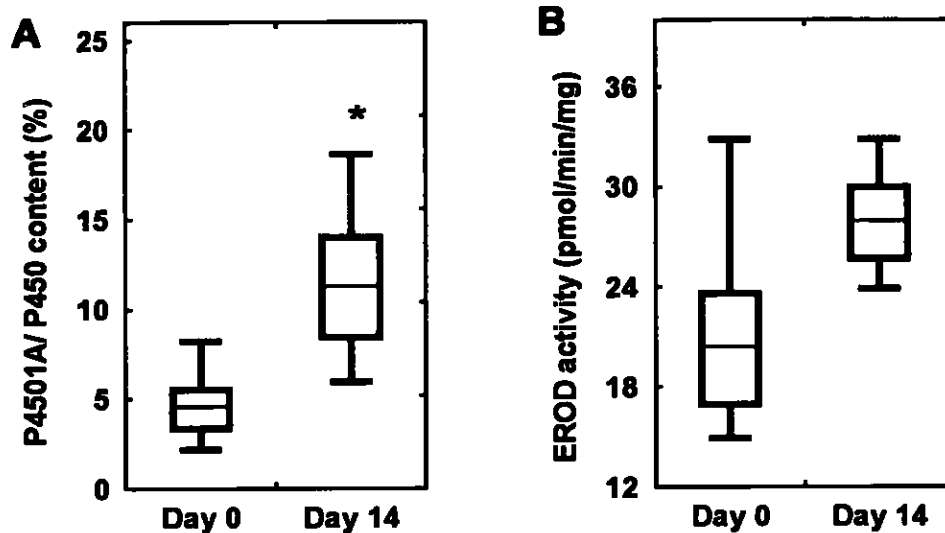
**Table 3.3: Caging *Liza ramada* at various distances from oil leakage site.**

Cage location	Position in water column (Depth in meters)	Distance from leakage site Km	No. of live fish		
			Day	Day 4	Day 14
Below "Seven Mills" dam	Bottom (2-3)	~4.5	8	0	-
Below Yarqon-Ayalon confluence	Bottom (3-4)	~3.5	8	0	-
Under Rokach Bridge	Middle (2-3)	~1	8	6	4
Under Rokach Bridge	Surface (0)	~1	6	0	-

ארבעה ימים לאחר הטמנת הכלובים נבדק מצב הדגים. בשלושה מתוך ארבעת הכלובים הדגים נמצאו מתים. הדגים היו במצב של ריקבון מתקדם מה שמעיד שהתמותה התרחשה ככל הנראה כבר ביום, יומיים הראשונים. מהטבלה ניתן לראות שכבר לאחר ארבעה ימים מתו 24 דגים מתוך 30 (80%). מעניין לציין שרק הדגים ששהו במרכז עמודת המים שרדו. השערתנו היא שייתכן ועל פני הקרקעית תמותת הדגים נבעה מחוסר חמצן בעוד שעל פני המים סיבת המוות עשויה להיות קשורה לשמנים שצפו על פני המים וחנקו את הדגים.

הדגים ששרדו באתר גשר רוקח (Day 14) נלקחו לבדיקות ביוכימיות במעבדה (איור 3.33). תכולת ציטוכרום P4501A הממוצעת לא הייתה שונה בין הדגים שנחשפו בירקון ודגי האסופה. ברם, כאשר בוחנים את החלק היחסי של P4501A מתוך התכולה הכללית של P450 הרי שבדגי

רוקח חלק זה גבוה באופן מובהק ( $P < 0.05$ ). רמת פעילות EROD בדגים שנחשפו למי הירקון עלתה פי 1.4 אך עלייה זו אינה מובהקת. תכולת ציטוכרום b<sub>5</sub> הממוצעת בשתי הקבוצות הייתה כמעט זהה.



**Figure 3.33:** P4501A out of total P450 (A) and EROD activity (B) in *Liza ramada* before (Day 0, n=5) and after caging (Day 14, n=4) under Rokach bridge at Yarqon estuary. Values are present as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). \* $P < 0.05$ .

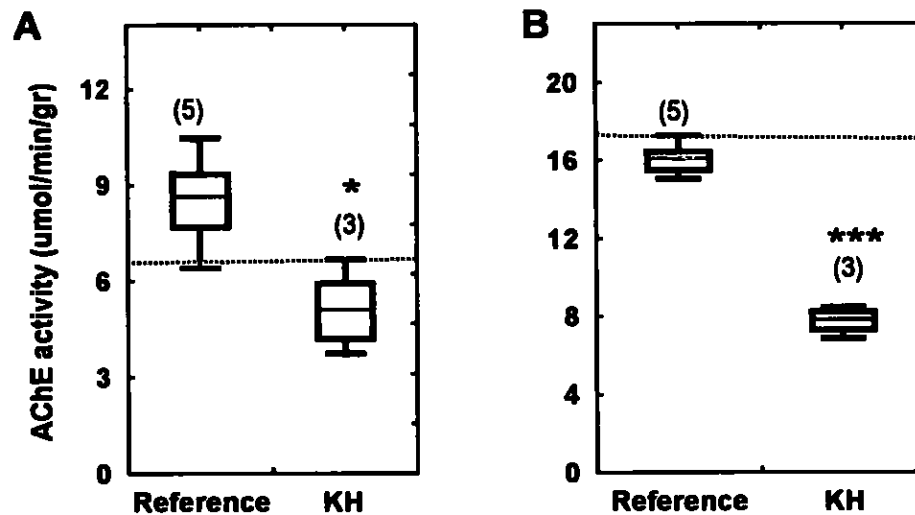
### 3.5 ניטור איכות קולחי המוצא של מכוני טיהור השפכים המזורמים לירקון

מקורות המים העיקריים של הקטע התיכון בנחל הירקון הנם מכוני טיהור השפכים בכפר סבא- הוד השרון וברמת השרון. על מנת לזהות באופן חד משמעי מקורות אפשריים לזיהום הנחל בתרכובות ביולוגיות רעילות נבדקה איכותם של קולחי המוצא של מכוני אלו. רמת טיהורם ואיכותם של הקולחין בין שני המכוני הייתה שונה. נכון לתקופת המחקר, מכון כפר סבא-הוד השרון הוציא קולחין ברמה שניונית באיכות שלא אפשרה חשיפה של דגים ליותר מכמה שעות מבלי להורגם. השיטה היחידה בה אפשר היה לבדוק את איכות המים וגם זאת באופן מוגבל הייתה באמצעות מדגמי מים. איכותם של קולחי מטיי ש רמת השרון, לעומת זאת, הייתה גבוהה יותר מה שאפשר ניסיונות חשיפה ארוכי טווח.

### 3.5.1 חשיפת אמנונים לדגימות מים ממכוני טיהור השפכים

דגימות מים ממכוני טיהור השפכים (מטי"ש) הובאו למעבדה בינואר 2000. המים נדגמו, לאחר גמר טיפולם, בנקודת היציאה של המכונים לכיוון נחל הירקון. מידי שבוע ובמשך חודש, הובאו 60 ליטר מים ממטי"ש כפי"ס-הוד השרון (KH) ומטי"ש רמת השרון (RH).

דגימות המים ממטי"ש כפי"ס-הוד השרון היו בעלות ריח חריף המזכיר ריח של תרכובות דלק. ששת אמנוני המכלוא שנחשפו למים אלו נמצאו מתים לאחר פחות מיממה. המים הוחלפו ושלושה דגי אמנון נוספים נחשפו לדגימות מים נוספת. לאחר שעה בלבד, דג אחד כבר היה מת והשניים האחרים היו בפרפורי גסיסה. רקמות המוח והזימים של שלושת הדגים נלקחו לאנליזה פרופיל AChE. ממצאי האנליזה הושו לממצאים מאמנונים מאותה אסופה שנקטלו באותו יום (איור 3.34).



**Figure 3.34:** Gills (A) and brain (B) AChE activity in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish were exposed to water samples from Kfar Saba-Hod HaSharon wastewater treatment plant. Values are present as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis. Baseline values are indicated by dash (n=84). \*P<0.05, \*\*\*P<0.001 when compared to reference data.

ביחס לקבוצת הייחוס ולקו הבסיס, בפעילות AChE ברקמת המוח בדגים שנחשפו לדגימה מ-01/00 הירידה היא של יותר מ-50% ( $P<0.001$ ). דגים אלו נחשפו, כאמור, לשעה אחת בלבד ונמצאו מפרפרים. ברקמת הזימים של דגים אלו הירידה בפעילות הייתה של 40% ( $P<0.05$ ). יחד

עם זאת יש לציין שהפעילות בזימים אינה חורגת מהפעילות השגרתית המוכרת לנו ואינה נמוכה מקו הבסיס.

בפברואר 2001 נלקחה דגימת מים ממכון הטיהור כפי"ס-הוד השרון (KH). ארבעה אמונוני מכלוא נחשפו במשך 5 שעות לדגימת המים ולאחר מכן נקטלו. דגים אלו לא הראו סימני מצוקה פיסיוולוגיים ו/או התנהגותיים במהלך החשיפה. ממצאי אנליזת AChE לא היו שונים בין הדגים שנחשפו לדגימת המים מאותה אסופה (הממצאים אינם מוצגים).

כל ששת הדגים שנחשפו לדגימות מי מט"ש רמת השרון מ- 01/00 נותרו בחיים עד תום הניסוי (פרטי הניסוי מופיעים בסעיף 3.3.3). בסך הכל הובאו ארבעה דגימות שבועיים במהלך חודש זה. המדגמים נלקחו בשעות שבהן רמת הכלור הנותר במים הייתה נמוכה מ- 0.3 mg/l. פעילות AChE בדגים שנחשפו לדגימות מים מרמת השרון נמצאה תקינה ברקמות המוח והזימים, אולם הפעילות בזימים נמצאה נמוכה באופן מובהק ( $P < 0.05$ , 37.7%) מזו שבדגים שנחשפו למי מאגר ראש העין באותו ניסוי (איור 3.25).

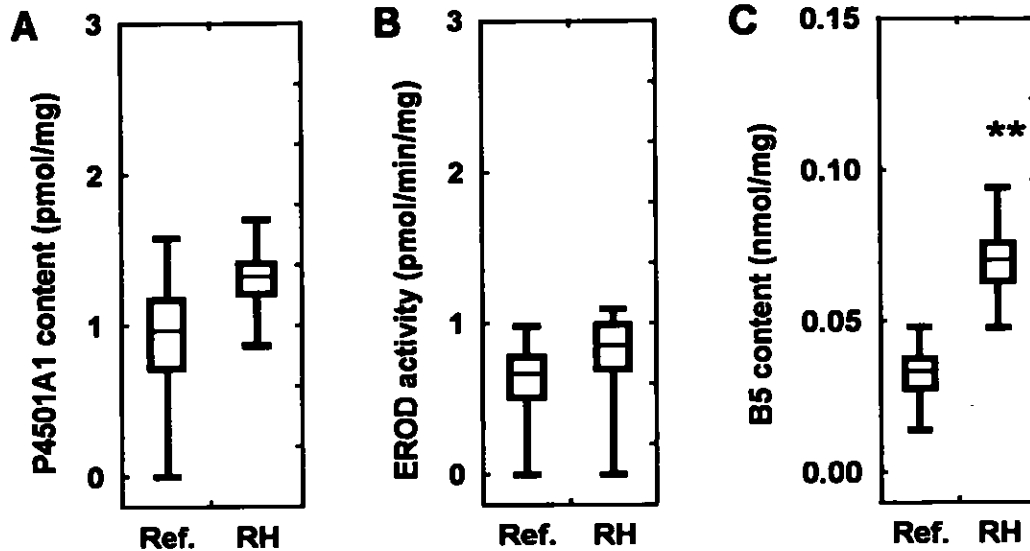
בבדיקת מרכיבי מערכת P450 באמונוני שנחשפו למדגמי מים מרמת השרון נמצא כי תכולת ציטוכרום P4501A וחלקה היחסי מהתכולה הכללית של ציטוכרום P450 היו גבוהות באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) מזו של שאר קבוצות הדגים לרבות קבוצת הביקורת (איור 3.26). תכולת ציטוכרום P4501A הייתה גבוהה פי 5.55 בדגי רמת השרון לעומת הביקורת. לעומת זאת, פעילות EROD והתכולה הכללית של ציטוכרום P450 לא היו שונות מאלו של קבוצת הביקורת.

### **3.5.2 מערכת ניטור ביולוגי בזרימה רציפה במכון טיהור השפכים ברמת השרון**

במט"ש רמת השרון הוקמה על ידי מערכת זרימה רציפה (Continuous flow through). הקולחין ברמה שלישונית שמייצר המכון ואשר מוזרמים לנחל הירקון עברו באופן רציף דרך המערכת. המים עברו תחילה דרך מיכל אוורור על מנת לנטרל את השפעת הכלור המוסף לקולחין. ממילק האוורור המים עברו למיכל הדגים ומשם החוצה. בניסויים נחשפו שני מיני דגים (אמנון מכלוא וקרפיון מצוי) במשך 30 יום לקולחי המכון.

ב 08/00 נחשפו 12 קרפיונים מצויים במשך 30 יום במערכת הזרימה שתוארה לעיל. עשרה מהדגים היו בחיים עד יום לפני תום הניסוי אך בשל תקלה באותו היום במשאבת הכלור הייתה עלייה משמעותית ברמת הכלור במים ושלושה דגים מתו. שבעת הדגים שנותרו בחיים נלקחו לאנליזה ביוכימית.

פעילות EROD ותכולות ציטוכרום P450 ו-P450A1 בדגים אלו הושוּוּ לפרמטרים אלו בדגים מאותה אסופה שלא עברו שום טיפול ונקטלו באותו מועד. בכל הפרמטרים שנבדקו הייתה עלייה מתונה אך לא מובהקת בקרפיונים ששהו במערכת הזרימה לעומת קבוצת הביקורת (איור 3.35). לעומת זאת, בתכולת ציטוכרום  $b_5$  הייתה עלייה מובהקת ( $P < 0.01$ ) בדגי רמת השרון.

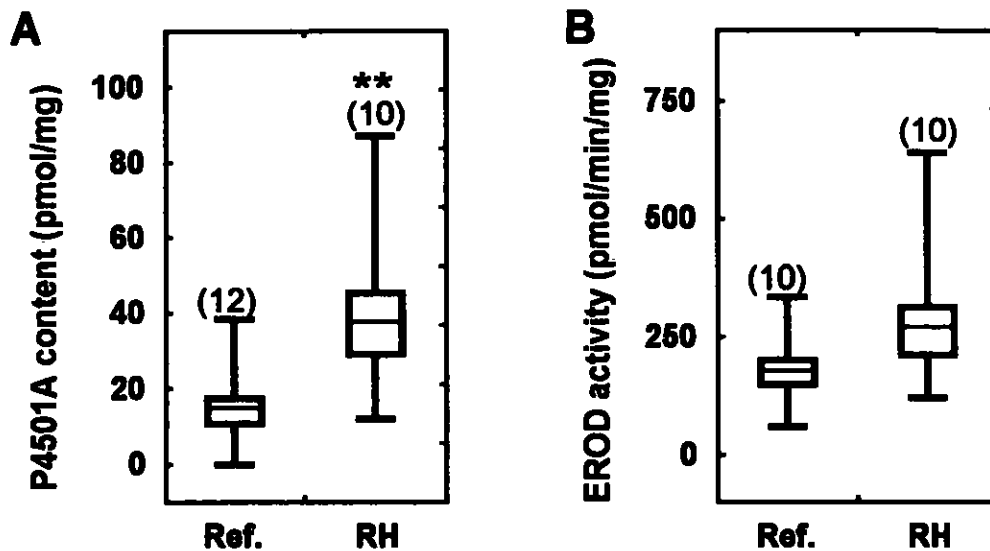


**Figure 3.35:** P450A1 content (A), EROD activity (B), and  $b_5$  content (C) in *Cyprinus carpio* held for 30 days in a continuous flow-through system at Ramat HaSharon wastewater treatment plant. Values are present as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE).  $n = 6-7$ .

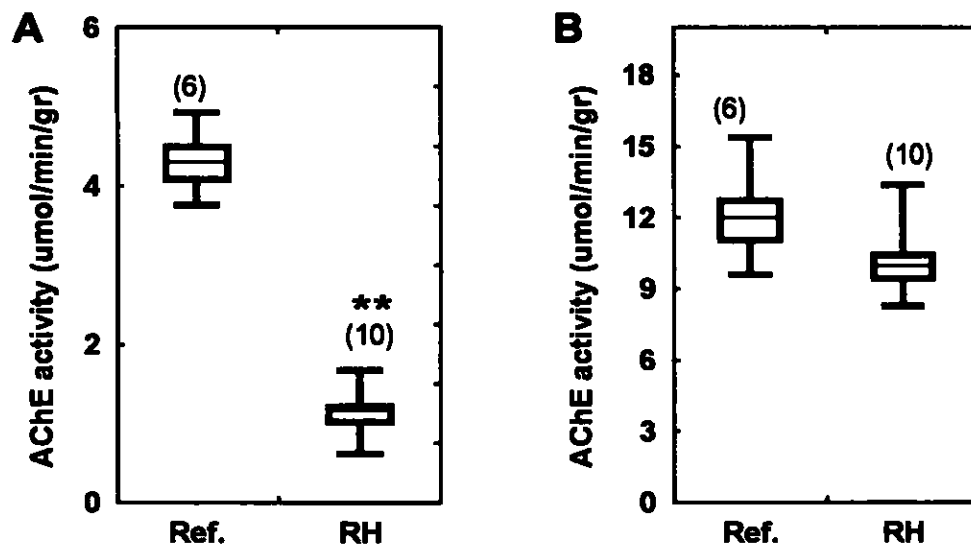
ב 11/00 נחשפו 10 אמנוני מכלוא, במשך 30 יום, במערכת הזרימה הרציפה במכון רמת השרון. כל הדגים שרדו את הטיפול ונמצאו בסופו במצב פיסיולוגי טוב. ממצאי האנליזות האנזימטיות הושוּוּ לממצאים מדגים מאותה אסופה. בעוד שפעילות EROD לא הייתה שונה בין שתי הקבוצות (איור 3.36) הרי שתכולת ציטוכרום P450A1 הייתה גבוהה פי 2.63 בדגי רמת השרון ( $P < 0.01$ ). גם בחלק היחסי של תכולת P450A1 מתוך התכולה הכללית של ציטוכרום P450 נמצאה עלייה בשיעור של יותר מפי 2 ( $P < 0.01$ ).

בבחינה של פרופיל AChE (איור 3.37) נמצא כי חלה ירידה חדה של כ- 75% בפעילות רקמת הזימים באמנונים שנחשפו במערכת הזרימה הרציפה ( $P < 0.01$ ). ברקמת המוח בדגים אלו לא הובחנה ירידה מובהקת.





**Figure 3.36:** *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* held for 30 days in a continuous flow-through system at Ramat HaSharon wastewater treatment plant. (A) P4501A content. (B) EROD activity. Values are present as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis. \*\*P<0.01.



**Figure 3.37:** Gills (A) and brain (B) AChE activity in *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fish were held for 30 days in a continuous flow-through system at Ramat Hasharon wastewater treatment plant. Values are present as range (min-max) and mean ( $\pm$ SE). n is given in parenthesis. \*\*P<0.01.

סיכום כלל הממצאים הביוכימיים שנמצאו בדגי הירקון מתואר בטבלה 3.4. הממצאים מרוכזים עבור כל אתר בנחל בסדר יורד מהמעלה למורד. שלושת חלקי הטבלה מייצגים את שלושת קטעי הנחל: עליון, תיכון ומלוח. הפרמטרים השונים מוצגים כיחס שבין דגים שנחשפו למי הירקון לבין דגים מאתרי ייחוס או קבוצות ביקורת.

עיון בטבלה מראה שמבין שיטות העבודה, זייג של דגים מקומיים נמצא כשיטה הטובה ביותר לזיהוי חשיפה לתרכובות בעלות רעילות ביולוגית. חשיפה לדגימות מים היא שיטה פחות רגישה מאשר השיטות האחרות, בהיבט של כמות החומרים שאליהם נחשפים הדגים. למרות זאת, נמצאו בדגים שנחשפו למספר דגימות מים תגובות ביוכימיות המעידות על חשיפה לתרכובות רעילות.

במאגר מקורות בראש העין נמצאו בבדיקות השונות אינדוקציה של ציטוכרום P4501A ועיכוב של האנזים AChE. הממצאים מעידים על חשיפה לפרקים של מאגר זה לחומרי הדברה ולפסולת תעשייתית רעילה. העובדה שעלייה בפעילות EROD וירידה בפעילות AChE נמצאה בדגים שנחשפו לדגימות מים מראש העין מלמדת על נוכחות של ריכוזים גבוהים יחסית של מזהמים במים. ממצאי הדגים שנחשפו בקטע שבין מאגר ראש העין ומפגש הנחלים ירקון-קנה, כמו גם במט"ש כפר-סבא הוד השרון, מצביעים בדרך כלל, על פגיעה גבוהה יותר בפעילות AChE ברקמת המוח לעומת הזימים. מגמה זו מתהפכת בדגים שנחשפו למי מורד הקטע התיכון של הנחל או מי מט"ש רמת השרון. הממצאים הביוכימיים ממיני הדגים השונים באתר שבע טחנות מצביעים על שתי תופעות מעניינות: האחת היא תכולה כללית גבוהה של ציטוכרום P450 והשניה היא אינדוקציה של ציטוכרום P4501A שאינה מלווה בעליה מקבילה בפעילות EROD. לעומת זאת, בקיפונים שנלכדו באזור שפך הנחל נמצאו רמות אינדוקציה גבוהות של P4501A שכן לוו בעליית הפעילות.

Table 3.4: Sampling sites/ reference ratios of biochemical parameters in the Yargon stream

Site	Date	Method	Exposure duration	Species	% survival	n	Gills AChE	Brain AChE	Liver AChE	bs	P450	EROD	P4501A
AM	18.10.99	Water sample	30 days	<i>Oreochromis sp.</i>	62.5%	4-5	0.70*	0.60**	-	1.92	1.78	6.16*	1.26
	23.01.00	Water sample	30 days	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	4-6	1.28	1.07	-	0.52	1.29	3.02	0.63
	02.04.00	caging	21 days	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	12	0.78*	0.77*	-	1.86**	1.98*	2.26*	4.38*
	20.08.00	fishing	Life span	<i>C. carpio</i>	-	6	-	-	-	9.2*	4.26**	1.96*	7.96***
Upper Yargon	12.04.00	fishing	Life span	<i>C. carpio</i>	-	5	-	-	-	0.15*	0.20**	0.70	0.28*
	16.04.01	Water sample	7 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	5	0.79	1.08	-	-	-	-	-
KH	23.01.00	Water sample	18 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	0%	6	-	-	-	-	-	-	-
	25.01.00	Water sample	1 hour	<i>Oreochromis sp.</i>	0%	3	0.59*	0.48***	-	-	-	-	-
	25.02.01	Water sample	5 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	4	0.99	1.15	-	-	-	-	-
Below Y-Q	18.10.99	Water sample	18 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	0%	6	1.03	0.45***	-	-	-	-	-
	16.04.01	Water sample	7 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	5	1.10	1.03	-	-	-	-	-
Mitug	16.04.01	Water sample	7 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	5	0.62*	0.76*	-	-	-	-	-
RH	07.02.00	Water sample	30 days	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	6	0.8	1.06	-	1.11	1.69	2.67	5.56**
	29.08.00	Flow through	30 days	<i>C. carpio</i>	83.33%	7	-	-	-	2.09**	1.66	1.79	1.69
	05.11.01	Flow through	30 days	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	10	0.26**	0.84	-	-	1.3	1.5	2.64**
Above 7M	23.01.00	Water sample	30 days	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	6	0.84	1.05	-	1.7	2.2*	1.82	0.62
	16.04.00	caging	2 days	<i>Oreochromis sp.</i>	15%	3	0.13***	0.62**	-	-	-	-	-
	16.04.01	Water sample	7 hours	<i>Oreochromis sp.</i>	100%	5	0.82	1.06	-	-	-	-	-
Below 7M	16.09.01	fishing	Life span	<i>S. galleus</i>	-	5	0.59**	1.51**	0.47**	2.08	2.35**	1.41	42.79*
	16.09.01	fishing	Life span	<i>T. zillii</i>	-	5	0.18**	0.95	0.06**	-	-	-	-
	16.09.01	fishing	Life span	<i>C. carpio</i>	-	5-7	0.61*	0.82	0.74*	9.8*	4.41*	0.36	13.51***
Below 7M	16.09.01	fishing	Life span	<i>Liza ramada</i>	-	10	-	-	0.24***	5.8***	3.27***	0***	14.73***
	08.06.00	caging	14 days	<i>Liza ramada</i>	13.33%	4	-	-	-	1.03	0.49*	1.37	1.32
Yargon estuary	17.10.99	fishing	Life span	<i>Liza ramada</i>	-	6	-	-	-	3.4*	1.6	4.11***	12.47***
	14.04.00	fishing	Life span	<i>Liza ramada</i>	-	11	-	-	0.26***	2.7	3.09**	3.1***	18.97***

Red letters indicates significant decrease in AChE activity or significant elevation in components of cytochrome P450 system compared to reference sites.

\*Significant different from the reference sites value \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*P<0.001.

Abbreviations: AM, Mekorot reservoir in Rosh Hayin; KH, Kefar Saba WWTP; RH, Ramat Hasharon WWTP; Y-Q, Yargon-Qana confluence

## 4. דיון

### 4.1 סמנים ביולוגיים לניטור הסביבה האקוטית

מערכות אקולוגיות אקוטיות נחשפות לעקה אנטרופוגנית ההולכת וגוברת במהלך עשרות השנים האחרונות (Adams and Greeley, 2000). התפתחות התעשייה והעיור באזורי החוף הביאו לחדירה של אלפי כימיקלים חדשים וחומרים אורגניים, המאיימים על קיומם של אורגניזמים ומערכות אקולוגיות (Bresler *et al.*, 1999). נחלי החוף בישראל סובלים מהשפעה משולבת של זיהום כרוני בשפכים ביתיים ותעשייתיים ותפיסה של מקורות המים הטבעיים לצרכים אחרים (Gasith, 1992). עיקר ניטור איכות המים בנחלים אלו מתבסס על מדדים כימיים ופיסיקליים של דגימות מים וסדימנט (Bar-Or, 2000). אנליזה כימית יכולה להניב מידע רב ערך לגבי זהות, כמות ושכיחות התרכובות המזהמות את מי הנחל. על כל פנים, אחת הבעיות הקשות ביותר בתחום האקוטוקסיקולוגיה היא להעריך את הסיכון הכרוך בחשיפה של אורגניזמים למכלול של תרכובות (Walker, 1998). רשימת נוכחות כימיקלים אינה מספקת מידע לגבי ההשפעה הביולוגית הכוללת שלהם, ולא ניתן לדעת מה היא זמינותם הביולוגית או אלו אינטראקציות מתקיימות בין החומרים (קרי, סינרגיזם, אדיטיביות או אנטגוניזם). בנוסף, דגימות מים משקפות תמונת מצב נקודתית ורגעית של נוכחות כימיקלים במים, שאינה בהכרח מייצגת נאמנה את המצב האמיתי לאורך הזמן ובמרחב גוף המים כולו.

שאריות כימיקלים עשויות להצטבר ברקמות האורגניזם כתלות בתכונות המאכסן כגון: רמה טרופית במארג המזון, קצב גידול, משקל, קצב מטבולי ועוד, ואו כתלות במאפייני החומרים עצמם כמו דרגת מסיסות, מקדם מים/שמן, יציבות כימית ועוד (De Flora *et al.*, 1991). דג התי במים מסנן דרך זימיו ופיו כמויות עצומות של מים וקולט תוך כדי כך ודרך מזונו שאריות כימיקלים (Woodworth *et al.*, 1998). בעוד ששיירי חומרים כמו קוטלי חרקים נמהלים ומתמוססים במים, מה שמקשה על האנליזה הכימית, הרי ששיירים אלו מתרכזים בפאזה השומנית של בעל החיים (Yawetz *et al.*, 1993b). אנליזה כימית של רקמות הגוף יכולה לזהות הצטברות של תרכובות רעילות. יחד עם זאת, על אף שההצטברות הביולוגית (bioaccumulation) היא פרמטר הקשור לרמת החשיפה וקובע את רמת הנטל על הגוף (body burden), היא כשלעצמה אינה מהווה השפעה או סימן אזהרה (Feijtel *et al.*, 1997).

בניטור ביולוגי נעשה שימוש בסמנים ביולוגיים לשם זיהוי של חשיפה ו/או השפעה של תרכובות בעלות רעילות ביולוגית למאכלסי המים. הנחת העבודה היא שהשפעת רעילות תונבטא בראש ובראשונה ברמות הארגון הביולוגיות הבסיסיות. אי לכך, תגובות ביוכימיות ומולקולריות שנמצאו קשורות לנוכחות מזהמים יכולות לשמש כסמנים ביולוגיים המהווים אזהרה מוקדמת טרם הפגיעה ברמות האוכלוסייה, החברה והמערכת האקולוגית (Adams and Greeley, 2000). השימוש בסמנים פרופיל AChE ואינדוקציה ציטוכרומי P450 בדגי גרם לשם זיהוי שאריות תרכובות מזהמות

בסביבה המימית, הנו נפוץ ועל כך מעידה הספרות הענפה הקיימת בנושא. במחקר זה נוצלו סמנים אלו במיני דגים שונים שנחשפו למי הירקון, לשם זיהוי שאריות תרכובות רעילות בנחל ומקורותיו.

## 4.2 קביעת רמות הרקע האנזימטיות בדגי המחקר

אחת המשימות הראשונות במחקר הייתה קביעת רמות הרקע האנזימטיות עבור דגי המחקר. במדגמים מאסופות הדגים נעשתה אנליזה של הסמנים הביוכימיים הרלוונטיים למחקר. אנליזה זו שירתה מספר מטרות:

- א. יצירת בנק נתונים לשם קביעת רמות הרקע של הסמנים הביוכימיים במיני דגים שונים.
- ב. קבלת נתוני ייחוס לניסויים שיתבצעו בהמשך המחקר בדגי אותה אסופה.
- ג. שלילה של חשיפת דגי האסופה בבריכות הגידול לרמות משמעותיות של מעכבי AChE ו/או משרני מערכת ציטוכרום P450. בריכות הגידול אינן חשודות כמקום סטרילי נטול תרכובות בעלות רעילות ביולוגית, ועל כן יש לבדוק עבור כל אסופה מהי נקודת האפס מבחינת הפעילות הביוכימית.

במעבדתנו נאגרים נתונים של רמות הרקע של מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 ופעילות AChE במיני דגים שונים. בנק נתונים זה מאפשר לנו להעריך את הפעילות האנזימטית השגרתית הצפויה בדגים שלא נחשפו לשאריות משמעותיות של תרכובות ביולוגיות רעילות. מן הנתונים הללו ניתן לקבל את קו הבסיס האנזימטי שישמש להערכת עוצמת התגובה הביוכימית של דגים שנחשפו למזהמי סביבה. כך למשל, בהעדר קבוצת ביקורת, משמשים נתוני הרקע כקבוצת ייחוס לדגים שנידונו, לדוגמה, בנחל הירקון.

בבחינת רמות הרקע האנזימטיות של אסופות דגי האמנון נמצאו הבדלים מובהקים בין המדגים השונים. כל אסופות מדגה קיבוץ המעפיל במחקר זה היו בעלות ממוצע פעילות AChE דומה. פרופיל הפעילות והדמיון בערכים הממוצעים של האסופות מצביעים על כך שדגי מדגה זה לא נחשפו לשאריות משמעותיות של מעכבי AChE. ערכי מערכת ציטוכרום P450 בכל מיני הדגים שנרכשו מקיבוץ המעפיל היו נמוכים יחסית ולא נצפתה אינדוקציה משמעותית של ציטוכרום P4501A. בהשוואת ערכים אלו לערכים בדגי קבוצות ביקורת שתוארו בספרות הם נמצאו דומים או אף נמוכים יותר במינים: קרפיון מצוי (Marionnet *et al.*, 1997; Taysse *et al.*, 1998), אמנון מכלוא (Ueng and Ueng, 1995; Ueng *et al.*, 1995), וקיפון טובר (Yawetz *et al.*, 1998).

במדגם של אסופת האמנונים שהובאה ממדגה קיבוץ עין חרוד נמצא, שפעילות AChE הממוצעת הייתה נמוכה באופן מובהק ברקמות המוח ( $P < 0.001$ ) והזימים ( $P < 0.01$ ) מן הפעילות הממוצעת באותן רקמות בדגי קיבוץ המעפיל. משמעות ירידת פעילות AChE היא שהדגים נחשפו בבריכות

הדגים ככל הנראה, לרעלי עצב האופייניים לחומרי הדברה מהחקלאות מסוג אורגנוזרחנים ואו קרבמטים. בחינת מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 בדגים אלו העלתה שהדגים נחשפו לרמה משמעותית של משרני ציטוכרום P4501A. בהשוואה לאמוני המעפיל, פעילות EROD ותכולת ציטוכרום P4501A הממוצעות בדגי מדגה עין חרוד היו גבוהות ( $P < 0.001$ ) פי 14.5 ו- 7.5, בהתאמה (איור 3.9). תכולת ציטוכרום P4501A בדגי עין חרוד לא שונה סטטיסטית מהתכולה באמוניים שקיבלו הזרקה של  $50 \text{ mg/kg } \beta\text{NF}$  ( $P=0.5$ ). העלייה בתכולת ציטוכרום P4501A והפעילות הקטליטית האופיינית לו, EROD, מצביעה על חשיפת הדגים לתרכובות הידרוקרבוניות האופייניות לפסולת תעשייתית של תעשיות פטרוכימיות, מפעלי נייר, פסולת שמנים, נפט גולמי ועוד.

זיהום הבריכות עשוי להיות מורכב מכמה מקורות: משקי הקיבוצים שואבים לבריכות הדגים מים מזוהמים בשפכים מנחל חרוד. לנחל זה מגיעים, ככל הנראה, גם שפכים תעשייתיים. השאיבות מהנחל מתבצעות בעיקר בעקבות שטפונות החורף אך גם בזרימות בסיס (קרין מ.., מתאם תכנון שיקום נחל חרוד, מידע אישי). מקור נוסף של מזהמים יכול להיות דיפוזי. בריכות המדגה ממוקמות בעמק יזרעאל, בלב ליבו של שטח חקלאי וייתכן ושאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחנים ואו קרבמטים זיהמו את בריכות הדגים דרך נחל חרוד או באופן ישיר. לסיכום, אנליזה ביוכימית של האמוניים שנרכשו ממדגה עין חרוד (סוף חורף 2000) מצביעה על חשיפה של האחרונים לרמות משמעותיות של רעלי עצב ופסולת תעשייתית הכוללת תרכובות הידרוקרבוניות רעילות. האופי השומני של תרכובות כגון אלו גורם להצטברותם בשרשרת המזון (Bocquene *et al.*, 1990; Porte and Albaigés, 1993). לעובדה זו יש משמעות חמורה עקב שימושם של אמוניים אלו למאכל אדם.

זן אמנון נוסף (*O. mossambicus x O. aureus*) שנבחר במעבדתנו כפתרון אפשרי לניטור הקטע המלוח של הירקון הובא ממדגה חברת "דגי איכות" שבנמל אשדוד. חוות דגים זו, שכבר אינה קיימת יותר, גידלה והחזיקה דגי מאכל במי ים בתוך כלובים שמוקמו פנימה לשובר הגלים, ממש בפאתי הנמל. הכלובים היו במרחק מאות מטרים בודדים ממזח הטעינה ופריקה של אוניות המשא. על אף המיקום הבעייתי, לכאורה, בקרבת מקור אפשרי לזיהום בתרכובות שמנים ודלק לא נמצאה אינדוקציה משמעותית של ציטוכרום P4501A באמוני אשדוד. במחקרם של Ueng and Ueng (1995) נערכה השוואה בין אמנון מכלוא (*O. niloticus x O. aureus*) לבין מין אמנון מאותו הסוג (*O. mossambicus*), מבחינת השפעת תרכובות שונות על מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 ברקמות הכבד והזימים. ההשוואה העלתה שיש דמיון רב בתגובת שני המינים והצעת חוקרים אלה היא, שבין מינים שונים מהסוג *Oreochromis* אין הבדל בתכונות האינדוקציה של האנזימים המיקרוזומליים ועל כן הם ברי השוואה. בהשוואה שערכתי בין אמנוני אשדוד לאמוני המעפיל נמצאו כל הערכים דומים סטטיסטית.

מחקרים מצאו בדגים שנחשפו באזורי נמלי אוניות אינדוקציה גבוהה של ציטוכרום P4501A (Monosson and Stegeman, 1994; Stegeman *et al.*, 1991). באזור הנמל באשדוד ישנו ריכוז של תעשייה כבדה - תחנת כוח הפועלת על מזוט, מסופי פחם ודלק, בתי זיקוק ותעשייה כימית המזהמים את הסביבה בחומרים פטרוכימיים (בנדק-סגל, 1996). הערכת הראשונית הייתה שדגים החיים בנמל סואן כמו נמל אשדוד עשויים להראות אינדוקציה משמעותית של ציטוכרום P4501A והרמות הנמוכות שהתקבלו הפתיעוני לטובה. ההסבר לכך טמון, ככל הנראה, במשטר הזרמים באזור כלובי הדגים. הכלובים מוקמו בסמוך לשובר הגלים, מערבית לנמל, כך שאספקת המים באה בעיקר מכיוון הים ולא מכיוון הנמל. תחלופת המים באזור השובר הנה מהירה יחסית דבר הגורם למיהול גדול של שאריות מזהמים העשויים להגיע מהנמל. הכמות והצפיפות הגבוהה של הדגים בכלובים עשויה למתן את רמת החשיפה של הפרט. כמו כן, הכלובים צפים על פני המים כך שאין אינטראקציה של הדגים עם הסדימנט שבו עשויים להיות מרוכזים רוב המזהמים. ממצא זה של ביטוי נמוך של ציטוכרום P4501A בדגים ששהו במי נמל הוא בעל משמעות להערכת רמת התפשטות הזיהום מהנמל לסביבה. ככל הנראה, הזמינות הביולוגית של מזהמים הידרוקרבוניים לדגים שחיו בהיקף הנמל הייתה נמוכה.

כפי שניתן להתרשם מהממצאים המובאים לעיל, האיכות של מי חוות הדגים מבחינת מציאות שאריות תרכובות רעילות ביולוגית אינה תמיד טובה ולעיתים הנה גרועה. יש לציין שרוב חוות הדגים מצויות באזורים פתוחים והן עשויות להיות חשופות לזיהומים דיפוזיים משדות חקלאיים סמוכים. איכות המים המסופקת לחלק מהבריכות אינה איכות מי שתייה והעומס האורגני בהן גבוה יחסית. החזקת דגים בצפיפות נמוכה יחסית, בתנאים של מים שפירים זורמים לפרקי זמן של לפחות מספר שבועות עשויה לשפר את רמות הרקע של פעילות AChE ולהוריד את תכולת הציטוכרום P4501A לרמות אפסיות. הוכחה לכך, התקבלה בפרוייקט ניטור ביולוגי של מי המוביל הארצי המתבצע במעבדתנו. במסגרת הניטור נחשפים אמנוני מכלוא במערכת זרימה רציפה במשך חודשיים, שלושה למי המוביל. הפרוייקט מבוצע במקביל בשלוש תחנות מחוזיות של חברת מקורות. ממצאי האנליזות הביוכימית מראים שחל שיפור מובהק בפעילות AChE בזימים ( $P < 0.001$ ) ובכבד ( $P < 0.01$ ), אך לא נמצא הבדל בפעילות המוח ( $P = 0.51$ ). בדגים אלו נמצאה גם ירידה מובהקת ( $P < 0.05$ ) בתכולת ציטוכרום P4501A ובפעילות EROD ( $P < 0.01$ ) לעומת פעילות הרקע המקורית של דגים מאותן אסופות ממדגה המעפיל.

ממצאים אלו וניסיונו המצטבר מלמדים על הצורך הקיים ברכישה ואחזקה של מאגר דגיגים שיגודלו ויוחזקו באיכות מים גבוהה. מאגר דגים כזה יבטיח הספקה שוטפת לצורכי מחקר של דגים בעלי פעילויות אנזימטיות תקינות עם רמת שונות נמוכה. מאגר איכותי של דגים כאלו יכול להגדיל במידה רבה את טווח הגילוי של שאריות תרכובות רעילות ביולוגית. טווח גדול יותר יאפשר זיהוי של רמות זיהום כרוניות נמוכות יחסית.

## 4.3 אינדוקציה של מערכת ציטוכרום P450

### 4.3.1 אינדוקציה ציטוכרום P4501A באמונים באמצעות $\beta$ -naphthoflavone

הפוטנציאל לאינדוקציה של P4501A במיני בעלי החיים השונים המשמשים לעבודות מחקר סביבתיות יכול להיבדק במעבדה על ידי טיפול במשרן המודל  $\beta$ NF (Andersson *et al.*, 1985). עבודות רבות שנעשו בדגים עשו שימוש ב- $\beta$ NF תוך יישומו במגוון שיטות (Haasach *et al.*, 1993). חומר זה הוא בעל פוטנציאל אינדוקציה של P4501A בחולדות הגבוה אף מתרכובות הידרוקרבוניות ארומטיות מסרטנות, כמו 3-MC ו-benzo[e]pyrene (Ionnides and Parke, 1993).

כל הטיפולים במינונים השונים של  $\beta$ NF גרמו לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A שהתבטאה בעלייה מובהקת בפעילות ובתכולת האנזים ביחס לקבוצת הביקורת (איור 3.2). קשר ליניארי חיובי ומובהק ( $P < 0.001$ ) נמצא בין פרמטרים אלו לבין מינון החומר (איור 3.3). קשר זה מלמד על תגובה התלויה במנה (dose dependent) של הסמנים הביולוגים הנ"ל. המשמעות העיקרית של ממצא זה היא שניתן לייחס את עוצמת התגובה של הסמן הביוכימי הנמדד לרמת הזיהום שאליה נחשפו הדגים. המתאם הגבוה בין תכולת ציטוכרום P4501A ופעילות EROD (איור 3.4) מלמד על הספציפיות הגבוהה של הסובסטרט Ethoxy-7-resorufin לציטוכרום P4501A. ספציפיות גבוהה זו מאפשרת לנו בסבירות גבוהה לייחס עלייה בפעילות EROD לעלייה מקבילה בתכולת הציטוכרום P4501A. יחד עם זאת, בין המינונים השונים של  $\beta$ NF לא נמצא הבדל מובהק בפרמטרים אלו. במיוחד ניכרת העובדה שהטיפול במינון 25 mg/kg גרם לאינדוקציה דומה ואפילו גבוהה קמעה מהטיפול במינון הכפול לו- 50 mg/kg (איור 3.2). הסיבות להעדרם של הבדלים מובהקים בין המינונים השונים עשויות להיות קשורות לגורמים הבאים:

1. הבדלים קטנים מידי בין קבוצות המינון בהתחשב בגודל המדגם הקטן של הקבוצות.
2. אפליקציה לא אחידה דיה הנובעת מהחדרת החומר לאתרים שונים בחלל הבטן או מהמסה חלקית בלבד של החומר. בחלק מהדגים ובעיקר באלו שקיבלו את המינונים הגבוהים יותר, נתגלו בסוף הניסוי גושים קטנים של  $\beta$ NF בחלל הבטן.
3. שונות טבעית גבוהה של אופן התגובה של פרטים שונים לאותו משרן. בהקשר זה יש לציין:  
א. הדגים הם בני כלאיים שאינם שייכים לקו גנטי נקי, מה שעשוי להגדיל את ההבדלים בניהם.  
ב. פעילות EROD ידועה כתכונה אשר אינה מתפלגת באופן נורמלי (Flammarion *et al.*, 1998a).
4. פעילות EROD עשויה להיות מעוכבת במנגנון תחרותי (Haasch *et al.*, 1993) והחלבון CYP1A עשוי לעבור שינויים בתרגום או אינאקטיבציה מנגנונית (Haasach *et al.*, 1992).



באיור 3.1 ניתן לראות פרוק של החלבון לתת יחידות דבר המתבטא בהופעת בנדים נוספים בעלי מסה מולרית נמוכה יותר. התופעה של ריבוי בנדים בתגובה עם הנוגדנים התקיימה בכמה וכמה הרצות גיל שביצעתי, אך רק בדוגמאות מסוימות ולא באחרות. ניתן לייחס תופעה זו בסבירות גבוהה, לפרוק של החלבון P4501A לתת יחידות ולא להגבה של הנוגדן עם חלבונים אחרים. הערכתי זו נובעת מכך, שהנוגדן שבו השתמשתי ידוע כספציפי ביותר לציטוכרום P4501A ותגובה אימונית הנראית כבנד בודד נראתה במחקרים רבים, ובמגוון של דגים (Goksøyr *et al.*, 1991; Stegeman, 1993). יחד עם זאת, סיבת הפירוק של החלבון P4501A והקשר האפשרי שלה לזיהום אינם ברורים. להלן יפורטו מספר אפשרויות:

1. נגזרות פעילות של הסובסטרטים, לפני או לאחר המטבוליזם שלהן, או רדיקלים חופשיים נקשרים לאנזים וגורמות לפירוקו. מגמה זו עשויה להתגבר כאשר מסלול הדטוקסיפיקציה ברוויה עקב חשיפה לזיהום רב.

2. בפרקציה המיקרוזומלית ישנן פרוטאזות שעם הליך הכתישה של הכבד משתחררות במדיום ומפרקות חלבונים. פעילות כזו ניתן לעכב באמצעות הוספת מעכבי פרוטאזות לפני ההרצה.

אפשרות נוספת, שלדעתי ניתן לפוסלה, היא דנטורציה של החלבון כתוצאה מהחזקה לקויה. המיקרוזומים ששימשו למחקר זה הוקפאו באופן מיידי לאחר הפקתם בחנקן נוזלי ( $-170^{\circ}\text{C}$ ). לצורך הבדיקות הופשרה, ממש לפני ההרצה בגיל, רק הכמות הנחוצה. בניסוי של Pearce *et al.* (1996) מיקרוזומים מכבד אדם הוקפאו ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) והופשרו חליפות עד 10 מחזורים. פעולות אלו לא גרמו לפרוק ה-P450 או לפגיעה בשורה ארוכה של פעילויות קטליטיות האופיינית לסוגי ציטוכרומים שונים. במחקר של Klopper-Sams and Benton (1994) בוצעה דנטורציה מכוונת של P450 על ידי אינקובציה של מיקרוזומים מכבד דגים לשש שעות בטמפרטורת החדר. פעילות EROD במיקרוזומים אלו ירדה באופן דרסטי אך תכולת P4501A כפי שהתבטאה ב-western blot, נותרה בעינה.

מגמת העלייה בתכולה הכללית של ציטוכרום P450 וציטוכרום  $b_5$  הייתה פונקציה ישירה של מינון ה- $\beta\text{NF}$  שהוזרקה לאמנונים (איור 3.6). את מגמת העלייה בתכולה הכללית של ציטוכרום P450 בניסוי זה, ניתן לייחס בעיקר לעלייה הדרמטית בתכולת ציטוכרום P4501A הספציפית. במבחן Spearman נמצא בין התכולה הספציפית והכללית מתאם חיובי מובהק ( $r^2 = 0.334$ ;  $P = 0.0095$ ). לעומת זאת, למגמת העלייה בתכולת ציטוכרום  $b_5$  אין הסבר ישיר ולא נמצא מתאם בינה לבין העלייה בתכולת ציטוכרום P450. התופעה של עלייה בתכולת ציטוכרום  $b_5$  בדגים שנחשפו לזיהום הובחנה במספר עבודות שטח ומעבדה נוספות (Bainey *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 1992).

במחקר של Gordeziani *et al.* (1999) שנעשה על מערכת המונואוקסיגנו בצמחים נמצא שבמקרה של פגיעה באקספטור הטרמינלי (קרי P450) הפעילויות של ציטוכרום  $b_5$  ושל NADPH cytochrome P450 reductase עולות. החוקרים משערים שבמקרים של זיהום קשה הגורם לפגיעה בציטוכרום P450 ישנו גיוס של ציטוכרום  $b_5$  אשר מעביר אלקטרונים למערכת המונואוקסיגנו מן המיטוכונדריה. אולם, חשוב להדגיש, שהחוקרים לא מצביעים על עלייה בתכולה אלא על עלייה בפעילות.

דגים הנחשפים לתערובות כימיקלים מורכבות קולטים את התרכובות בעיקר דרך המים ובתזונה (Woodworth *et al.*, 1998). בניסוי החשיפה של אמנונים ל- $\beta$ NF במים, במערכת הזרימה הרציפה, התקבלה עלייה בתכולה ופעילות ציטוכרום P4501A ביחס לדגי הביקורת וזאת על אף המדגם הקטן ומשך החשיפה הקצר יחסית (איור 3.8). עם זאת ייתכן וזמן חשיפה ארוך יותר היה דווקא פוגע בפעילות כפי שעולה מניסוי דומה שבו נחשפו דגי טרוטת עין הקשת לריכוז זהה (1 ppm) של  $\beta$ NF (Haasach *et al.*, 1993). בניסוי זה נמצא שפעילות EROD הייתה קרובה לזו של דגי הביקורת לאחר יום ויומיים חשיפה. לאחר 4 ו-8 ימים אובחן עיכוב של פעילות EROD וירידה מובהקת לעומת הביקורת. העלייה הגדולה ביותר בפעילות EROD בניסוי זה, הייתה בריכוז נמוך בהרבה, 0.05 ppm/liter. הפעילות עלתה על זו שנמצאה בדגים שקיבלו הזרקה i.p. של 100 mg/kg  $\beta$ NF. תוצאות הניסויים מעידות על הפוטנציאל הרב הקיים בחשיפת אמנונים במערכות זרימה רציפות לאבחון רמות כרוניות נמוכות של מזהמי מים. מערכת זרימה רציפה מדמה בצורה טובה יותר, מאשר הזרקה ישירה לגוף, את מסלול החשיפה למזהמים בסביבה המימית. יתר על כן, הדגים חשופים פחות לעקה כתוצאה מ-handling ולא אמורות להיות בעיות של אפליקציה לא אחידה. מאידך, החיסרון העיקרי של מערכות כאלו הוא בזבוז כמויות גדולות של מים ושל המזהמים הנבחנים, דבר שיש לו השלכות כלכליות וטוקסיקולוגיות. על כל פנים, הממצאים שנתקבלו בניסוי זה מלמדים שחשיפה למזהמים בדגימות מים גורמת לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A. על כן, יש הגיון בבדיקת מרכיבי ציטוכרום P450 במדגמי מים שהובאו מהירקון.

### 4.3.2 אינדוקציית ציטוכרום P4502E-like בדגים

המעורבות של P4502E-like במטבוליזם של תרכובות קסנוביוטיות בעלות פעילות רעילה וסרטנית משכה אותי לבדוק את הפוטנציאל של אינדוקציית ציטוכרום לניטור מזהמים אלה. מעט מאוד עבודות נעשו עד כה על האנזים P4502E-like בדגים ולא נבחנה בהן השפעה של זיהום סביבתי (Wall and Crivello, 1998). במחקר הנוכחי נעשתה בדיקת התכנות ראשונית של שימוש באנזים P4502E-like בדגים כסמן ביולוגי לזיהום הסביבה המימית.

בניסיון לקבל אינדוקציה של ציטוכרום P4502E-like באמנוני מכלוא, השתמשתי במשרנים ידועים של P4502E1 ביונקים. בבחינת תכולת האנזים P4502E-like, במיקרוזומים של אמנונים מניסויי החשיפה ל-ethanol ו-TCE, לא נמצאו הבדלים בין הטיפולים השונים למיקרוזומי הביקורת (איור 3.11, 3.10). במחקרם של Kaplan *et al.* (1991) נחשפו שלושה מינים מהסוג *Poeciliopsis* (ממשפחת הגמבוזיים, Poeciliidae) לזמנים שונים, למספר ריכוזים של ethanol במים. ממצאי מחקר זה מלמדים על אינדוקציה בכבד של P4502E-like mRNA לאחר 24 שעות. אולם, לאחר 48 שעות נצפה עיכוב וירידה בביטוי. העלאת ריכוז ה-ethanol במים גרמה לירידה משמעותית יותר של ה-mRNA לרמות נמוכות מקבוצת הביקורת. מסקנת החוקרים אם כן, הייתה ש-ethanol עשוי לגרום בדגים לאינדוקציה או לעיכוב של P4502E-like mRNA בהסתמך על הריכוז ומשך החשיפה. בעבודתי, לא נצפתה עלייה בתכולת האנזים P4502E-like באמנונים שנחשפו ל-ethanol בהזרקה לחלל הבטן (איור 3.10). יתר על כן, עוצמת התגובה האימינווכימית במיקרוזומים מדגים אלו היתה נמוכה פי 1.63, לעומת זו של דגי הביקורת (איורים 3.10, 3.11). כאמור, המנגנון המקובל המוצע לאינדוקציה של P4502E1 ביונקים באמצעות ethanol הוא ברמת השעתוק. הריכוזים ומשך החשיפה בניסויים שלי היו גבוהים מאלו של Kaplan *et al.* (1991), שבהם נמצא ש-ethanol מעכב בדגים את ביטוי של P4502E-like mRNA. לאור כל האמור לעיל, השערתי היא שאי הצלחתי להשרות את ביטוי של האנזים P4502E-like באמנונים עשויה להיות קשורה לעיכוב ברמת השעתוק.

P4502E1 הוא האנזים העיקרי האחראי למטבוליזם הראשוני של TCE, על אף שאנזימים אחרים עשויים להיות מעורבים (Miller and Guengerich, 1983; Nakajima *et al.*, 1990). על כל פנים, נוגדנים מונוקלונליים ל-P4502E1 עיכבו רק 60% מהמטבוליזם של TCE במיקרוזומי ביקורת (Nakajima *et al.*, 1993). בעבודתי, התגובה של מיקרוזומי הדגים שטופלו ב-TCE, לא נמצאה שונה בהשוואה לקבוצת הביקורת (איור 3.10). ממצא זה תואם את ממצאיהם של Hanioka *et al.* (1997) שבדקו את תכולת P4502E1 בחולדות שטופלו בהזרקות לחלל הבטן של מינונים שונים של TCE. לא נמצא הבדל בעוצמת התגובה האימינווכימית בין הטיפולים לבין קבוצת הביקורת.

במחקר הנ"ל נבדקה גם רמת האינדוקציה של מספר סוגי ציטוכרומים נוספים. מסקנת החוקרים הייתה ש-TCE גורם לאינדוקציה של אנזימי P450 הקונסטיטיביים, P4502B2, P4502E1, P4503A2, P4504A1 אך לא של האנזימים המושרים P4501A1 או P4502B1. P4504A1 היה האנזים היחיד שהגיב באופן מובהק, ביחס לביקורת, לטיפולים השונים ב-TCE מבחינה אימונוכימית והפעילות הקטליטית המיוחסת לו (LAOH). ממצאים דומים נמצאו במחקר אחר (Wang et al., 1996), שבו נחשפו חולדות באמצעות שאיפה בתא גזים, לארבעה ממסים אורגניים תעשייתיים שונים: TCE, benzene, toluene, ו-1,1,1-trichloroethane. בשימוש בנוגדן לציטוכרום P4502E1, נצפתה תגובה אימונית חזקה יותר במיקרוזומים מכבד חולדות שטופלו בשלושת החומרים הראשונים ביחס לקבוצת הביקורת. עם זאת, עוצמת הבנד של TCE היתה גבוהה ב-20% בלבד מזה של קבוצת הביקורת. במחקר זה נמצאה גם אינדוקציה נמוכה של P4502B1/2, P4502C11, P4502A1, P4504A1 על ידי שלושת תרכובות אלו אך לא של P4501A1, P4503A, ו-P4502C13. ממצאי תואמים את הממצאים מהספרות המלמדים ש-TCE אינו, ככל הנראה, בעל פוטנציאל השראה גבוה של P4502E.

תכולת P4502E-like בדגי עין חרוד נמצאה גבוהה באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) מזו שבדגי מדגה המעפיל (איור 3.9). נתון זה מצטרף לממצאים שהצביעו על חשיפה לתרכובות הידרוקרבוניות רעילות ושיירי קוטלי חרקים. המשמעות העיקרית של ממצא זה היא שניתן לקבל אינדוקציה של ציטוכרום זה באתרים מוזהמים. חלבון P4501A נקי לא הגיב כלל לנוגדן ל-P4502E1. באופן דומה, גם באמנונים שטופלו ב- $\beta$ NF לא נמצא ביטוי לציטוכרום זה. למרות האמור לעיל, לא ניתן לדעת לפסול לחלוטין את האפשרות שמשרני P4501A גרמו גם לאינדוקציה של ציטוכרום P4502E-like בדגי עין חרוד. במיני דגים שונים מאתרים נקיים יחסית או מוזהמים בנחל הירקון, לא נמצא ביטוי של P4502E-like. על כל פנים, עקב חוסר הצלחתי להשרות אינדוקציה של אנזים זה בתנאי מעבדה אין אפשרות להסיק מכך שהירקון נקי משאריות תרכובות רעילות הידועות כמשרות P4502E1 ביונקים. תוצאות הניסויים וממצאי דגי השטת אינם מובנים דיים ודרוש מחקר מעבדה נוסף הכולל כלים אבחוניים טובים יותר על מנת לקבל תמונה ברורה יותר לגבי אינדוקציה האנזים P4502E-like בדגים.

#### 4.4 ניטור ביולוגי של מזהם המים Trichloroethylene באמצעות פרופיל AChE

אופן תמותת דגי האמנון במערכת הזרימה הרציפה לאחר חשיפה של שלושה ימים ל-5 ppm TCE, היה בעל מאפיינים התנהגותיים המוכרים לנו מניסויים קודמים עם רעלי עצב כמו למשל, פרתיון. בחינת פרופיל AChE ברקמות המוח והזימים של הדגים העלתה שישנו עיכוב דרמטי בפעילות (67% ו-99%, בהתאמה). אמנונים שנחשפו לריכוז נמוך יותר (0.1 ppm) לאותו פרק זמן, הראו אף הם ירידה מובהקת ( $P < 0.01$ ) בפעילות ברקמות המוח, הזימים והכבד (איור 3.12). בספרות קיימות עדויות על כך שריכוזים גבוהים של TCE מעכבים *in vitro* פעילות AChE בממברנות טסיות דם מחולדה (Maekinen *et al.*, 1988). נוכח ממצאי הניסוי *in vivo* והספרות לעיל, הוחלט לבדוק *in vitro*, האם TCE הוא מעכב תחרותי של אנזים זה. ממצאי הניסוי הקינטי אינם מצביעים על עיכוב בפעילות AChE בהומוגנט מזימי אמנון בזמנים או בריכוזים השונים (איור 3.13). ככל הנראה, פגיעתו של ה-TCE בפעילות האנזים אינה על ידי קשירה ישירה לאתר הפעיל שלו אלא במנגנון אחר. AChE כזכור, הוא אנזים ממברנלי הקיים בסינפסות עצביות. TCE ידוע כבעל יכולת פגיעה בממברנות עצביות ובתכונות הפיסיקליות-כימיות שלהן (Juntunen, 1986). נשאלת אם כן השאלה, מדוע ישנה ירידה בפעילות האנזימטית *in vivo* אך לא *in vitro*. הסיבות האפשריות לכך הן רבות ומגוונות ורק מחקר מעמיק יוכל לתת אולי תשובות מדויקות יותר. כך למשל, ייתכן ו-TCE עובר בגוף ביוטרנספורמציה או דגרדציה המגבירה את רעילותו. הנוירוטוקסיות של TCE מיוחסות לתרכובת זו עצמה, לתוצר פירוקה dichloroacetylene, או למטבוליט שלה - trichloroethanol (Barret *et al.*, 1992). ידוע בספרות ש-TCE עובר מטבוליזם בעיקר על ידי ציטוכרומי P450 (Nakajima *et al.*, 1990). חשיפה לתוצרי המטבוליזם של TCE גרמה לגידולים סרטנים בכבד עכברים, מה שמעיד שיצירה של תוצר ביניים אפוקסידי גוטוקסי אינה אובליגטורית ל-TCE עצמו (Barton *et al.*, 1995). לאחר שפעול של החומר בידי מערכת P450, TCE עשוי לשנות את הפעילויות של אנזימי P450 המבצעים דטוקסיפיקציה (Pessayre *et al.*, 1979) ועל כן, עשוי לשנות את רעילותו שלו עצמו על ידי השפעתו על המטבוליזם (Wang *et al.*, 1996). יחד עם זאת, TCE עצמו לא נמצא כמעכב *in vivo* של ציטוכרום P4502E1 בחולדות (Lily *et al.*, 1998).

לסיכום, TCE היא תרכובת בעלת תכונות נוירוטוקסיות הנמצאת בריכוזים משמעותיים בסביבה המימית בארץ ובעולם המערבי. התופעה המתוארת בעבודה זו של רגישות פעילות AChE באמנונים לתרכובת זו מצריכה העמקה וניסיונות נוספים על מנת לקבוע מהו המנגנון הביוכימי לכך. להערכתך, יש לשימוש בפרופיל פעילות AChE ובאינדוקציה ציטוכרומי P450 פוטנציאל לזיהוי שאריות TCE בסביבה המימית.

## 4.5 ניטור שיירי תרכובות בעלות רעילות ביולוגית בנחל הירקון

### 4.5.1 ניטור מעלה הירקון

אתר העבודה העיקרי בחלקו העליון של הירקון היה מאגר חברת מקורות שליד ראש העין. מקורות המים של המאגר בתקופת המחקר היו עודפי קידוחי ראש העין ולחילופין מי המוביל הארצי (אבי אהרוני, חברת מקורות, מידע אישי). מאגר זה היה מאוכלס עד להתייבשותו המוחלטת בקיץ 2001 במגוון מיני דגים, חלקם טבעיים בירקון וחלקם מינים שעברו אינטרודוקציה מכוונת על ידי חברת מקורות. אתר זה היה נוח למחקר מבחינת שפיעות ומגוון הדגים, וחוסר נגישותו של הציבור למקום. הנחת העבודה הראשונית הייתה שאתר זה נקי יחסית מחדירת מזהמים ויוכל לשמש כאתר ייחוס לשאר חלקי הנחל. שיטות העבודה במאגר זה כללו דגימות מים, הצבת כלובים *in situ* ודייג. דייג התבצע גם באתרים נוספים לאורך מעלה הירקון.

כל הדגים, למעט אחד, שנחשפו למי מאגר ראש העין ( $n=26$ ) בניסויים השונים שרדו ולא ניכרו בהם פגיעה פיסיוולוגית או שינויים התנהגותיים. ממצא זה מלמד על איכות מים טובה בדרך כלל ועל העדרם במאגר זה של מזהמים בריכוזים בעלי רעילות אקוטית.

פעילות AChE ברקמות המוח והזימים, באמנוני הגליל שנתפסו במאגר ראש העין בספטמבר 1999 (איור 3.14) הייתה דומה לממצאים קודמים של מעבדתנו ממאגרי מים שפירים (מנליס, 2001). אך לעומת זאת, הפעילות במוח נמצאה נמוכה יותר באופן מובהק ( $P<0.01$ ) מדגי אמנון גליל מאתר שבע טחנות (יידון בהמשך). יתר על כן, בניסוי חשיפה של אמנוני מכלוא לדגימות מים שהובאו מהמאגר חודש אחר כך (איור 3.24) נמצאה ירידה מובהקת בפעילות רקמת הזימים ( $P<0.05$ ), וירידה משמעותית עוד יותר בפעילות במוח ( $P<0.01$ ). בניסוי דומה של חשיפה לדגימות מים שנערך בינואר 2000, לא נמצא עיכוב בפעילות האנזימטית באמנונים שנחשפו למי מאגר ראש העין (איור 3.25). דגי אמנון מכלוא שהושמו בכלובי רשת במאגר במהלך חודש אפריל 2000 היו בעלי פעילות AChE תקינה בזימים אך ניכר עיכוב בפעילות רקמת המוח. בחינת הממצאים לעיל ומיקומו של המאגר באזור חקלאי פעיל מובילה למסקנה שמאגר ראש העין חשוף לפרקים לשאריות של חומרי הדברה אורגנוזרחנים ו/או קרבמטים. ממצאים אלו תואמים לממצאי עבודה קודמת במעבדתנו (מנליס, 2001). זיהום המאגר יכול להיות ממקור דיפוזי, קרי נגר עילי משדות החקלאות הסמוכים ו/או זיהום ישיר על ידי נשורת ריסוס אווירי (מעבר מטוסי ריסוס מעל למאגר נצפה מספר פעמים על ידי כותב עבודה זו). ממצאים טובים יותר מאלו שנמצאו במאגר, נמצאו בתחנת מקורות בראש העין שבה נחשפו, במהלך יוני עד אוקטובר 2001, אמנוני מכלוא במערכת זרימה רציפה. דגים אלו נמצאו כבעלי פעילות AChE בזימים הגבוהה באופן מובהק ( $P<0.05$ ) מנתוני קו הבסיס (ראה סעיף 3.1.1).

באנליזה ביוכימית של כבדי קרפיונים מצויים שנלכדו (04/00) במעלה הירקון הממצאים היו טובים באופן יוצא מן הכלל ותכולות ציטוכרום P450 הכללי, ציטוכרום  $b_5$  וציטוכרום P4501A היו נמוכות באופן מובהק מאלו של קרפיוני ראש העין ומדגה המעפיל (איור 3.20). תוצאות אלו מצביעות על איכות טובה של מי מעלה הירקון מבחינת מציאות שאריות תרכובות הידרוקרבוניות. בהשוואה לקרפיוני מעלה הנחל, ניכרה עלייה משמעותית במרכיבי מערכת P450 בקרפיונים שנלכדו (08/00) במאגר ראש העין (איור 3.20). אמנוני גליל שנתפסו בראש העין (09/99) היו בעלי תכולת ציטוכרום P4501A בכבד הגבוהה פי 13 מדגים מאותו מין שנלכדו באותו מקום, שנה אחר כך (08/00). הבדל זה, יש להדגיש, לא נמצא מובהק סטטיסטית ( $P=0.26$ ) אך ניתן להניח, לדעתי בסבירות גבוהה, שגדלי מדגם גדולים יותר היו מניבים הבדל מובהק. חשיפת אמנוני מכלוא למדגמי מים (10/99) מראש העין, גרמה לעליה בפעילות EROD אך לא התבטאה בעלייה של תכולת האנזים. לאחר חשיפת אמנוני מכלוא בכלובים במאגר זה (04/00) נמצאה עלייה מובהקת, ביחס לדגי אתר הייחוס, בכל מרכיבי מערכת ציטוכרום P450 שנבדקו (איור 3.22). לסיכום, אינדוקציה ציטוכרומית P4501A שנמצאה בשלושה מיני דגים שונים, בשלוש תקופות חשיפה שונות, מעידה ככל הנראה, על זיהום לפרקים של מאגר ראש העין ברמות נמוכות של תרכובות הידרוקרבוניות רעילות.

זיהום מאגר ראש העין בתרכובות בעלות רעילות ביולוגית צריך להדליק נורה אדומה מאחר ומקור המים הנו בעיקר מי מעיינות ראש העין שהם הספק העיקרי (50-100%) של מי שתייה לגוש דן (לשם, 2001). יש לציין שבבדיקות כימיות של מדגמי מים מבריכת נופרים הסמוכה למאגר לא נמצאו שיירי מזהמים אנתרופוגניים אלא רק מספר קטן של חומרים טבעיים (רב אחא ועמיתיו, 2001). מאידך, החל מקיץ 1999 נמצאו חריגות בקטריאליות בקידוחים שנעשו באזור של סלע סדוק (קארסט) באזור המאגר (שטוף, 2001). דיגום של קרקעית הירקון בתלקו המערבי העלה שישנה העשרה ברורה של הקרקעית בפחמימנים, וואנדיום ועופרת, שמקורם בסחיפת דלקים ושמינים משטחים עירוניים (אבנימלך ועמיתיו, 1998). מקור הזיהום אפוא, אינו נהיר לנו, אך ייתכן בהחלט שהמאגר מזדהם מנגר עילי וחלחול של תרכובות משדות חקלאות וכבישים באזור. לאפשרות האחרונה עשויה להיות משמעות רבה לאור המאבק ציבורי שניטש לגבי תוואי כביש מספר 6 (חוצה ישראל) העובר בסמוך לקידוחי ראש העין.

## 4.5.2 ניטור קטעו התיכון של הירקון

המגבלה המשמעותית ביותר במהלך המחקר, מבחינת הניטור הביולוגי, הייתה שרידות נמוכה מאד של הדגים בחשיפה למי חלקיו העליונים של הקטע התיכון. חשיפה לדגימות מים התאפשרה רק לשעות ספורות כך שלא היה טעם בבחינת מערכת ציטוכרום P450 בדגים אלו. בקטע הנחל ממורד מפגש ירקון-קנה ועד אזור סכר עשר טחנות לא נמצאו בתקופת עבודה זו עדויות לקיומן של אוכלוסיות קבועות של אמנונים ואו קרפיונים. רק באזור אתר שבע טחנות נמצאו באופן תדיר דגים ממינים אלו. אי לכך דייג בקטע התיכון התבצע באתר שבע טחנות בלבד. עיקר הדגים התקבלו לאחר ריקון הבריכה שבמורד מפל שבע טחנות במסגרת עבודות ארכאולוגיות בספטמבר 2001.

מעלה הקטע התיכון של הנחל קולט שפכים וקולחים ברמת טיהור נמוכה יחסית דרך נחל קנה. חשיפת אמנונים לדגימת מי מורד מפגש ירקון-קנה (10/99) גרמה לתמותה של כל הדגים בפרק זמן של פחות מיממה. בדגים אלו הובחנה ירידה משמעותית של כ- 50% בפעילות AChE במוח (איור 3.24,  $P < 0.001$ ). ירידה זו אינה, ככל הנראה, גורם התמותה מאחר ועבור רוב הדגים רמת העיכוב של פעילות AChE במוח הנדרשת לשם גרימת מוות היא 70-85% (Fulton and Key, 2001). יתר על כן, ישנם מספר מיני דגים הסובלים גם רמות של 90% ירידה בפעילות במוח. כך למשל, דגי אמנון יאור שרדו ירידה של 90% בפעילות במוח לאחר חשיפה ל- 3 ppm malathion במשך 24 שעות (Pathiratne and George, 1998). מאידך, ידוע שעייכוב של AChE בדגים עשוי לגרום לנזק, בעיקר ברקמות הלב, המוח והשרירים. עייכוב AChE במוח ובשרירים עשוי להיות מסוכן עקב פגיעות בפעילות השחייה, והפרעה להתנהגויות תזונה ובריחה (Balint *et al.*, 1995).

באפריל 2001 נערך דגום משותף למספר מעבדות העוסקות בחקר זיהום הירקון. בדגום נלקחו דגימות מים חד פעמיות משותפות מאתרים שונים בנחל. חשיפה של אמנונים במשך 7 שעות לדגימות מים שנלקחו ממורד מפגש ירקון-קנה ותחנת מיתוג גרמה לעקה חריפה ולפרפורי גסיסה בקרב שתי קבוצות הדגים. בדגים שנחשפו למי מיתוג הובחנה ירידה מובהקת ( $P < 0.05$ ) בפעילות AChE במוח ובזימים. לעומת זאת, הפעילות האנזימטית בדגים שנחשפו למדגמים ממעלה וממורד מפגש ירקון-קנה, ומשבע טחנות הייתה תקינה. באנליזה הכימית של דגימות מים אלו שבוצעה על המעבדה לחקר איכות המים של משרד הבריאות (נתוני רשות נחל ירקון) נמצא החומר הזרחנאורגני propoxure בכל תחנות הדגום בקטע התיכון אך לא במעלה הנחל. התוצאות הן איכותיות, אך לפי הערכת מעבדה זו, הרמה הגבוהה ביותר נמצאה בתחנת מיתוג (נחל שילה) ובנחל קנה. בשבע טחנות ומורד מפגש ירקון-קנה הכמות של ה-propoxure הוערכה כנמוכה יותר. באנליזה כימית של דגימות מים אחרות נמצאו בירקון חומרי הדברה שלא היו בנחל קנה, מה שמלמד שהם מגיעים ממקורות אחרים (רב אחא ועמיתיו, 2001). אם כן, ישנה התאמה מסוימת בין התוצאות אך השיטה הביוכימית נמצאה פחות רגישה ולא אבחנה נוכחות של מעכבי AChE בכל תחנות הירקון התיכון. בהקשר זה חשוב מאד לציין שהשיטה הביוכימית מתייעלת ככל שהחשיפה של הדגים היא לכמויות גדולות יותר של מים ולטווח זמן ארוך יותר. חשיפה לדגימה חד פעמית, לפרקי זמן של כמה שעות עשויה לזהות רק רמות רעילות אקוטיות של מעכבי AChE. על כל פנים, גסיסתם של הדגים שנחשפו לדגימות מתחנות מעלה הקטע התיכון מלמדת על רעילותם הגבוהה של המים. העדר עייכוב בפעילות AChE בחלקם של הדגים ורמת עייכוב מתונה בלבד באחרים מצביעה על כך שהגורם המרכזי לרעילות אינו רעלי עצב.

אמנוני מכלוא ששהו בכלוב רשת במעלה שבע טחנות (אפריל 2000) סבלו מעקה חריפה שהתבטאה בתמותה של 85% מהם. בדגים ששרדו נמצאה ירידה מובהקת ביחס לדגי אותה אסופה (איור 3.21) בפעילות AChE ברקמת המוח ( $P < 0.01$ ) ובזימים ( $P < 0.001$ ). בספטמבר 2001 נדגמו מספר מיני דגים בבריכה שמתחת למפל אתר שבע טחנות. אמנוני גליל ואמנונים מצויים שנתפסו באתר היו בעלי



פעילות AChE נמוכה באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) ברקמות הזימים והכבד ביחס לדגים מאותם מינים מאתרי ייחוס (איורים 3.14, 3.15). ירידה מובהקת בפעילות האנוימטית ברקמת הכבד נמצאה במקום גם בדגי קיפון טובר (איור 3.29,  $P < 0.001$ ) וקרפיונים מצויים (איור 3.16,  $P < 0.05$ ). בכל המינים שנלכדו בשבע טחנות לא נמצאה ירידה בפעילות AChE ברקמת המוח ביחס לדגים שנתפסו באתר ראש העין (טבלה 3.4). יתר על כן, באמנוני גליל נמצאה פעילות במוח הגבוהה באופן מובהק מהפעילות בדגי מין זה מראש העין (איור 3.14).

אורגניזמים אקוטיים מציגים טווח רחב של תגובת עיכוב לאורגנוזרחנים וקרבמטים, כתלות בתרכובת, מין, תנאי המים ומשך החשיפה (Coppage and Mathews, 1974). הרעילות האקוטית-ספציפית למין של קוטלי חרקים אורגנוזרחניים בין מיני דגים עולה, לעיתים קרובות, בסדר גודל אחד או אף שניים (Vittozzi and De Angelis, 1991). הממצאים משבע טחנות מצביעים על דמיון בתגובת מיני הדגים למעכבי AChE ברקמות השונות עם הבדלים ברמת הרגישות (טבלה 3.4). מבין המינים שנבחנו רמת העיכוב בקרפיון מצוי נמצאה הכי פחות רגישה. קרפיון מצוי נמצא במעבדתנו כבעל עמידות גבוהה יותר לחשיפה לאורגנוזרחני parathion ולקרבמט methomyl מאשר אמנון מכלוא (Yawetz *et al.*, 1993b). במחקר אחר, נמצא שקרפיון מצוי היה העמיד מבין ארבעה מיני דגי מים מתוקים להרעלת diazinon, על אף ש-*in vitro* האנוים ממוח מין זה נמצא הרגיש ביותר (Keizer *et al.*, 1995). הרגישות השונה של הדגים הוסברה במחקר זה כקשורה לשיווי המשקל המטבולי בכבד והתכונות של אנוים המטרה. השערת החוקרים הייתה שעמידותו של הקרפיון נובעת מקצב נמוך מאד של ביואקטיבציה ופעילות גבוהה יחסית של אנוימי דטוקסיפיקציה. מבין המינים משבע טחנות נמצא קיפון טובר כבעל רמת הרגישות הגבוהה לעיכוב AChE ברקמת הכבד. בניסויי *in vitro* שנערכו במעבדתנו נמצאה גם ברקמת הזימים של מין זה רגישות גבוהה מאד ביחס למיני דגים אחרים שנבדקו (וולודשיק א., מידע אישי).

אחד ההסברים האפשריים להבדלים בפעילות AChE ברקמות ורגישותן לעיכוב קשור גם לסוגים המולקולריים המרכיבים את האנוים. בעבודתם של Ferenczy *et al.* (1997) נמצאו הבדלים בין חמישה מינים של דגי מים מתוקים, ברמת פעילות AChE ובסוגים המולקולריים שהרכיבו את האנוים ברקמות המוח, הלב, הכבד ושרירי השלד. מסקנת החוקרים הייתה שהבדלים אלו עשויים להיות קשורים להבדלים התנהגותיים (אופן התזונה והשחייה) ורמת ההתפתחות של מערכת העצבים. בעבודה אחרת, נמצא שחשיפה של קרפיון מצוי לרעל אורגנוזרחני, methidathion, גרמה לשינוי בהרכב הצורות המולקולריות של AChE בכבד אך לא ברקמות אחרות (Balint *et al.*, 1995). השינוי התבטא בעלייה גבוהה של המונומר הגלובולרי הבסיסי ( $G_1$ ) ובירידה של צורות מורכבות יותר. ידוע שהרגרציה של האנוים מתבססת בעיקרה על סינתזה *de novo*, וכאשר ישנו עיכוב בפעילות, שיעור גדול של אנוים מיוצר (Sancho *et al.*, 2000). על כל פנים, לא ידוע האם מציאת

עלייה בצורה המונומרית ברקמה מסוימת נובעת מפרוק צורות מורכבות יותר ואו עיכוב סינתזה *de novo* של האנזים AChE (Nemcsok *et al.*, 1990).

רקמת הכבד נמצאה בדגי שבע טחנות כרגישה ביותר ובכל מיני הדגים נמצא עיכוב בפעילות AChE. ממצאים אלו תואמים ממצאי עבודות אחרות שבחנו את רמת עיכוב האנזים ברקמות שונות בדגים (Sarbadhikary and Sur, 1992; Straus and Chambers, 1995). בעבודה פרמקוקינטית שנעשתה בטרוטת עין הקשת נחשפו הדגים ל- paraoxon, המטבוליט הפעיל של האורגנוזרחני parathion. בבחינת ריכוזי הרעל ורמת עיכוב AChE ברקמות השונות נמצא שעיקר הרעל התרכז ברקמת הכבד ועיכוב הפעילות היה גבוה ומהיר ביותר. (Abbas and Hayton, 1997). בעבודה דומה, שנעשתה במעבדתנו (פרלמוטר נ., מידע אישי), נחשפו דגי אמנון מכלוא לאורגנוזרחנים וקרבמטים מסומנים. התברר שרקמת הכבד קולטת את מירב הרעל בעוד שכמות הרעל שהגיעה לרקמת הזימים והמוח הייתה נמוכה יותר (בערך פי 4-5) ודומה בין שתי הרקמות. ממצאים אלו תואמים את ממצאי עבודתם של Balint *et al.* (1995) שבה נמצא שהצטברות רעל אורגנוזרחני ברקמות קרפיון מצוי הייתה הגבוהה ביותר ברקמות שומניות, בעיקר בכבד, ונמוכה יותר ברקמות שריר. רמת ההצטברות הייתה מהגבוהה לנמוכה - כבד < מוח, מעי, כליה < שרירים, לב. עבודה נוספת בדגים מצאה הצטברות של אורגנוזרחנים בעיקר ברקמת הכבד לעומת איברים אחרים (Habig *et al.*, 1986). חוקרים אלו דיווחו שזמן מחצית החיים של אורגנוזרחנים משתנה בין רקמות שונות: האלימינציה המהירה ביותר הייתה בשרירים והנמוכה ביותר, בכבד. ממצאי העבודה הנוכחית והעבודות המצוטטות לעיל, מצביעים על ההגיון שבשימוש בפעילות AChE ברקמת הכבד בדגים לצורך ניטור ביולוגי של שיירי קוטלי חרקים בסביבה.

בעוד שברקמות הזימים והכבד של דגי שבע טחנות נסתמן עיכוב בפעילות AChE, ברקמת המוח לא הובחן עיכוב בדגים השונים. רקמות הדגים השונות נבדלות ברגישותן לעיכוב AChE באמצעות תרכובות שונות. כך למשל, בחשיפת דגי אמנון יאור ל- methyl parathion נמצא שרגישות הרקמות לרעל אורגנוזרחני זה הייתה לפי הסדר הבא: זימים < כבד < מוח (Sarbadhikary and Sur, 1992). ממצאים דומים הראו שחשיפת דגי שפמנון (*Ictalurus punctatus*) לרעלים אורגנוזרחנים גרמה לעיכוב משמעותי יותר של פעילות AChE ברקמות הכבד והזימים לעומת רקמות המוח והשרירים (Straus and Chambers, 1995). החוקרים מסבירים את ההבדלים ברמת הפעילות הבסיסית הנמוכה יותר של רקמות הכבד והזימים, הנובעת ממספר קטן יותר של מולקולות האנזים / או אפיניות נמוכה יותר של האנזימים ברקמות אלו. בעבודתו של מנליס (2001) נמצאו באמוניים הבדלים באפיניות של אורגנוזרחנים וקרבמטים לאנזים AChE מרקמות המוח והזימים. בעוד שרגישותם של הזימים לעיכוב באמצעות אורגנוזרחנים הייתה גבוהה יותר מאשר רגישות המוח, עבור קרבמטים נצפתה תופעה הפוכה. תופעה זו של אפיניות גבוהה יותר ל- AChE שברקמת המוח הנה לא צפויה לאור מחסום דם-מוח הניצב בפני חומר המבקש לחזור למוח. ממצאים תואמים נמצאו בעבודה שנעשתה על קרפיון מצוי, שם נמצא שקוטלי חרקים קרבמטים הם מעכבים חזקים

יותר של AChE במוח מאשר אורגנוזרחנים (Dembélé *et al.*, 2000). בעבודה אחרת, חשיפה של דגי *Clarias batrachus* לקרבנט (carbaryl) גרמה לעיכוב משמעותי יותר של פעילות AChE ברקמת המוח והזימים לעומת רקמת הכבד (Sharma *et al.*, 1993). עיון בטבלה 3.4 מראה שחשיפת דגים למי חלקיו העליונים של הנחל, ממאגר ראש העין ועד מתחת למפגש ירקון-קנה כולל מי מטייח כפר סבא-הוד השרון גרמו לפגיעה סלקטיבית בפעילות AChE ברקמת המוח. על פי הטבלה, החל מתחנת מיתוג ומערבה המגמה מתהפכת והפגיעה בפעילות AChE ברקמת הזימים משמעותית יותר. ממצאים אלו בולטים במיוחד באמנוני הגליל. אנליזה כימית של מי שבע טחנות מחזקת ממצאים אלו כאשר בדגימות שנלקחו בתקופה מקבילה נמצאו באופן קבוע קוטלי רעלים אורגנוזרחנים כגון, diazinon, propoxur (רב אחא ועמיתיו, 2001). באנליזה כימית של מדגמי מים ב-10/99, נמצאו 15 ppb diazinon בשבע טחנות אך לא באתרים אחרים בנחל (רב אחא ועמיתיו, 2001). אם כן, באזור המזרחי של הנחל הפגיעה העצבית היא סלקטיבית בעיקר לרקמת המוח, דבר האופייני לקוטלי חרקים קרבנטים. החלק המערבי יותר של הנחל, לרבות מי מטייח רמת השרון מתאפיינים בפגיעה בזימים ובכבד האופיינית יותר לרעלים אורגנוזרחנים.

חשיפה של דגי אמנון מכלוא לדגימות מים משבע טחנות גרמה לעלייה מובהקת בתכולת ציטוכרום P450 אך לא בתכולת ציטוכרום P4501A. למעשה, בכל המינים שנחשפו באתר שבע טחנות נמצאה עלייה מובהקת בתכולת ציטוכרום P450 הכללי. זהו ממצא מעניין, מאחר ובניסויי החשיפה ל- $\beta$ NF שערכתי לא נמצאה עלייה מובהקת בתכולה הכללית של P450 אלא רק בתכולה הספציפית של P4501A. ממצאים דומים נמצאו בעבודות נוספות שבהן טופלו דגים ב- $\beta$ NF (Klopper-Sams *et al.*, 1998; Yawetz *et al.*, 1989). תוצאות אלו עשויות להצביע על אינדוקציה של ציטוכרומים נוספים. אתר שבע טחנות מזוהם בחומרי רפואה בעלי פעילות ביולוגית חזקה (רב אחא ועמיתיו, 2001). הציטוכרום המבצע את עיקר המטבוליזם לחומרים פרמצבטיים ביונקים הוא P4503A4 (Guengerich, 1999). האם חומרים אלו גורמים לאינדוקציה של ציטוכרומים הומולוגים בדגים, זוהי שאלה שצריכה עוד להיבחן.

עלייה משמעותית ( $P < 0.001$ ) של אינדוקציה ציטוכרום P4501A נמצאה בכבד של קרפיונים מצויים וקיפוני טובר שנלכדו בשבע טחנות (איורים 3.20, 3.30). אמנוני גליל היו בעלי תכולת ציטוכרום P4501A גבוהה פי 42 ( $P < 0.05$ ) מדגים ממין זה מראש העין (08/00). ממצאים אלו מצביעים על חשיפה כרונית באתר זה לשיירי תרכובות הידרוקרבוניות רעילות. פעילות EROD בדגי שבע טחנות נמצאה נמוכה יחסית ביחס לעלייה המצופה כתוצאה מהעלייה הדרסטית בתכולת P4501A באותם דגים. במיוחד בולטת העובדה שבקיפוני שבע טחנות פעילות EROD הייתה שווה לאפס (איור 3.30), וזאת בהשוואה לקיפונים שנלכדו בשפך שבהם הובחנה פעילות אנזימטית גבוהה (יידון בהמשך). בהשוואת תכולת החלבון P4501A כנגד פעילות EROD בקיפונים השונים שנידוגו בקטע הירקון המלוח לא נמצא מתאם ( $r^2 = 0$ ). כזכור, בדגים שטופלו במעבדה, במשך ל-P4501A היה מתאם

חיובי מובהק בין התכולה והפעילות. העדר מתאם חיובי בין התכולה והפעילות של P4501A הובחן בעבודה קודמת במעבדתנו על קיפונים (זילברמן, 1995) ובעבודות נוספות על מיני דגים שונים (Gooch *et al.*, 1989; Monosson and Stegeman, 1994).

השימוש בפעילויות הקטליטיות של ציטוכרום P4501A בתוכניות ניטור ביולוגי עשוי להיות בעייתי עקב השונות הטבעית של פעילות האנזים ומגוון הגורמים הביזויים והאביוטיים המשפיעים עליהן (Kloepper-Sams and Benton, 1994). מרכיבי תזונה רבים או תרכובות קסנוביוטיות עשויים להיקשר ישירות לאתר הפעיל של אנזימי P450 ולשמש כסובסטרטים או כמעכבים תחרותיים (Goksøyr and Husøy, 1998). כך לדוגמא, ריכוזים גבוהים של תרכובות הידרוקרבוניות, כמו למשל PCBs פלנריים, עשויים לגרום לעיכוב הפעילות הקטליטית של P4501A במיקרוזומים מכבד דגים (Gooch *et al.*, 1989; Hahn *et al.*, 1993; Schlezinger and Stegeman, 2001). מתכות כבדות ידועות גם הן כמעכבות של פעילות אנזימי P450 (Goksøyr and Husøy, 1998). מזהמי סביבה נוספים נמצאו כבעלי יכולת עיכוב של פעילות EROD בדגים, כמו למשל: חומרי הדברה פונגיצידים (Fent *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 1999), אסטרוגנים (Navas and Senger, 2000) קסנואסטרוגנים (Intharapanith *et al.*, 1996) וצבעי anti fouling (Morcillo and Porte, 1997).

האינדוקציה של P450 בדגים מושפעת מגורמים ביוטיים ואביוטיים נוספים כגון: טמפרטורה (Kleinow *et al.*, 1987), תזונה (Wall and Crivello, 1999), גיל (Kleinow *et al.*, 1987), עקת חמצן (Barouki and Morel, 2001) והשפעות הורמונליות (Buhler *et al.*, 1994; Sole *et al.*, 2000). כך למשל, בדגים שלאחר הבגרות המינית ובעיקר בעונת הרבייה, ניתן בדרך כלל למצוא בזכרים רמות גבוהות יותר של תכולת P450 ושל הפעילויות האנזימטיות הקשורות, בהשוואה לנקבות (Arukwe and Goksøyr, 1997; Sleiderink *et al.*, 1995; Snowberger *et al.*, 1991).

מבין הגורמים העשויים לגרום לעיכוב בפעילות ציטוכרום P4501A, כפי שנצפה בעבודה זו בדגי שבע טחנות, נראית לי האפשרות של עיכוב על ידי תרכובות קסנוביוטיות כסבירה ביותר. בחלק זה של הנחל ישנן עדויות על זיהום כרוני במגוון תרכובות רעילות. גפני ועמיתיו (1997) מצאו שאריות PAHs ברקמות הכבד והמרה של אמנון מצוי וקרפיון מצוי שנלכדו בחלק התיכון של הנחל. בעבודת חוקרים אלו נמצאו פגיעות גנטוקסיות, תאיות ופתולוגיות שונות באותם מינים משבע טחנות. פגיעות אלו מעידות על חשיפה ניכרת למזהמים גנטוקסיים וקלסטגנים מסוכנים כמו PAHs וקרוב לוודאי גם ל-PCBs. באנליזה כימית של דוגמאות מים ובוצה משבע טחנות נמצאו תרכובות PAHs (בעיקר בסדימנט), תרכובות ביפנליות, וחומרי רפואה בעלי פעילות ביולוגית חזקה (רב-אחא ועמיתיו, 2001). חומרים פוליציקליים ארומטיים ותרכובות ביפנליות ידועים כחומרים בעלי פעילות רעילה וסרטנית ורבים מהם עוברים מטבוליזם על ידי P4501A (Nebert and Gonzalez, 1987). כך למשל, חשיפה של דגי שפמנון (*Ictalurus punctatus*) למזהמים סביבתיים כגון, PAHs, PCBs, וחומרי הדברה

כלוריינים גרמה לעלייה במרכיבי מערכת ציטוכרום P450 שהובילה להגברת השפעול המטבולי של פרומוטגנים למוטגנים (Winston *et al.*, 1988). PAHs הם מרכיבי תרכובות דלקים והם כנראה מגיעים לירקון מתחנות דלק, מוסכים וכבישים הסמוכים לנחל אך גם דרך מכוני טיהור השפכים (רב-אחא ועמיתיו, 2001). PCBs הם כימיקלים תעשייתיים המהווים מזהמים סביבתיים עיקריים אשר שיירים שלהם נפוצים ברקמות דגים, ציפורים ואף באדם (Yawetz *et al.*, 1998). מתכות כבדות לא נתגלו על פי רוב ברמות גבוהות באנליזות כימיות של מי הירקון. הרמות שכן נמצאו היו נמוכות בדרך כלל מהריכוז המותר להזרמה לנחלים (נתוני רשות נחל ירקון, 2000). לעומת זאת, בדיגומי בוצה באזור מעלה שבע טחנות נמצאו, באופן עקבי יחסית, המתכות הכבדות קדמיום (Cd), אבץ (Zn) ונחושת (Cu) (אבנימלך ועמיתיו, 1998). מחקר זה הראה שהמתכות מגיעות לנחל בעיקר בעונת הגשמים ומצטברות בקרקעית. רקמת הכבד היא אתר ביואקומולוציה מועדף למתכות כבדות כפי שנמצא בקיפון גדול ראש (*Mugil cephalus*) ובמיני דגים אחרים (Sultana and Rao, 1998). קדמיום, נחושת, אבץ ומתכות כבדות נוספות ידועות כמעכבות של פעילות ציטוכרום P450A בדגים (Bruschweiler *et al.*, 1996; Ghosh *et al.*, 2001; Risso *et al.*, 2000). יתר על כן, קדמיום ונחושת נמצאו מעכבות EROD בריכוזים נמוכים, ופעולת העיכוב אף גברה כתוצאה מתגובה סינרגיסטית עם 3-MC, שהוא משרן ל-P450A (Bruschweiler *et al.*, 1996).

### 4.5.3 ניטור הירקון המלוח

הבעיה המרכזית בניטור הקטע המלוח של הירקון הייתה למצוא את מין הדג האופטימלי לשם כך. ניסיונות פרלימינאריים לאקלם אמנוני מכלוא למי מלח, בתנאי המעבדה שעומדים לרשותנו, לא עלו יפה. לפיכך הוחלט לבצע את תוכנית הניטור באמצעות קיפונים. ניסוי חשיפת קיפונים בכלובים בשלושה אתרים שונים לאורך הקטע המלוח הסתיים למעשה במוותם של 86% מהדגים. בשלושה מתוך ארבעה כלובים מתו כל הדגים בתוך יומיים. שני כלובים הונחו על קרקעית הנחל במורד שבע טחנות ובמפגש איילון-ירקון. הדגים ששהו בהם סבלו, ככל הנראה, מחוסר חמצן. ריכוזי החמצן המומס במים יורדים עם המרחק מהשפך ועם עומק המים ולעיתים חלקים בנחל הנם אנוקסיים (< 2mg/liter) (קרט ועמיתיה, 2001). התמותה של הדגים בכלוב שצף בגובה פני המים בגשר רוקח, עשויה להיות קשורה לתוצרי דלק שצפו על פני המים. חומרים שומניים אלו עשויים לחדור לזימי הדגים ולגרום להפרעות קשות בנשימה. כשבוע לפני הנחת הכלובים זרמו לנחל יותר משתי טונות של מזוט עקב תקלה בתחנת הכוח רידינג. הדליפה יצרה מספר מוקדי זיהום בגדות הירקון. יחד עם זאת, באפיון כימי של דוגמאות, 18 יום לאחר הדליפה, נמצא כי רק חלקן הקטן מקורו במזוט ואחרות מקורן בתרכובות דלק בעלות מאפיינים כימיים שונים מהמזוט. דרגות הדגרדציה של המזוט מהדליפה היו גבוהות מאד (פיינשטיין ועמיתיו, 2000). קבוצת הדגים היחידה ששרדה חלקית את הניסוי שהתה בכלוב שמוקם במרכז עמודת המים, בגשר רוקח. ככל הנראה, דגים אלו סבלו פחות מקבוצות הדגים האחרות, מעקת חמצן ואו מחשיפה ישירה לחומרים שומניים.

הממצאים של אנליזת מרכיבי מערכת P450 בארבעת הדגים ששרדו את ניסוי החשיפה בכלובים לא היו שונים מאלו של קבוצת הייחוס (דגים מאותה אסופה שנקטלו ביום התחלת הניסוי). יחד עם זאת, היחס בין תכולת P4501A הספציפית לתכולה הכללית היה גבוה באופן מובהק ( $P < 0.05$ ) בדגים אלו (איור 3.33). PAHs ו-PCBs הם קבוצות של חומרים הידרופוביים, בעלי מסיסות נמוכה במים אשר נוטים לשקוע ולהצטבר בסדימנט (Ueng and Ueng, 1995). כך למשל, ישנה הערכה שכ-97% מה-PCBs המשתחררים למים שוקעים בסדימנט (DiPinto *et al.*, 1993). בניסוי חשיפה במעבדה של אמנונים ל-PCBs בסדימנט או במים נמצא שהחשיפה באמצעות הסדימנט הייתה דומיננטית הרבה יותר מבחינת הצטברות החומר ברקמות הגוף. אמנונים שנחשפו ל-PCBs במים לא צברו חומרים אלו ברקמותיהם יותר מאשר דגי הביקורת (Zhou and Wong, 2000). יש לציין, שהמרכיבים העיקריים בתזונה הטבעית של קיפון טובר הם חומרים אורגניים ורקב שהם מוצאים בקרקעית (Shapiro, 1998). השערתי היא שהאינדוקציה הנמוכה יחסית שנמצאה בניסוי עשויה לנבוע, בין השאר, מהעדר אינטראקציה של הדגים עם הסדימנט.

אנליזת מערכת P450 בקיפונים שנידוגו בירקון המלוח מראה על אינדוקציה משמעותית של ציטוכרום P4501A בכבד. הן התכולה והן הפעילות של המופרוטאין, בדגים שנידוגו בשפך הנחל, גבוהות באופן מובהק ( $P < 0.001$ ) ממקבילותיהן בדגי אתר הייחוס (איור 3.30). לעומת זאת, לא נמצאה כלל פעילות EROD בקיפונים שנלכדו בשבע טחנות (ראה דיון בהמשך). אינדוקציה P4501A היא כאמור, סמן ביולוגי מקובל המצביע על חשיפת דגים אלו לתרכובות הידרוקרבוניות. עם זאת, לאור העובדה שהירקון המלוח פתוח לים וקיפונים הם דגים פלגיים בעלי כושר ניידות טוב יחסית, מתעוררת השאלה היכן נחשפו הקיפונים לזיהום. במילים אחרות, ניתן לשאול האם הממצאים שתוארו לעיל מתארים זיהום של הירקון המלוח גופו או אזור גיאוגרפי נרחב יותר.

כדי לענות לשאלה זו צריך להכיר את מחזור החיים של קיפון טובר וקיפון גדול ראש, שני המינים האופייניים לירקון המלוח (גורן, 1995). בטבע מטילים הקיפונים בים הפתוח. הדגיגים הבוקעים מן הביצים נודדים למקווי מים מתוקים יחסית כגון, שפכי נהרות ולגונות. באתרים של מים מתוקים או אוליגוהליניים מבלה מינים אלו את רוב מחזור חייהם ותוזרים לים רק לאחר שבגרו והבשילו לרבייה (catadromous species) (McDowall, 1988). הסיכוי שדגים בוגרים יחזרו למקווי המים המתוקים, לאחר שבגרו ויצאו אל הים, אינו גבוה. בעבודתו של Cardona (2000), נמצא שדגי קיפון גדול ראש בוגרים נמנעים ממים מתוקים ומעדיפים סביבה פוליהלינית. בדיגוס של יותר מ-1000 דגי קיפון טובר בלגונה בחופי פורטוגל, כמעט ולא נמצאו פרטים בוגרים מינית. הפרטים הבוגרים המעטים שנמצאו היו מעל 29 ס"מ (TL), אך אף אחד מביניהם לא היה בעל גונדות מפותחות (Moura and Gordo, 2000). הקיפונים שנידוגו בירקון ושימשו לעבודה הנוכחית, היו כולם ללא גונדות מפותחות ורק פרט אחד היה ארוך מ-29 ס"מ. דגי שפך הירקון ( $N=20$ ) ושבע טחנות ( $N=24$ ) היו באורך ממוצע (TL) של 24.5 ו-13.9 ס"מ, בהתאמה. דגי קיפון טובר בוגרים באזורנו מגיעים לאורכים גדולים יותר (גולני, 1997). כך לדוגמא, בכינרת הם מגיעים עד לאורך של 50 ס"מ

(Shapiro, 1998). אם כן, הערכתי היא שהקיפונים ששימשו לעבודה זו הם דגים צעירים יחסית שטרם יצאו לים. המסקנה המתבקשת מכך היא שדגים אלו נחשפו למזהמים בנחל הירקון עצמו ולא בים הפתוח.

בין הקיפונים שנדגמו בשבע טחנות לאלו שנלכדו, בשתי הזדמנויות אחרות, בשפך הירקון נמצא הבדל מהותי בפעילות EROD. בקבוצה הראשונה לא נמצאה למעשה שום פעילות ובשתיים האחרונות פעילות גבוהה באופן מובהק מדגי אתר הייחוס ( $P < 0.001$ ). גם במיני דגים אחרים שנלכדו בשבע טחנות הייתה פעילות EROD הנמוכה מן הצפוי לאור העלייה החדה בתכולת החלבון P4501A, באותם דגים. בעבודתה של זילברמן (1995), נמצאו ממצאים דומים מאד למתואר לעיל, לרבות עיכוב מוחלט של פעילות EROD בקיפונים שנלכדו באתר שבע טחנות. לאור כל זאת, נשאלת השאלה מהו טווח בית הגידול של הקיפונים. במחקר של Almeida (1996), שנערך על תנועתיות בדג קיפון טובר בשפך נהר בפורטוגל, נמצא שהתנועתיות של מין זה במהלך היממה היא רבה והוא גומע מרחקים גדולים (בממוצע 6.5 ק"מ) על פי כיווני הזרימה של הגאות והשפל. יחד עם זאת, באותו מחקר נמצא שהדגים הראו נטייה ברורה (88%) לאזור מעלה השפך ונמשכו למוצא שפכי ביוב ביתי. לאחרונה, בעבודה שנעשתה על קיפון חרוץ (*Liza saliens*) בכמה אתרים במפרץ איזמיר שבים האגאי נמצאה במיקרוזומים מכבד הדגים פעילות EROD מובהקת בהשוואה לאתר הייחוס. פעילות זו הלכה וירדה ביחס הפוך למרחק של נקודת הלכידה ממוקד הזיהום העיקרי של המפרץ וזאת על אף שהמרחקים בין נקודות הדיגום היו קילומטרים ספורים (Ariac and Sen, 1999). ההתאמה בין הממצאים הביוכימיים בקיפונים לאתר דיגום מלמדת לכאורה על הזיקה הגבוהה בניהם, לפחות בטווח הזמן הקצר. עם זאת עבודות בדגים מצביעות על אינדוקציה ארוכת טווח של פעילות P4501A (Klopper- Aroclor 1254 (תערובת PCBs) לדגי קיפון טובר גרמה לביטוי האנזים גם 60 יום לאחר הטיפול (זילברמן, 1995). אם כן, לאור כושר הניידות של הקיפונים וההשפעה ארוכת הטווח של מזהמים על אינדוקציה ההמופרוטאין, לא ניתן לדעתי, לשייך באופן וודאי תגובה ביוכימית זו לאזור מצומצם בנחל.

מסקנה זו מציבה קשיים בניסיון להעריך את השפעת מקורות הזיהום השונים של הירקון המלוח בתרכובות הידרוקרבוניות. בעוד שהתמונה לגבי תרומתו של הקטע התיכון לזיהום הירקון המלוח הולכת ומתבהרת, הרי שתרומתם של נחל איילון ותחנת הכוח רידינג לזיהום אינה ידועה. ניטור השפעת תחנת הכוח הופיע כיעד מרכזי בתוכנית המחקר של עבודתי, אך שיתוף פעולה חלקי מצד אנשי התחנה מחד וקשיים טכניים מאידך מנעו את ביצוע התוכנית. דליפת המזוט מהתחנה שארעה במאי 2000 אינה, כנראה, אירוע חד פעמי. בתצפיות באזור שפך הירקון נראה באופן קבוע כתם שמן רחב בנקודת מוצא מי הקירור של התחנה. יחד עם זאת מידע על אנליזה כימית של מים אלו אינו ברשותי.

#### 4.5.4 ניטור איכות קולחי המוצא של מכוני טיהור השפכים המוזרמים לירקון

הגישה הקונבנציונלית להערכת ההשפעות של שפכים מטוהרים על הסביבה כוללת סט של פרמטרים פיסיוכימיים ואקוטוקסיקולוגים כלליים, הבאים להבטיח שלא תהנה חריגות מהתקנים המותרים להזרמה (Isnard, 1998). אחת המטרות של המחקר הנוכחי, הייתה להעריך את תרומתם של מכוני טיהור השפכים (מטי"ש) לזיהום הירקון בתרכובות בעלות רעילות ביולוגית. הירקון מקבל קולחים ברמות שונות משני מקורות קבועים עיקריים: מכון כפר סבא-הוד השרון ומכון רמת השרון. לאחרונה, מוזרמים קולחים גם ממטי"ש ניר אליהו. מטי"ש כפר סבא-הוד השרון החל לפעול ביוני 1996. המכון מזרים לירקון קולחים ברמה שניונית בספיקה ממוצעת של כ- 22,000 מ"ק ליממה. איכות המים אינה עומדת באיכויות המים הנדרשות כפי שנקבעו בטיוטת תקנות המים התשי"ס 2000 של האגף למים ונחלים במשרד לאיכות הסביבה (רשות נחל ירקון, 2001). כך למשל, ממוצע ריכוזי האמוניה הכללית שנמדדו ביציאה ממכון הטיהור בין דצמבר 1997 למרץ 2000 היה 42 mg/l (אלרון, 2000), כאשר התקן המקסימלי המותר הוא 3 mg/L (Bar-Or, 2000). מטי"ש רמת השרון מזרים קולחין לנחל הירקון ברמת טיהור שלישונית ובספיקה ממוצעת של כ- 7500 מ"ק ליממה. מפעל זה שהחל לפעול ביוני 1999 הנו מהחדשים בארץ והשפכים עוברים טיפול מתקדם שכולל קואגולציה, סינון וחיטוי בכלור. איכות הקולחים השלישוניים המוזרמת לנחל עומדת בדרך כלל בתקן ההזרמה לנחלים למעט חריגה בערכי המקסימום של מדדי זרחות וחנקות ומספר חיידקי קולי צואתי (רשות נחל ירקון, 2001).

אמוני מכלוא שנחשפו לדגימות מים שהובאו (01/00) ממטי"ש כפר סבא-הוד השרון מתו בתוך פרק זמן של שעה בלבד. הרעילות הגבוהה של המים לדגים היא ככל הנראה כתוצאה מרמות אמוניה גבוהות, אך ייתכנו גורמי הרעלה נוספים. אמוניה כללית היא התרכובת השכיחה ביותר המתלווה לזיהום אורגני (Hellowell, 1986). יש לציין, שהפרקציה הלא מיוננת של האמוניה ( $\text{NH}_3$ ) היא המרכיב הרעיל העיקרי במי קולחין ביתיים (EIFAC, 1973). רמת האמוניה הלא מיוננת בדגימת המים שגרמה למות הדגים הייתה 1.62 mg/l. רמה כזו היא גבוהה מהערך האקוטי הידוע מהספרות למיני דגים מסוימים (אלרון, 2000). כך למשל, הערך האקוטי שנקבע עבור דגיני קרפיון מצוי הוא 0.95 mg  $\text{NH}_3$ /l (Hasan and Macintosh, 1986). הערך האקוטי של אמוניה לא מיוננת עבור אמנון מכלוא לא נמצא בספרות. ערך זה ידוע עבור אחד ה"הורים" של זן אמנון המכלוא שבו השמשתי, אמנון יאור (*O. aureus*). ערך זה עומד על 2.85 mg  $\text{NH}_3$ /l (Redner and Stickney, 1979). ערך אקוטי זה גבוה אומנם מהערך שנמצא במדגם המים, אך יש לזכור שבניסויי רעילות מיישמים תרכובת בודדת ואילו כאן נחשפו האמונונים למכלול תרכובות ועקות. חשיפה כזו יכולה לגרום לתגובת עקה מוגברת (stress by stress). גורם עקה ודאי נוסף, שהובחן על ידינו, הוא ירידה ניכרת (52%,  $P < 0.001$ ) בפעילות AChE במוח המלמדת על חשיפה אקוטית לרעלי עצב (איור 3.34). ירידה כזו, בצרוף רעילות האמוניה ואולי בצרוף גורמים נוספים יכולים להסביר את הרעילות הגבוהה של דוגמת המים לדגים.



אמנוני מכלוא שנחשפו במשך 30 יום לדגימות מים ממטי"ש רמת השרון (02/00) היו בעלי פעילות AChE תקינה. אולם, בבחינת תכולת P4501A נמצאה בדגים אלו אינדוקציה ברורה ומובהקת ( $P < 0.01$ ) ביחס לקבוצת הביקורת (איור 3.26). חשיפה במשך 30 יום של קרפיונים מצויים (08/00) במערכת זרימה רציפה שהוקמה על ידינו במכון גרמה לעלייה מתונה בלבד ולא מובהקת במערכת ציטוכרום P450. מבין הפרמטרים הביוכימיים שנבדקו רק תכולתו של ציטוכרום b<sub>5</sub> עלתה באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) ביחס לדגי הרקע (איור 3.35). בניסוי דומה שבו נחשפו אמנוני מכלוא (11/01) במערכת במשך 30 יום, לא הובחנה עלייה דרמטית במרכיבי מערכת P450. אומנם, הייתה עלייה מובהקת ( $P < 0.01$ ) בתכולת P4501A, אך פעילות EROD והתכולה הכללית של ציטוכרום P450 הייתה דומה לערכי קבוצת הייחוס (איור 3.36). לעומת זאת, פעילות AChE ברקמת הזימים של דגים אלו ירדה באופן דרסטי ( $P < 0.01$ , 74%), בעוד שברקמת המוח לא ניכרה ירידה מובהקת בפעילות (איור 3.37). ממצאי החשיפה לדוגמת המים ובמערכת הזרימה הרציפה, מצביעים על נוכחות שיירי אורגנוזרחנים ו/או קרבמטים ועל נוכחות תרכובות הידרוקרבוניות רעילות בקולחי רמת השרון.

הממצאים של עבודה זו ממטי"ש רמת השרון, טובים יחסית בהשוואה לממצאים ממטי"ש כפר סבא-הוד השרון. מאז הפעלת מכון רמת השרון חל שיפור משמעותי באיכות מי הירקון במורד מוצא הקולחים של רמת השרון, מבחינת הפרמטרים הכימיים והפיסיקליים המקובלים (Bar-Or, 2000). בשני המכונים מבוצע טיהור מים באמצעות תהליך של בוצה משופעלת. תהליך זה יכול להסיר עד ל-90% מהתרכובות הרעילות, אך עדיין ריכוזן של מספר תרכובות בשפכים המטופלים הנו גבוה מספיק על מנת להוות בעיה סביבתית (Petrasek *et al.*, 1983). הטיפול השלישוני שמבוצע ברמת השרון הוא ככל הנראה, הערך המוסף מבחינת איכות המים ורעילותם לדגים. יחד עם זאת, לא מצאתי בספרות סימוכין לכך שהטיפול השלישוני הוריד את רמת הרעילות הביולוגית לדגים בניסויים on-site. חשוב לציין, שמטי"ש כפר סבא-הוד השרון משרת אוכלוסייה גדולה יותר ואזור תעשייה מפותח יותר. באזורים צפופי אוכלוסייה ואזורי תעשייה גדולים, הביוב והשפכים התעשייתיים עשויים לכלול כמויות משמעותיות של תרכובות בעלות רעילות ביולוגית (Wong *et al.*, 2001).

ניטור ביולוגי באמצעות מערכת זרימה רציפה, הוכח בעבודותינו כשיטה יעילה המספקת מידע רב ערך לגבי איכות המים. שיטה זו טובה במיוחד לניטור מפעלים כדוגמת מכוני טיהור שפכים, אשר שופכים מזהמים את הנחלים. מערכות כאלו מופעלות בהצלחה על ידי מעבדתנו וחברת מקורות לשם ניטור מי המוביל הארצי. המערכת הספציפית, אשר הוקמה במטי"ש רמת השרון הייתה מערכת ארעית שהוקמה באופן עצמאי על ידינו ללא מעורבות פעילה של אנשי המכון בבנייתה. הבעיה המרכזית שהמערכת סבלה ממנה הייתה ספיקה נמוכה יחסית (30 liters/h). רמת ספיקה זו, נקבעה עקב הצורך בהשהיית המים לצורך דלורניציה ואי חיבור המערכת למערכת ניקוז מסודרת. ספיקה נמוכה משקפת במידה פחות טובה את תמונת המצב האמיתית במים. כמו כן, השהיית המים יכולה לגרום לנטרולן של תרכובות נדיפות רעילות בנוסף לכלור. בעבודה דומה שנעשתה on-site במכון טיהור שפכים בצרפת, נחשפו דגי קרפיון מצוי במערכת זרימה רציפה למי המכון ומי הנהר שאליו

מנוקזים הקולחים (Kosmala *et al.*, 1998). הדגים נחשפו במכלים גדולים של 500 ליטר והספק הזרימה למערכת היה 800 liters/h. מכלים גדולים מאפשרים גודל מדגם גדול וניתן לדגום לאחר זמני חשיפה שונים. הממצאים של מחקר זה הראו עלייה מובהקת בפעילות EROD בדגים שנחשפו למי הקולחים כבר לאחר ארבעה ימים. לסיכום, חשיפת דגים לקולחים לא מוכלרים, בהספקים גבוהים יותר ובמערכות גדולות יותר עשויה לשקף במידה טובה יותר את איכות המים.

## 4.6 שיטות חשיפה שונות של דגים בניטור ביולוגי

במחקר זה יושמו מספר שיטות של ניטור ביולוגי שבהן נחשפו דגים למי הירקון. לכל שיטה ושיטה ישנם יתרונות בצד חסרונות. לעניות דעתי, ניטור ביולוגי באמצעות מערכת זרימה רציפה היא השיטה הטובה ביותר, מבין השיטות ששימשו למחקר זה, לאחר שמתגברים על הבעיות הטכניות והתקציביות הכרוכות בהקמתה. להלן השוואה בין שיטות הניטור השונות בדגים:

שיטת ניטור	יתרונות	חסרונות
דייג	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ דגים נחשפים בסביבה הטבעית</li> <li>♣ לטווח זמן ארוך (התגובה הביולוגית מצטברת)</li> <li>♣ עקה כתוצאה מהניטור מוגבלת ללכידה</li> <li>♣ הדגים משלימים בטבע תהליכי חיים כמו התפתחות ורבייה</li> <li>♣ הדגים פעילים בכל גוף המים לרבות מגע עם הקרקעית</li> <li>♣ הדגים נמצאים בראש שרשרת המזון ויש תהליך של ביומגניפיקציה</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♠ אין מידע לגבי ההיסטוריה של החשיפה</li> <li>♠ הדגים יכולים להימנע מאזורים מזוהמים</li> <li>♠ התגובה הביולוגית מורכבת עקב השפעת גורמים רבים כמו עונתיות, תזונה, תחרות, גיל, מגוון גנטי וכולי</li> <li>♠ אין אפשרות לביקורת אמיתית קשיים בהשגת מדגם סטטיסטי מספק עקב שפיעות דגים נמוכה</li> <li>♠ עלות כספית גבוהה – נדרש ציוד וכוח אדם מיומן</li> </ul>
כלובים	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ הדגים נחשפים במקום אחד בתנאים הקרובים לתנאי הסביבה</li> <li>♣ שליטה על משך החשיפה ומיקומה</li> <li>♣ שליטה על מין הדג, זוויג, גיל ומספר הדגים</li> <li>♣ ניתן לבצע חשיפה במקביל באתרים שונים. למשל, במעלה ובמורד מקור זיהום</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♠ הדגים סובלים מעקה הנגרמת מן השבי, הצפיפות ותהליך ההעברה</li> <li>♠ הדגים אינם יכולים להימנע מעקות טבעיות כמו שינוי טמפרטורה, חוסר תמצן, זיהום וכולי</li> <li>♠ הדגים מוגבלים לאזור הכלוב בלבד בעיות של גניבה ופגיעה בכלובים באתרים הנגישים לציבור</li> </ul>
מדגמי מים	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ שליטה על מין הדג, זוויג, גיל ומספר הדגים</li> <li>♣ אפשרות לטיפול ביקורת</li> <li>♣ אפשרות לדילול הדגימות או נטרול תרכובות שאינן רלוונטיות לניטור</li> <li>♣ בקרה מדויקת של תנאי הניסוי</li> <li>♣ מעט הגבלות על מקום הדגימה</li> <li>♣ זיהוי מהיר של רעילות אקוטית</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♠ תנאי החשיפה אינם דומים לסביבה הטבעית</li> <li>♠ חשיפה מבוקרת קצרה אינה מחקה חשיפה ארוכת טווח</li> <li>♠ חשיפה לנפחי מים זעומים ביחס לשיטות האחרות שאינן בהכרח מייצגות נאמנה את איכות המים</li> <li>♠ החלפות המים גורמות לעקה</li> </ul>
מערכת זרימה רציפה	<ul style="list-style-type: none"> <li>♣ שליטה על מין הדג, זוויג, גיל, מספר הדגים ומעקב אחר בריאותם</li> <li>♣ מניעה של וונדליזם</li> <li>♣ בקרה מדויקת של תנאי הניסוי</li> <li>♣ אפשרות לדילול הדגימות או נטרול תרכובות שאינן רלוונטיות לניטור</li> <li>♣ אין עקה כתוצאה מ-handling</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♠ עלות כספית גבוהה</li> <li>♠ מחייב החזקה שוטפת – כוח אדם</li> <li>♠ ניתן לביצוע רק במקומות מוסדרים אך לא בשטח עצמו</li> <li>♠ דורש שיתוף פעולה מלא מצד בעלי המוסד הנבדק (כגון, מפעל או מכון טיהור שפכים)</li> </ul>

#### 4.7 התאמת מיני דגי המחקר לתוכניות ניטור ביולוגי

הירקון על אף שהוא סובל מייבוש מקורותיו ומזיהום כרוני מקיים עד היום חברה מעניינת של דגים ממוצא אפריקני ואסייתי (גורן, 1995). בנוסף קיימים בנחל מיני דגים שעברו אינטרודוקציה בידי האדם בטעות או במכוון. לצורך ביצוע עבודה זו נעשה שימוש במספר מינים של דגי גרם החיים בנחל. השיקולים המרכזיים שהדריכו אותי בבחירת מיני הדגים ששימשו לניטור הביולוגי הם:

1. רגישות גבוהה של הסמנים הביולוגים הרלוונטיים (מחייב מחקר או ידע מוקדם).
2. עמידות יחסית בתנאי זיהום.
3. שפיעות ותפוצה גבוהות ויכולת איסוף נוחה בשטח.
4. אזור מחייה מוגבל יחסית שישקף חשיפה באתר הדגימה וסביבתו הקרובה.
5. גודל גוף גדול יחסית המאפשר את נוחות הבדיקה.
6. אפשרות לרכישת המין באופן שוטף ממדגים מסחריים וקלות החזקה המאפשרים ביצוע ניסויי חשיפה יזומים לאורך השנה.

אף אחד מהמינים שנבדקו בעבודה זו לא נותן מענה מושלם לכלל הפרמטרים שתוארו לעיל. מבחינת תפוצה ושפיעות, המינים הבולטים בחלקיו המתוקים של הירקון הם אמנון מצוי וקרפיון מצוי (גפני ועמיתיו, 1997). קיפון טובר וקיפון גדול ראש הם המרכיב העיקרי של חברת הדגים בירקון המלוח (גורן, 1995). מבחינה ביוכימית, הרגישות הגבוהה ביותר של הסמנים הביולוגים שנבדקו נמצאה בעיקר בקיפון טובר, ובמידה פחותה באמנון מכלוא. לגבי שני מינים אלו קיים ידע ביוכימי רב במעבדתנו ובספרות. בעבודה הנוכחית ובעבודות נוספות ( Ferenczy *et al.*, 1997; Yawetz *et al.*, 1993b) נמצא שקרפיון מצוי הוא בעל רגישות נמוכה יחסית לחשיפה לשאריות קוטלי חרקים. על כל פנים, מבחינת אינדוקציה ציטוכרום P450A, נראה שמין זה הוא בעל רגישות בינונית. מבחינת זמינות מסחרית, הקיפונים אינם מתרבים בכריכות גדול הדגים אלא בים בלבד, בתנאים טבעיים (רוטברד, 1994). לפי כך, תקופת זמינותם המסחרית היא עונתית וקצרה. אמנון מכלוא הוא הזמין ביותר, ניתן להשיגו ממגוון מקורות, ודרישות החזקתו אינן גבוהות. לסיכום, רגישותו הביוכימית הגבוהה של אמנון המכלוא בצרף זמינותו המסחרית מציבים אותו כזן מועדף לניטור איכות מים מתוקים. מאידך, זן זה אינו מתאים לניטור בגופי מים מלוחים. ייתכן והמין המתאים ביותר לניטור הירקון ונחלי חוף אחרים הוא אמנון מצוי, עקב תפוצתו הרבה ועמידותו בתנאי זיהום ומליחות גבוהה. חסרונותיו הם שהוא חסר ערך כלכלי ונחשב מזיק המתחרה בדגים אחרים (רוטברד, 1994). אי לכך, מין זה אינו זמין בכמויות מסחריות ופרטים מזדמנים לנו רק באופן אקראי. בנוסף, אין ידע ביוכימי במין זה, לגבי אינדוקציה ציטוכרום P450.

## סיכום

בעבודה זו, נעשה שימוש בשני סמנים ביולוגים בדגי גרם לשם ניטור זיהום מי הירקון בתרכובות בעלות פעילות ביולוגית רעילה. האחד, עיכוב פעילות AChE, מאפשר זיהוי חשיפה לשאריות חומרי הדברה מסוג אורגנוזרחנים וקרבמטים. הסמן הביולוגי השני הנו אינדוקציה ציטוכרום P4501A והפעילות הקטליטית האופיינית לו, EROD, המשמשים לניטור רמת החשיפה לתרכובות הידרוקרבוניות רעילות ומסרטנות.

שני זנים של אמנון מכלוא נרכשו מחוות הדגים של הקיבוצים המעפיל ועין חרוד מאוחד, ומחוות דגים שמשכנה היה בנמל אשדוד. קביעת רמות הרקע של מערכת ציטוכרום P450 והאנזים AChE באמנונים אלו, העלתה שקיימים הבדלים בין החוות מבחינת רמת החשיפה לתרכובות הידרוקרבוניות רעילות ורעלי עצב. הרמות הביוכימיות של מערכת P450 בדגי המעפיל ודגי נמל אשדוד, היו דומות ונמוכות יחסית. באמנונים שהובאו ממדגה עין חרוד נמצאה אינדוקציה מובהקת של תכולת P4501A ( $P < 0.001$ ) ופעילות EROD. בדגים מעין חרוד נמצאה גם תכולה גבוהה יותר באופן מובהק ( $P < 0.01$ ) של האנזים P4502E-like. כמו כן, נמצאה בדגים אלו ירידה מובהקת בפעילות AChE ברקמות הזימים ( $P < 0.05$ ) והמוח ( $P < 0.001$ ). הממצאים מצביעים על חשיפה של אמנוני עין חרוד לריכוזים גבוהים יחסית של תרכובות הידרוקרבוניות ולקוטלי חרקים אורגנוזרחנים ואו קרבמטים במקום גידולם.

דגי אמנון מכלוא נחשפו בנסיונות מעבדה לתרכובות הידועות כמשרות סוגים ספציפיים של ציטוכרום P450. חשיפה ל- $\beta$ NF, המקובל כמשרן לציטוכרום P4501A, באמצעות הזרקה לחלל הבטן, גרמה בכל המינונים שניתנו, לאינדוקציה מובהקת ( $P < 0.001$ ) של תכולת המופרוטאין זה ופעילותו הקטליטית EROD. בין מינוני המשרן לאינדוקציה הציטוכרום, נמצא קשר לינארי חיובי מובהק ( $r^2 = 0.65$ ,  $P < 0.001$ ). קשר זה מלמד על תגובה התלויה במנה של הסמנים הביולוגים הנ"ל באמנון מכלוא. המתאם הגבוה ( $r^2 = 0.76$ ,  $P < 0.001$ ), שנמצא בדגים אלו בין תכולת P4501A לפעילות EROD מלמד על הקשר ההדוק שישנו בין שני התבחינים. חשיפה של דגי אמנון מכלוא ל- $\beta$ NF בעמודת המים, גרמה אף היא לעלייה מובהקת בתכולת P4501A ופעילות EROD ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , בהתאמה). ממצא זה מלמד שניתן לקבל אינדוקציה של ציטוכרום P4501A באמנון מכלוא באמצעות חשיפה למדגמי מים.

ציטוכרום P4502E-like, נבחן כסמן ביולוגי פוטנציאלי לאבחון קבוצות מזהמים בעלי פעילות רעילה וסרטנית כמו למשל, ממסים אורגניים תעשייתיים. תגובה אימיונוכימית נמצאה במיקרוזומים מהכבד של אמנוני מכלוא שנחשפו ל-ethanol ו-TCE, משרנים ידועים של ציטוכרום זה ביונקים, אך הטיפולים לא גרמו לעלייה בתכולת האנזים. בחינת תכולת ציטוכרום

P4502E-like במיני דגים שונים שנלכדו באתרים שונים בירקון לא מצאה ביטוי של האנזים. השימוש באינדוקציה ציטוכרום זה היא בעלת פוטנציאל לעבודות סביבתיות, אך לשם כך נדרש מחקר עתידי נוסף שיכלול נוגדנים ספציפיים יותר ותבחין מהימן לפעילות הקטליטית.

TCE הוא מזהם מים נפוץ הנמצא בכמויות משמעותיות במי שתייה בארץ ובעולם. אמנוני מכלוא שנחשפו ל-TCE, מתו תוך כדי הפגנת תסמינים התנהגותיים ופיסיוולוגיים האופייניים לפגיעה במערכת העצבים. בחינת פרופיל AChE בדגים אלו העלתה שינוי עיכוב מובהק ( $P < 0.01$ ) של פעילות האנזים ברקמות חיוניות לתפקוד הגוף-כבד, זימים ומוח. על כל פנים, ניסיונות קינטיים *in vitro* הראו ש-TCE אינו מעכב של AChE. לפי כך, המנגנון שגרם לפגיעה בפעילות *in vivo* אינו ידוע. תפוצתו הרחבה של חומר זה, נוכחותו במי תהום ורעילותו הגבוהה צריכים להוות גורם ממריץ למציאת סמנים ביולוגיים יעילים לניטורו. האם פרופיל AChE היא שיטה מתאימה לכך, זוהי שאלה הדורשת את המשך המחקר.

עיכוב פעילות AChE נמצא בדגי אמנון מכלוא, שנחשפו בכלוב או לדגימת מים ממאגר חברת מקורות בראש העין. בדגים אלו ובדגי אמנון גליל שנלכדו במאגר, ניכרה פגיעה משמעותית יותר בפעילות רקמת המוח לעומת הזימים, דבר האופייני בדרך כלל לקוטלי חרקים קרבמטים. בדגי אמנון מכלוא שנחשפו לדגימת מים או בכלוב במאגר, נמצאה אינדוקציה מובהקת של ציטוכרום P4501A. דגי אמנון גליל וקרפיון מצוי שנתפסו במאגר הראו אף הם אינדוקציה מובהקת של המופרוטאין זה. סיכום הממצאים מצביעים על כך שמאגר מים זה 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. לעומת זאת, הממצאים הביוכימיים מדגי קרפיון מצוי שנלכדו במעלה הירקון משקפים איכות מים טובה בקטע זה מבחינת נוכחות שיירי כימיקלים הידרוקרבוניים.

חשיפה של אמנוני מכלוא לדגימות מים ממעלה הקטע התיכון של נחל הירקון וספק המים העיקרי של קטע זה, מטייח כפר סבא-הוד השרון, גרמה בדרך כלל למוות בטווחי זמן של מספר שעות. על אף זמני החשיפה הקצרים, נמצא בחלק מהמקרים עיכוב בפעילות AChE בזימי ומוח הדגים. הממצאים מראים שקולחי מטייח כפר סבא-הוד השרון כוללים שיירי קוטלי חרקים המגיעים אל הקטע התיכון. על כל פנים, הריכוזים הם ככל הנראה, נמוכים ואינם יכולים לשלעצמם להסביר את הרעילות הגבוהה של המים לדגים.

במערכת זרימה רציפה שהוקמה במטייח רמת השרון נחשפו דגי אמנון מכלוא וקרפיון מצוי לתקופה של שלושים יום. שרידות הדגים במערכת הייתה גבוהה ותמותה התרחשה רק בעקבות תקלה שגרמה להכלרת יתר של המים. אחוזי שרידות כה גבוהים במי קולחים מצביעים על איכות משופרת, ככל הנראה, בעקבות הטיהור השלישוני. על כל פנים, באמנוני מכלוא נמצא עיכוב של

75% ( $P < 0.01$ ) בפעילות AChE בזימים המעיד על נוכחות שיירי רעלים אורגנוזרחנים ו/או קרבמטים. אינדוקציה P4501A מובהקת שנמצאה בדגים אלו ( $P < 0.01$ ) ובדגי אמנון מכלוא שנחשפו לדגימות מים מהמכון ( $P < 0.01$ ), מלמדת על נוכחותן בקולחים של תרכובות הידרוקרבוניות בעלות זמינות ביולוגית לדגים.

מיני דגים שונים ששהו במי אתר שבע טחנות באופן טבעי או בכלוב, סבלו מירידה בפעילות AChE ברקמות הזימים והכבד. למעט אמנוני מכלוא ששהו בכלוב, בשאר מיני הדגים הפעילות ברקמת המוח הייתה תקינה. פגיעה סלקטיבית בזימים ללא פגיעה בפעילות רקמת המוח אופיינית יותר לרעלים אורגנוזרחנים. ממצא זה, הנתמך בממצאים של אנליזה כימית, מצביע על נוכחות כרונית של שיירי חומרי הדברה אורגנוזרחנים בשבע טחנות. עלייה משמעותית באינדוקציה ציטוכרום P4501A בכבד, נמצאה בשלושה מינים שנלכדו בשבע טחנות: אמנון גליל (פי 42,  $P < 0.05$ ), קרפיון מצוי (פי 13.5,  $P < 0.001$ ) וקיפון טובר (פי 15,  $P < 0.001$ ). פעילות EROD לעומת זאת, לא עלתה באופן מובהק באף אחד ממיני הדגים, ובמקרה של קיפון טובר היא אף ירדה לאפס. ממצא זה שתואם ממצאים קודמים (זילברמן, 1995) מעיד על עיכוב כרוני של פעילות P4501A, ככל הנראה, בהשפעת מזהמים קסנוביוטים הנוכחים באתר שבע טחנות. בכל המינים, לרבות אמנוני מכלוא שנחשפו לדגימות מים משבע טחנות, נמצאה גם עלייה מובהקת בתכולה הכללית של ציטוכרום P450. עלייה זו עשויה להיות קשורה לאינדוקציה של ציטוכרומים נוספים, אך לשם אישוש השערה זו יידרש מחקר נוסף.

שבוע לאחר דליפת כמות גדולה של מזוט שנבעה מתקלה בתחנת הכוח רידינג נחשפו בכלובים דגי קיפון טובר, באתרים שונים בירקון המלוח. הדגים סבלו מעקה חריפה שהתבטאה בתמותת רובם המכריע (85%). הדגים ששרדו, שהו שבועיים ימים מתחת לגשר רוקח ובמרחק של כקילומטר מנקודת הדליפה. על כל פנים, ממצאי אנליזה ציטוכרום P4501A לא הראו הבדל בין דגים אלו לקבוצת הייחוס. קיפוני טובר שנידוגו, בשתי הזדמנויות שונות, קרוב לשפך הנחל היו בעלי תכולה ופעילות ציטוכרום P4501A גבוהים באופן מובהק ( $P < 0.001$ ) מדגי מדגה קיבוץ המעפיל. פעילות AChE בכבד דגים אלו, הייתה נמוכה משמעותית מדגי קבוצת הייחוס. אם כן, הממצאים מראים שהירקון המלוח קולט שאריות קוטלי חרקים ושיירי תרכובות הידרוקרבוניות רעילות. מקור וודאי לזיהום מורד הנחל הוא הקולחים והשופכים הבאים מהחלק התיכון, אך לא נשללו בעבודה זו מקורות אחרים. תרומתם של נחל איילון, תחנת הכוח רידינג וזיהום הים התיכון לזיהום שפך הירקון טעונה בדיקה.

לסיכום, ממצאי עבודה זו, מצביעים על זיהום כרוני של הירקון, ובעיקר בקטעי הנחל התיכון והמלוח, בשאריות חומרי הדברה אורגנוזרחנים וקרבמטים ושיירי פסולת תעשייתית רעילה. קולחי מכוני טיהור השפכים תורמים לזיהום הנחל בתרכובות אלו. מאגר ראש העין, המכיל עודפי מי שתייה, נמצא חשוף לפרקים לכימיקלים בעלי רעילות ביולוגית.

## רשימת ספרות

- אביצור, ש. 1957. הירקון הנהר וגלילותיו. הוצאת הקיבוץ המאוחד. תל-אביב.
- אבנימלך, י., הרצברג, מ. וכוכבא, מ. 1998. דיגום קרקעית הירקון. דו"ח שנתי למחקר 920-150. מוגש למשרד לאיכות הסביבה ולרשות נחל ירקון. הטכניון, מכון טכנולוגי לישראל, חיפה.
- אגמל, מ. 1973. השפעת זיהום מי הנחלים אלכסנדר וירקון על צמחייתם. עבודת גמר לקראת התואר "מוסמך למדעי הטבע". אוניברסיטת תל-אביב.
- אלחנני, ש., רוטן, ד. וגרבר, א. 2001. אקוויפר החוף בישראל, לאן? האגודה הישראלית לאקולוגיה ולמדעי איכות הסביבה, הכינוס השנתי ה-31, תל-אביב. עמ' 6.
- אלרון, א. 2000. היבטים בביולוגיה ואקולוגיה של לבנון הירקון (*Acanthobrama telavivensis*), מין בסכנת הכחדה. עבודת גמר לקראת התואר "מוסמך לאקולוגיה ואיכות הסביבה". אוניברסיטת תל אביב.
- בנדק-סגל, מ. 1996. שימוש במרקרים ביוכימיים לחקר מידת חשיפת חיות בר והאדם למוזהמי סביבה רעילים ומסרטנים. עבודת גמר לקראת תואר "מסמך לאקולוגיה ואיכות הסביבה". אוניברסיטת תל-אביב.
- בן צבי, א., גבסקנכט, ל. ועצמון, ב. 1995. ההידרולוגיה של הירקון. הירקון, קובץ מאמרים בהוצאת רשות נחל ירקון. רמת גן. עמ' 24-31.
- בראור, י. 1995. מוזהמי הירקון. האגף לאיכות מים, המשרד לאיכות הסביבה. הירקון, קובץ מאמרים בהוצאת רשות נחל ירקון. עמ' 53-54.
- גולני, ד. 1997. מדריך הדגים של ישראל. כתר הוצאה לאור. ירושלים.
- גורן, מ. 1995. על דגי הירקון. המחלקה לזואולוגיה, אוניברסיטת תל-אביב. הירקון, קובץ מאמרים בהוצאת רשות נחל ירקון. עמ' 58-61.
- גורן, מ., ברנס, א. ודיאמנט, א. 1999. מגדיר לדגי נחלים ואגמים בישראל. חוברת הדרכה לקורס בינאוניברסיטאי "מבוא לאיכטיוולוגיה". בהפקת המכון הבינאוניברסיטאי למדעי הים, אילת.
- גזית, א. 1999. חברת חסרי חוליות כאמצעי לאבחון בריאות נחלים: הירקון כקנה מידה לנחלי החוף בישראל. דו"ח שנתי מוגש למשרד לאיכות הסביבה ולרשות נחל ירקון. המכון לשמירת טבע. אוניברסיטת תל-אביב.
- גפני, ש., גורן, מ. וגזית, א. 1997. בקשר בין תנאי בית הגידול והתגובה הביולוגית של דגים בנחל הירקון, דו"ח התקדמות לתקופת ספטמבר 1996 ספטמבר 1997 מחקר מס, 123-6. המכון לחקר שמירת הטבע והמחלקה לזואולוגיה. אוניברסיטת תל-אביב.
- גרבר, א., רוטן, ד. ואלחנני, ש. 2001. זיהום מי תהום בחומרים אורגניים נדיפים באזור תל-אביב. האגודה הישראלית לאקולוגיה ולמדעי איכות הסביבה, הכינוס השנתי ה-31, תל-אביב. עמ' 73.
- זילברמן, ב. 1995. חקר האינדוקציה של ציטוכרום P4501A ברקמות הכבד והלב של הדג *Mugil capito* ושימוש בהמופרטאין זה כביואינדיקטור לזיהום מי החופים של ים התיכון בפסולת הידרוקרבנית רעילה. עבודת גמר לקראת התואר "מוסמך לאקולוגיה ואיכות הסביבה". אוניברסיטת תל אביב.
- לשם, א. 2001. שימור מי תהום אסטרטגי – אזור מעיינות ראש העין. האגודה הישראלית לאקולוגיה ולמדעי איכות הסביבה, הכינוס השנתי ה-31, תל-אביב. עמ' 5.
- מורד, א. 1999. השינויים באיכות המים של נחל הירקון והשלכותיהם על צמחיית המים והגדות. עבודת גמר לקראת התואר "מוסמך למדעי הטבע". אוניברסיטת תל-אביב.



מנליס, ר. 2001. מנגנונים ביוכימיים של תנגודת לרעלי עצב ותרכובות מוטגניות, בדגי גרם ממקורות מים מתוקים בישראל. עבודת גמר לשם קבלת התואר "דוקטור בפילוסופיה". הוגש בנובמבר 2001. אוניברסיטת תל-אביב.

פיינשטיין, ש., פלאי, א. ועזרא, ש. 2000. איפיון כימי של דוגמאות זיהום מדלקים בירקון בעקבות הדליפה מתחנת הכוח רידינג ב- 31.5.2000. המחלקה למדעי הגיאולוגיה והסביבה. אוניברסיטת בן גוריון בנגב, באר-שבע.

פישלזון, ל., 1991. החיים במים (מהד' 2). אלון, ע. ופישלזון, ל., (עורכים), החי והצומח של ארץ ישראל. אנציקלופדיה שימושית מאוירת. כרך 4. עמ' 264-272. הוצאת משרד הביטחון/החברה להגנת הטבע, תל אביב.

קפלן, מ. 1996. גאומורפולוגיה, מסלע וקרקעות. תוכנית אב לנחל הירקון. רשות נחל ירקון. רמת גן.

קרט, נ., ברנר, ס., חרות, ב., רוזנטראוב, צ. וגרטנר, י. 2001. משטר הידרוגרפי, משטר הזרימה ואיכות מי נחל הירקון המלוח. המכון לחקר ימים ואגמים לישראל בע"מ. חיפה.

רב אחא ח., גרויסמן ל. ולב ע. תפוצת מזהמים אורגניים רעילים במי הירקון: זיהוי, מוצא וגורל. דו"ח שנתי מוגש למשרד לאיכות הסביבה ולרשות נחל ירקון. המעבדה לחקר איכות המים, משרד הבריאות, היחידה למדעי הסביבה, ביה"ס למדע ישומי, האוניברסיטה העברית בירושלים. 2001.

רוטברד, ש. 1994. צמחים ובעלי-חיים במשק האדם (מהד' 3). אלון, ע. וארנון, י. (עורכים), החי והצומח של ארץ ישראל. אנציקלופדיה שימושית מאוירת. כרך 12. עמ' 263-268. הוצאת משרד הביטחון/החברה להגנת הטבע, תל אביב.

רשות נחל ירקון. דו"חות לשנים 1998-2001. המשרד לאיכות הסביבה. רמת גן.

שטוץ, ס. 2001. השפעה של שכבת קרקע מכסה על האיכות הבקטריאלית של מי התהום. האגודה הישראלית לאקולוגיה ולמדעי איכות הסביבה, הכינוס השנתי ה- 31, תל-אביב. עמ' 33.

Abbas R. and Hayton W.L. 1997. A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for paraoxon in rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 145: 192-201.

Adams S.M. and Greeley M.S., 2000. Ecotoxicological indicators of water quality: using multi response indicators to assess the health of aquatic ecosystem. *Water, Air and Soil Pollution* 123: 103-115.

Almeida P.R., 1996. Eustarine movement patterns of adult thin-lipped grey mullet, *Liza ramada* (Risso) (Pisces, Mugilidae), observed by ultrasonic tracking. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 202: 137-150.

Anderrson T. and Förlin L. 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology* 24: 1-20.

Anderson H.A. 1985. Utilization of adipose tissue biopsy in characterizing human halogenated hydrocarbon exposure. *Environmental Health Perspectives* 60: 127-131.

- Andersson T., Pesonean M., and Johnsson C. 1985. Differential induction of cytochrome P450 dependent monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathion transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of the rainbow trout by  $\beta$ -naphthoflavone or clophen A50. *Biochemical Pharmacology* **34** (18): 3309-3314.
- Anzenbacher P. and Anzenbacherova E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58** (5-6): 737-747.
- Arinc E. and Sen A. 1999. Hepatic cytochrome P4501A and 7-etoxyresorufin O-deethylase induction in mullet and common sole as an indicator of toxic organic pollution in Izmir Bay, Turkey. *Marine Environmental Research* **48**:147-160.
- Arukwe A. and Goksoyr A. 1997. Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbut (*Scophthalmus maximus* L). *Journal of Experimental Biology* **277**: 313-325.
- Bailey G.S., Hendricks J.D., Nixon J.E., and Pawlowski N.E. 1984. The sensitivity of rainbow trout and other fish to carcinogens. *Drug Metabolism Reviews* **15**: 725-750.
- Bainey A.C.D., Woodin B.R., and Stegeman J.J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from billings reservoir Sao Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology* **44**:289-305.
- Balint T., Szegletes T., Szegletes Zs., Halasy K., and Nemcsok J. 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology* **33**:279-295.
- Bar-Or Y. 2000. Restoration of the rivers in Israel's coastal plain. *Water, Air and Soil Pollution* **123**: 311-321.
- Barouki R. and Morel Y. 2001. Repression of cytochrome P4501A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochemical Pharmacology* **61**:511-516.
- Barret L., Torch S., Leray C., Sarlieve L., and Saxod R. 1992. Morphometric and biochemical studies in trigeminal nerve of rat after trichloroethylene or dichloroacetylene oral administration. *Neurotoxicology* **13**: 601-614.
- Barton H.A., Creech J.R., Godin C.S., Randall G.M., and Seckel C.S. 1995. Chloroethylene mixtures: pharmacokinetic modeling and *in vitro* metabolism of vinyl chloride, trichloroethylene, and trans-1-2 dichloroethylene in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **130**:237-247.
- Belfroid A.C., van Drunen M., Beek M.A., Schrap S.M., van Gestel C.A.M., and van Hattum B. 1999. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment* **222**:167-183.

- Bernad P.G., Newell S., and Spyker D.A. 1987. Neurotoxicity and behavior abnormalities in a cohort chronically exposed to trichloroethylene. *Veterinary Human Toxicology* 29: 475.
- Berndtson A.K. and Chen T.T. 1994. Two unique CYP1 genes are expressed in response to 3-Methylcholanthrene treatment in Rainbow Trout. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310 (1): 187-195.
- Bocquene G., Galgani F., and Traquet P. 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research* 30:29-35.
- Bocquene G. and Galgani F. 1991. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: choice of a method for detection of effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22:1-8.
- Bon S., Rosenberry T.L., and Massoulie J. 1991. Amphiphilic, glyco-phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC) insensitive monomers and dimers of acetylcholinesterase. *Cellular and Molecular Neurobiology* 11: 157-172.
- Bradford M.A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bresler V., Bissinger V., Abelson A., Dizer H., Sturm A., Kratke R., Fishelson L., and Hansen P.D. 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Hegoland Marine Research* 53 (3-4): 219-243.
- Bresnick E. 1993. Induction of Cytochrome P450 1 and P450 2 by Xenobiotics. In: *Cytochrome P450*, edited by Schenkman J.B. and Greim H., Berlin: Springer-Verlag, p. 503-524.
- Brown-Peterson N., Krol R.M., Zhu Y., and Hawkins W.E. 1999. N-nitrosodiethylamine initiation of carcinogenesis in japanese medaka (*Oryzias latipes*): hepatocellular proliferation, toxicity, and neoplastic lesions resulting from short term, low level exposure. *Toxicological Sciences* 50:186-194.
- Bruschweiler B.J., Wurgler F.E., and Fent K. 1996. Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31 (4): 475-482.
- Buhler D.R., Miranda C.L., Yang Y.H., Zaho X., Henderson M.C., and Wang-Buhler J.L. 1994. Effects of gonadal hormones on the expression of cytochrome P450s in rainbow trout liver. *The Toxicologist* 14: 127.
- Buhler D.R. and Wang-Buhler J.L. 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 121:107-137.

- Burke M.D. and Mayer R.T. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation, which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition* 2: 583-588.
- Burnette W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio-iodinated protein. *Analytical Biochemistry* 112:195-203.
- Cardona L. 2000. Effects of salinity on the habitat selection and growth performance of Mediterranean flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 50 (5): 727-737.
- Carpenter S.R., Caraco N.F., Corell D.L., Howarth R.H., Sharpley A.N., and Smith V.H. 1998. Nonpoint pollution of surface waters in phosphorus and nitrogen. *Ecology Applied* 8 (3): 559-568.
- Celander M., Buhler D.R., Förlin L., Goksøyr A., Miranda C.L., Woodin B.R., and Stegeman J.J. 1996. Immunochemical relationships of cytochrome P4503A-like proteins in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 15 (4): 323-332.
- Celander M. and Stegeman J.J. 1997. Isolation of a cytochrome P450 3A cDNA sequence (CYP3A30) from the marine teleost *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analyses of CYP3A genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236:306-312.
- Chudaev M.V., Gilep A.A., and Usanov S.A. 2001. Site directed mutagenesis of cytochrome b<sub>5</sub> for studies of its interaction with cytochrome P450. *Biochemistry* 66 (6): 667-681.
- Clarke D.J., George S.G., and Burchell B. 1991. Glucuronidation in fish. *Aquatic Toxicology* 20: 35-56.
- Cojocel C., Beuter W., Muller W., and Mayer D. 1989. Lipid peroxidation: A possible mechanism of trichloroethylene- induced nephrotoxicity. *Toxicology* 55: 131-141.
- Cok I., Wang J.L., Kedzierski M.M., Miranda C.L., Yang Y.H., and Buhler D.R. 1998. Expression of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in brain, blood, small intestine, and other tissue of rainbow trout. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:790-795.
- Collier T.K., Connor S.D., Eberhart B.T.L, Anulacion B.F., Goksøyr A., and Varanasi U. 1992. Using cytochrome P450 to monitor the aquatic environment: Initial results from regional and national surveys. *Marine Environmental Research* 34:195-199.
- Coppage D.L. and Mathews E. 1974. Shorten effect of organophosphate pesticides on cholinesterase of estuarine fishes and pink shrimp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 11: 483-487.

- De Flora S., Bagnasco M., and Zanicchi P. 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research* 258:285-320.
- Dembélé K., Haubruge E., and Gaspar C. 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45:49-54.
- Denison M.S. and Whitlock J.P. 1995. Xenobiotics inducible transcription of cytochrome P450 genes. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (31): 18175-18178.
- DiPinto L.M., Coull B.C., and Chandler G.T. 1993. Lethal and sublethal effects of a sediment associated PCB Aroclor 1254 on a meiobenthic copepod. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1909-1918.
- Edwards C.A. 1975. *Persistent Pesticides in the Environment*, Ohio, Cleveland: CRC Press, 138 pages.
- EIFAC. 1973. Water quality for European freshwater fish: report on ammonia and inland fisheries. *Water Research* 7: 1011-1022.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., and Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-96.
- Elskus A.A and Stegeman J.J. 1989. Induced cytochrome P450 in *Fundulus heteroclitus* associated with environmental contamination by polychlorinated biphenyls and polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 27:31-50.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1985. National primary drinking water regulation on volatile synthetic organic chemicals. *Federal Registration* 50 (219): 46880-46933.
- EPA. (U.S. Environmental Protection Agency). 1993. Seminar on characterizing and remediating dense nonaqueous phase liquids at hazardous sites. EPA/600/K-93/003 May.
- Estabrook R.W. and Werringloer J. 1978. The measurements of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. In: *Methods of Enzymology*, edited by Fleischer S. and Packer L., New York: Academic Press, p. 212-220.
- Eto M. 1974. *Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry*, Cleveland: CRC press, Inc.
- Falckh P.H., Wu Q.K., and Ahokas J.P. 1997. CYP4T1-A cytochrome P450 expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236:302-305.

- Fan A.M. 1988. Trichloroethylene: Water contamination and health risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination Toxicology* 101: 55-92.
- Feijtel T., Kloepper-Sams P.J., den Haan K., van Egmond R., Comber M., Heusel R., Wierich P., Ten Berge W., Gard A., de Wolf W., and Niessen H. 1997. Integration of bioaccumulation in an environmental risk assessment. *Chemosphere* 34: 2337-2350.
- Fent K., Woodin B.R., and Stegeman J.J. 1998. Effect of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 121:277-288.
- Ferenczy J., Szegletes T., Balint T., Abraham M., and Nemcsok J. 1997. Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* 16:545-529.
- Flammarion P., Migeon B., and Garric J. 1998a. Statistical analysis of cyprinid Ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:144-153.
- Flammarion P., Migeon B., Urios S., Morfin P., and Garric J. 1998b. Effect of methidathion on cytochrome P4501A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquatic Toxicology* 42:93-102.
- Fulton M.H. and Key P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrate as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (1): 37-45.
- Gafny S., Goren M., and Gasith A. 2000. Habitat condition and fish assemblage structure in a coastal Mediterranean stream (Yarqon, Israel) receiving domestic effluent. *Hydrobiologica* 422/433:319-330.
- Gasith A. 1992. Conservation and management of the coastal streams of Israel: An assessment of stream status and prospect for rehabilitation. In: *River Conservation and Management*, edited by Boon J.P., Calow P., and Petts G.E., New York: John Wiley & Sons Ltd., p. 51-64.
- Gasith A., Bing M., Raz Y., and Goren M. 1998. Fish community parameters as indicators of habitat conditions: The case of the Yarqon, a lowland, polluted stream in a semi-arid region (Israel). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26:1023-1026.
- Gasith A. and Resh V.H. 1999. Streams in Mediterranean climate regions: abiotic influence and biotic responses to predictable seasonal events. *Annual Review of Ecology System* 30: 51-81.
- Ghosh M.C., Ghosh R., and Ray K. 2001. Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufine-o-deethylase in cultured catfish hepatocytes. *Environmental Research* 86: 167-173.

- Godard C.A.J., Leaver M.J., Said M.R., Dickerson R.L., George S., and Stegeman J.J. 2000. Identification of cytochrome P450 1B-like sequences in two teleost fish species (scup, *Stenotomus chrysops* and plaice, *Pleuronectes platessa*) and in a cetacean (striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*). *Marine Environmental Research* 50:7-10.
- Goeptar A.R., Scheerens H., and Vermeulen N. 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology* 25 (1): 25-65.
- Goksøyr A. 1985. Purification of hepatic microsomal cytochromes P450 from  $\beta$ -naphthoflavone treated Atlantic cod (*Gadus morhua*), a marine teleost fish. *Biochemica et Biophysica Acta* 840:409-417.
- Goksøyr A., Andersson T., Buhler D.R., Stegeman J.J., Williams D.E., and Förlin L. 1991. Immunochemical cross-reactivity of  $\beta$ -naphthoflavone inducible cytochrome P450 (P450IA) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiology and Biochemistry* 9 (1): 1-13.
- Goksøyr A. and Förlin L. 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22:287-312.
- Goksøyr A. and Husøy A.M. 1998. Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In: *Fish Ecotoxicology*, edited by Braunbeck T., Hinton D.E., and Streit B., Basel: Birkhauser Verlag, p. 165-202.
- Goksøyr A., Solberg T.S., and Serigstad B. 1991. Immunochemical detection of cytochrome P4501A1 induction in cod larvae and juveniles exposed to a water-soluble fraction of north sea crude oil. *Marine Pollution Bulletin* 22 (3): 122-127.
- Gonzalez F.J. 1993. Cytochrome P450 Evolution and Nomenclature. In: *Cytochrome P450*, edited by Schenkman J.B. and Greim H., Berlin: Springer-Verlag, p. 211-219.
- Gooch J.W., Elskus A.A., Kloepper-Sams P.J., Hahn M.E., and Stegeman J.J. 1989. Effect of *ortho* and non-*ortho* substituted polychlorinated biphenyl congeners on the hepatic monooxygenase system in scup (*Stenotomus chrysops*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 98: 422-433.
- Gordeziani M., Khatisashvili G., Ananiashvili T., Varazashvili T., Kurashvili M., Kvesitadze G., and Tkheldze P. 1999. Energetic significance of plant monooxygenase individual components participating in xenobiotics degradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44: 49-54.
- Groves J.T. and Han Y.Z. 1995. Models and mechanism of cytochrome P450 action. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, edited by Ortiz de Montellano P.R., New York: Plenum Press. p. 3-48.
- Gruber S.J. and Munn M.D. 1998. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 391-396.

- Guengerich F.P. and Shimada T. 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research Toxicology* 4 (4): 391-407.
- Haasch M.L., Henderson M.C., and Buhler D.R. 1998. Induction of CYP2M1 and CYP2K1 lauric acid hydroxylase activities by peroxisome proliferating agents in certain fish species: possible implications. *Marine Environmental Research* 46 (1-5): 37-40.
- Haasch M.L., Quardokus E.M., Sutherland L.A, Goodrich M.S., and Lech J.J. 1993. Hepatic CYP1A1 induction in Rainbow Trout by continuous flow-through exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. *Fundamental and Applied Toxicology* 20:72-82.
- Haasch M.L., Sutherland L.A, Wejksnora P.J., and Lech J.J. 1992. Effect of acrylamide monomer on hepatic CYP1A1 monooxygenase induction in rainbow trout. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 102: 281-286.
- Habig C., Digiulio R.T., Nomier A.A., and Abou-Donia M.B. 1986. Comparative toxicity, cholinergic effects and tissue levels of S.S.S. -trin-butyl phosphorotrithioate (DEF) to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*). *Aquatic Toxicology* 9: 193-206.
- Hahn M.E. 1998. The aryl hydrocarbon receptor: A compressive perspective. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 121:23-53.
- Hahn M.E., Lamb T.M., Schultz M.E., Smolowitz R.M., and Stegeman J.J. 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4' tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology* 26: 185-208.
- Hanioka N., Omae E., Yoda R., Jihno H., Nishimura T., and Ando M. 1997. Effect of trichloroethylene on cytochrome P450 enzymes in the rat liver. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58:628-635.
- Hasan M.R. and Macintosh D.J. 1986. Acute toxicity of ammonia to common carp fry. *Aquaculture* 54: 97-107.
- Hellawell J.M. 1986. *Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management*, London: Elsevier.
- Hielmann L.J., Sheen Y.Y., Bigelow S.W., and Nebert D.W. 1988. The trout P4501A gene: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance. *DNA* 7:379-387.
- Honkakoski P. and Negishi M. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal* 347: 321-337.



- Insard P. 1998. Assessing the environmental impact of wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:88-93.
- Intharapanith S., Miranda C.L., Henderson M.C., and Buhler D.R. 1996. Effect of xenoestrogen exposure on the expression of cytochrome P450 isoforms in rainbow trout liver. *The Toxicologist* 30: 276.
- Ionnides C. and Parke D.V. 1993. Induction of cytochrome P4501A as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews* 25 (4): 485-501.
- James M.O. 1987. Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environmental Health Perspectives* 71: 97-103.
- Jokanovic M. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166:139-160.
- Juntunen J. 1986. Occupational toxicology of trichloroethylene with special reference to neurotoxicity. In: *New Concepts and Developments in Toxicology*, edited by Chalmers P.L., Gehring P., and Sakai F., Amsterdam: Elsevier, p. 189-200.
- Kaplan L.A.E., Fielding E., and Crivello J.F. 1999. Genetic regulation of liver microsomal CYP2E1 activity among strains of the viviparous fishes *Poeciliopsis occidenantalis* and *Poeciliopsis lucida*. *Environmental Biology of Fishes* 54:337-343.
- Kaplan L.A.E., Schultz M.E., Schultz R.J., and Crivello J.F. 1991. Nitrosodiethylamine metabolism in the viviparous *Poeciliopsis*: evidence for the existence of liver P450pj activity and expression. *Carcinogenesis* 12 (4): 647-652.
- Keizer J., D'Agostino G., Nagel R., Volpe T., Gnemi P., and Vittozzi L. 1995. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *The Science of the Total Environment* 171:213-220.
- Kleinow K.M., Melancon M.J., and Lech J.J. 1987. Biotransformation and induction: Implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspective*. 71:105-119.
- Kloepper-Sams P.J. and Benton E. 1994. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. Induction of hepatic cytochrome p4501A in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) and other species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13 (9): 1483-1496.
- Kloepper-Sams P.J., Park S.S., Gelboin H.V., and Stegeman J.J. 1987. Specificity and cross-reactivity of monoclonal and polyclonal antibodies against cytochrome p450E of the marine fish scup. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 253 (1): 268-278.

- Kloepper-Sams P.J. and Stegeman J.J. 1989. The temporal relationship between cytochrome P450E protein content, catalytic activity and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with  $\beta$ -naphthoflavone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **268**: 525-535.
- Klotz A.V., Stegeman J.J., and Walsh C. 1983. An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **226**: 578-592.
- Klotz A.V., Stegeman J.J., Woodin B.R., Snowberger E.A., Thomas P.E., and Walsh C. 1986. Cytochrome P450 isozymes from the marine teleost *Stenotomus chrysops*: their roles in steroid hydroxylation and the influence of cytochrome b<sub>5</sub>. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **249** (2): 326-338.
- Klotz U. and Ammon E. 1998. Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *European Journal of Clinical Pharmacology* **54**:7-12.
- Koelle G.B. 1994. Pharmacology of organophosphates. *Journal of Applied Toxicology* **14** (2): 105-109.
- Koop D.R. 1992. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1. *FASEB Journal* **6**:724-730.
- Koop D.R., Crump B.L., Nordblom G.D., and Coon M. Immunochemical evidence for induction of the alcohol oxidizing cytochrome P450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid. *Proceeding of National Academic Science of United State of America* **82**: 4045-4069, 1985.
- Kosmala A., Migeon B., Flammarion P., and Garric J. 1998. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the fish biomarker Etoxyresorufin-O-deethylase: field and on site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **41**:19-28.
- Kuhr R.J. and Dorough H.W. 1976. *Carbamate Insecticides: Chemistry, biochemistry, and toxicology*, Cleveland, Ohio, U.S.A.:CRC press, Inc.
- Kyrklund T. and Haglid K. 1990. Brain lipid changes after organic solvent exposure. *Ups.J.Med. Sci.Suppl.* **48**: 267-277.
- Leaver M.J. and George S.G. 2000. A cytochrome P4501B gene from a fish, *Pleuronectes platessa*. *Gene* **256**: 83-91.
- Lee S.J., Wang J.L., Cok I., Yu T.S., Yang Y.H., Miranda C.L., Lech J.J., and Buhler D.R. 1998. Cloning, sequencing, and tissue expression of CYP3A27, a new member of the CYP3A subfamily from embryonic and adult trout liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360** (1): 53-61.

- Legay C. 2000. Why so many forms of acetylcholinesterase? *Microscopy Research and Technique* 49: 56-72.
- Lemaire P., Mathieu A., Giudicelli J., and Lafaurie M. 1992. Effect of diet on the responses of hepatic biotransformation enzymes to benzo[a]pyrene in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 102 (3): 413-420.
- Levine S.L. and Oris J.T. 1999. Enhancement of acute parathion toxicity to fathead minnows following pre-exposure to propiconazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 65:102-109.
- Lieber C.S. 1997. Cytochrome P4502E1: its physiological and pathological role. *Physiological Reviews* 77 (2): 517-536.
- Lily P.D, Thornton-Manning J.R., Gargas M.L., Clewell H.J., and Anderson M.E. 1998. Kinetic characterization of CYP2E1 inhibition in vivo and in vitro by the chloroethylenes. *Archives Toxicology* 72:609-621.
- Livingstone D.R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry Physiology Part A* 120:43-49.
- Livingstone D.R., Förlin L., and George S. 1994. Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. In: *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater System: Linking Levels of Organization*, edited by Sutcliffe D.W., Ambleside, UK: Titus Kendal R Son, p. 154-171.
- Lucas D., Menez C., Girre C., Berthou F., Bodenez P., Joannet L., Hispard E., Bardou L.G., and Menez J.F. 1995. Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* 5:298-304.
- Machala M., Nezveda K., Petrivalsky M., Jarosova A., Piacka V., and Svobodova Z. 1997. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquatic Toxicology* 37:113-123.
- Maekinen E., Korpela M., and Taehiti H. 1988. Changed in trichloroethylene treated rat erythrocyte membranes in vitro. *Drug Chemistry of Toxicology* 11 (1): 1-10.
- Mansuy D. 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 121:5-14.
- Mansuy D. and Renaud J.P. 1995. Heme-thiolate proteins different from cytochrome P450 catalyzing monooxygenations. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, edited by Ortiz de Montellano P.R., New York: Plenum Press, p. 537-574.

- Marionnet D., Taysse L., Chambers C., and Deschaux P. 1997. 3-Methylcholanthrene induced EROD activity and cytochrome P450 in immune organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 118:165-170.
- Massoulie J. and Bon S. 1992. The molecular forms of cholinesterase in vertebrates. *Annual Review of Neuroscience* 5: 57-106.
- Massoulie J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., and Vallette F.M. 1993a. Molecular and cellular biology of cholinesterase. *Progress in Neurobiology* 41: 39-91.
- Massoulie J., Sussman J.L., Bon S., and Silman I. 1993b. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Progress in Brain Research* 98: 139-146.
- McCarthy J.F. and Shugart L.S. 1990. *Biomarkers of Environmental Contamination*, Boca Raton, Florida: Lewis Publishing, page 457.
- McDowall R.M. 1988. *Diadromy in Fishes. Migration between freshwater and Marine Environments*, London: Croom Helm, page 308.
- Mileson B.E., Chambers J.E., Chen W.L., Dettbarn W., Ehrich M., Eldefrawi A.T., Gaylor D.W., Hamernik K., Hodgson E., Karczmar A.G., Padilla S., Pope C.N., Richardson R.J., Saunders D.R., Sheets L.P., Sultatos L.G., and Wallace K.B. 1998. Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. *Toxicological Sciences* 41: 8-20.
- Miller R.E. and Guengerich F.P. 1983. Metabolism of trichloroethylene in isolated hepatocytes, microsomes, and reconstituted enzymes systems containing cytochrome P450. *Cancer Research* 43: 1145-1152.
- Miller E.C. and Miller J.A. 1981. Mechanism of chemical carcinogenesis. *Cancer* 47 (5): 1055-1064.
- Miranda C.L., Henderson M.C., and Buhler D.R. 1998. Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s. *Toxicology and Applied Pharmacology* 148: 237-244.
- Miranda C.L., Wang J.L., Henderson M.C., and Buhler D.R. 1989. Purification and characterization of hepatic steroid hydroxylases from untreated rainbow trout. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 268: 227-238.
- Miranda C.L., Wang J.L., Henderson M.C., and Buhler D.R. 1990. Immunological characterization of constitutive isozymes of cytochrome P450 from rainbow trout. Evidence for homology with phenobarbital induced rat P450s. *Biochimica et Biophysica Acta* 1037:155-160.
- Monosson E. and Stegeman J.J. 1994. Induced cytochrome P4501A in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, from offshore and coastal sites. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 51:933-941.

- Morcillo Y. and Porte C. 1997. Interaction of tributyl and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquatic Toxicology* **38**:35-46.
- Morrison H.G., Oleksiak M.F., Cornell N.W., Sogin M.L., and Stegeman J.J. 1995. Identification of cytochrome P4501A genes from two teleost fish, toadfish (*Opsanus tau*) and scup (*Stenotomus chrysops*), and phylogenetic analysis of CYP1A genes. *Biochemical Journal* **308**: 97-104.
- Moura I.M. and Gordo L.S. 2000. Abundance, age, growth and reproduction of grey mullets in O'bidos lagoon, Portugal. *Bulletin of Marine Science* **67** (2): 677-686.
- Mutch E., Blain P.G., and Williams F.M. 1999. The role of metabolism in determining susceptibility to parathion toxicity in man. *Toxicology Letters* **107**:177-187.
- Nakajima T., Wang R.S., Murayama N., and Sato A. 1990. Three forms of trichloroethylene metabolizing enzymes in rat liver induced by ethanol, phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Toxicology and Applied Pharmacology* **102**: 546-552.
- Nakajima T., Wang R.S., Elovaara E., Park S.S., Gelboin H.V., and Vainio H. 1993. Cytochrome P450 related differences between rat and mice in the metabolism of benzene, toluene, and trichloroethylene in liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **45**: 1079-1085,
- National Cancer Institute. 1976. Carcinogenesis bioassay of trichloroethylene (CAS No. 79-01-6). Washington DC, USA.
- Navas J.M. and Senger H. 2000. Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Marine Environmental Research* **50**:157-162.
- Nebert D.W. and Gonzales F.J. 1987. P450 genes; structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* **56**:945-993.
- Nebert D.W., Nelson D.R., and Feyereisen R. 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* **19** (10): 1149-1160.
- Nelson D.R. 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* **121**:15-22.
- Nelson D.R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369** (1): 1-10.
- Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Gonzales F.J., Coon M.J., Gotoh O., Okuda K., and Nebert D.W. 1993. The P450 superfamily - Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* **12**:1-51.

- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonsalus I.C., and Nebert D.W. 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-41.
- Nelson D.R. and Strobel H.W. 1987. Evolution of cytochrome P450 proteins. *Molecular Biology Evolution* 4 (6): 572-593.
- Nemcsok J., Rakonezay Z., Kasa P., Asztalos B., and Szabo A. 1990. Effects of methidathion on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in carp as revealed by density gradient centrifugation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 37: 140-144.
- Newman M.C. 1998. *Fundamentals of Ecotoxicology*, Chelsea, U.S.: Ann Arbor Press, 402 pages.
- Nguyen D.K., Bruchet A., and Arpino P. 1994. High-resolution capillary GC-MS analysis of low molecular weight organic compounds in municipal wastewater. *Journal of High Resolution Chromatography* 17: 153-159.
- O'Brien R.D. 1976. Acetylcholinesterase and its inhibition. In: *Insecticide Biochemistry and Physiology*, edited by O'Brien R.D., New York: Academic press, p. 271-296.
- Okita R.T. and Siler-Masters B.S. 1997. Biotransformations: The Cytochromes P450. In: *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, edited by Devlin T.M., New York, US: Wiley-Liss publication, p. 981-999.
- Oleksiak M.F., Wu S., Zeldin D.C., and Stegeman J.J. 1997. Characterization of members of the novel cytochrome P450 subfamilies CYP2N and CYP2P from the fish *Fundulus heteroclitus*. 9th International Symposium on Response of Marine Organisms to Pollutants Bergen, Norway: (Abstract).
- Oleksiak M.F., Wu S.M., Parker C., Karchner S.I., Stegeman J.J., and Zelden D.C. 2000. Identification, functional characterization and regulation of a new cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ns. *Journal of Biochemical Chemistry* 275 (4): 2312-2321.
- Omura T. and Sato R. 1964. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *Journal of Biochemical Chemistry* 239:2370-2378.
- Ortiz de Montellano P.R. 1995. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and biochemistry*, New York: Plenum Press.
- Park S.S., Miller H., Klotz A.V., Kloepper-Sams P.J., Stegeman J.J., and Gelboin H.V. 1986. Monoclonal antibodies to liver microsomal cytochrome P450E of the marine fish *Stenotomus chrysops* (scup): Cross reactivity with 3-methylcholanthrene induced rat cytochrome P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 249 (2): 339-350.
- Pathiratne A. and George S. 1996. Comparison of xenobiotics metabolizing enzymes of tilapia with those of other fish species and interspecies relationships between gene families. *Marine Environmental Research* 42 (1-4): 293-296.

- Pathiratne A. and George S.G. 1998. Toxicity of malathion to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. *Aquatic Toxicology* **43**:261-271.
- Payne J.F., Fancey L., Rahimtula A., and Porter E. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* **86**:233-245.
- Pearce R.E., Mclntyre C.J., Madan A., Sanzgiri U., Draper A.J., Bullock P.L., Cook D.C., Burton L.A., Latham J., Nevins C., and Parkinson A. 1996. Effect of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **331** (2): 145-169.
- Pessayre D., Allemand H., Wandscheer J.C., Descatorre V., Artigon J.V., and Benhamon J.P. 1979. Inhibition, activation, destruction, and induction of drug metabolizing enzymes by trichloroethylene. *Toxicology and Applied Pharmacology* **49**: 335-363.
- Petrasek A.C., Kugelman I.J., Austern B.M., Pressley T.A., Winslow L.A., and Wise R.H. 1983. Fate of toxic organic compounds in wastewater treatment plants. *Journal of Water Pollution Control Federation* **55**:1286-1296.
- Pessayre D., Allemand H., Wandscheer J.C., Descatorre V., Artigon J.V., and Benhamon J.P. 1979. Inhibition, activation, destruction, and induction of drug metabolizing enzymes by trichloroethylene. *Toxicology and Applied Pharmacology* **49**: 335-363.
- Piegorsch W. and Bailer J. 1997. *Statistical for environmental biology and toxicology*, London: Chapman and Hall. 579 pages.
- Plunkett E.R. 1976. *Handbook of Industrial Toxicology*, New York: Chemical Publishing Co., Inc.
- Porte C. and Albaig'es J. 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in Bivalves, Crustaceans, and Fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**:273-281.
- Quinn D.M. 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Review* **87**:955-979.
- Redner B.D. and Stickney R.R. 1979. Acclimation to ammonia by *Tilapia aurea*. *Trans. American Fish Society* **108**: 383-388.
- Richter E.D. and Safi J. 1997. Pesticide use, exposure, and risk: a joint Israeli-Palestinian perspective. *Environmental Research* **73**: 211-218.

- Risso F.C., Lafaurie M., Girard J.P., and Rahmani R. 2000. Effects of heavy metals and 3-methylcholanthrene on expression and induction of CYP1A1 and metallothionein levels in trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocyte cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19** (9): 2239-2248.
- Rosenberry T.L., Mallender W.D., Thomas P.J., and Szegletes T. 1999. A steric blockade model for inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands and substrate. *Chemico Biological Interactions* **119-120**:89-95.
- Safe S. 1998. Hazard and risk assessments of chemical mixtures using the toxic equivalently factor approach. *Environmental Health Perspectives* **106**: 1051-1058.
- Sakai N., Tanaka M., Adachi S., Miller W.L., and Nagahama Y. 1992. Rainbow trout cytochrome P450c17 (17 $\alpha$  hydroxylase/ 17,20 lyase). cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P450c17 mRNA expression during oogenesis. *FASEB Letters* **301**: 60-64.
- Sancho E., Fernandez-Vega C., Sanchez M., Ferrando M.D., and Andreu-Moliner E. 2000. Alterations on AChE activity on the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide contaminated water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **46**:57-63.
- Sarasquete C. and Senger H. 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *The Science of the Total Environment* **247**:313-332.
- Sarbadhikary A. and Sur R.K. 1992. Effect of short duration exposure to methyl parathion followed by recovery of activities of some enzymes of the fish *Oreochromis niloticus* (Smith). *Environmental Ecology* **10** (2): 333-340.
- Schenkman J.B. 1993. Historical Background and Description of the Cytochrome P450 Monooxygenase System. In: *Cytochrome P450*, edited by Schenkman J.B. and Greim H., Berlin: Springer-Verlag, p. 3-13.
- Schlezing J.J. and Stegeman J.J. 2001. Induction and suppression of cytochrome P4501A by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl and its relationship to oxidative stress in the marine fish scup (*Stenotomus chrysops*). *Aquatic Toxicology* **52**: 101-115.
- Sen A. and Arinc E. 1998. Preparation of highly purified cytochrome P4501A1 from leaping mullet (*Liza saliens*) liver microsomes and its biocatalytic, molecular and immunochemical properties. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* **121**:249-265.
- Sen A. and Arinc E. 2000. Further immunochemical and biocatalytic characterization of CYP1A1 from feral leaping mullet liver (*Liza saliens*) microsomes. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* **126**:235-244.
- Shapiro J. 1998. Food of the thin lipped grey mullet (*Liza ramada*) in lake Kinneret, Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* **50** (1): 3-11.



- Sharma B., Gopal K., and Khanna Y.P. 1993. Interaction of carbaryl with acetylcholinesterase of the teleost, *Clarias batrachus*. *Toxicology of Environment Chemistry* 39 (3-4): 147-152.
- Sidell F.R. 1994. Clinical effect of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Journal of Applied Toxicology* 14 (2): 111-113.
- Sholsberg A., Mineau P., Duffe J., Hooper M.J., Eason C.T., Murphy E.C., Wright G.R.G., Spurr E.B., Snow T., and Verdoon G. 2001. The risk of toxicoses from pesticides and pollutants in raptors and wildlife in Israel - the present situation and recommendations for the future. Sholsberg A. and Bahat O. Tel Aviv, Israel: Society for the Protection of Nature in Israel. 1-120.
- Silman I. and Futerman A.H. 1987. Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *European Journal of Biochemistry* 170: 11-22.
- Silman I., Millard C.B., Ordentlich A., Greenblat H.M., Harel M., Barak D., Shafferman A., and Sussman J.L. 1999. A preliminary comparison of structural models for catalytic intermediates of acetylcholinesterase. *Chemico Biological Interactions* 119-120:43-52.
- Sleiderink H.M., Oostingh I., Goksoyr A., and Boon J.P. 1995. Sensitivity of cytochrome P4501A induction in dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the southern North sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28 (4): 423-430.
- Snowberger Gray E., Woodin B.R., and Stegeman J.J. 1991. Sex differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. *The Journal of Experimental Zoology* 259: 330-342.
- Sogawa K. and Fujii-Kuriyama Y. 1993. Regulation of Cytochrome P450 Expression. In: *Cytochrome P450*, edited by Schenkman J.B. and Greim H., Berlin: Springer-Verlag, p. 493-501.
- Sokal R.R. and Rohlf F.G. 1995. *Biometry*, London: Freeman.
- Sole M., Porte C., and Barcelo D. 2000. Vitellogenin induction and other biochemical response in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38:494-500.
- Song B.J., Matsunga T., Hardwick J.P., Park S.S., Veech R.L., Yang C.S., Gelboin H.V., and Gonzales F.J. 1987. Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Molecular Endocrinology* 8: 542-547.

- Song B.J., Veech R.L., Park S.S., Gelboin H.V., and Gonzalez F.J. 1989. Induction of rat hepatic *N*-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *Journal of Biochemical Chemistry* 264: 3568-3572.
- Stegeman J.J. 1989. Cytochrome P450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica* 19 (10): 1093-1110.
- Stegeman J.J. 1993. Cytochrome P450 forms in fish. In: Handbook of experimental pharmacology, edited by Schenkman J.B. and Greim H., Berlin: Springer-Verlag, p. 279-291.
- Stegeman J.J. 2000. Cytochrome P450 gene diversity and function in marine animals: past, present, and future. *Marine Environmental Research* 50:61-62. (Abstract).
- Stegeman J.J. and Hahn M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: *Aquatic Toxicology: Cellular, Molecular and Biochemistry Perspectives*, edited by Malins D.C. and Ostrander G.K., Boca Raton: Lewis Publisher, p. 87-204.
- Stegeman J.J. and Kloepper-Sams P.J. 1987. Cytochrome P450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives* 71: 87-95.
- Stegeman J.J. and Lech J.J. 1991. Cytochrome P450 monooxygenase system in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarker for carcinogen and pollutant exposure. *Environmental Health Perspectives* 90:101-109.
- Stegeman J.J. and Livingstone D.R. 1998. Forms and functions of cytochromes P450. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 121:1-3.
- Stegeman J.J., Smolowitz R.M., and Hahn M.E. 1991. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P4501A1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (scup). *Toxicology and Applied Pharmacology* 110:486-504.
- Stegeman J.J., Woodin B.R., Singh H., Oleksiak M.F, and Celander M. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 116 (1): 61-75.
- Straus D.L. and Chambers J.E. 1995. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S,S,S, tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquatic Toxicology* 33: 311-324.
- Sultana R. and Rao D.P. 1998. Bioaccumulation patterns of zinc, copper, lead, and cadmium in gray mullet, *Mugil cephalus* (L.), from harbor water of Visakhapatnam, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60:949-955.

- Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., and Silman I. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine binding protein. *Science* **253**: 872-879.
- Takahashi M., Tanaka M., Sakai N., Adachi S., Miller W.L., and Nagahama Y. 1993. Rainbow trout ovarian cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (P450scc). cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis. *FASEB Letters* **319**: 45-48.
- Tanaka M., Telecky T.M., Fukada S., Adachi S., Chen S., and Nagahama Y. 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) ovary, relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17-beta in the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* **8**:53-61.
- Taysse L., Chambras D., Marionnet C., Bosgiraud P., and Deschaux P. 1998. Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **60**:300-305.
- Tsutsumi M., Lasker J.M., Takahashi T, and Lieber C.S. 1993. *In vivo* induction of hepatic P450E1 by ethanol: role of increased enzyme synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304** (1): 209-218.
- Ueng Y.F., Liu T.Y., and Ueng T.H. 1995. Induction of cytochrome P4501A1 and monooxygenase activity in tilapia by sediment extract. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **54**:60-67.
- Ueng Y.F., Liu C., Lai C.F., Meng L.M., Hung Y.Y., and Ueng T.H. 1996. Effects of Cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P450 in tilapia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **57**:125-131.
- Ueng Y.F. and Ueng T.H. 1995. Induction and purification of cytochrome P450 1A1 from 3-methylcholathrene treated tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **322** (2): 347-356.
- van der Weiden M.E.J., Celander M., Seinen W., Van Den Berg M., Goksøyr A., and Förlin L. 1993. Induction of cytochrome P4501A in fish treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or chemically contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**:989-999.
- van der Weiden M.E.J., Hanegraaf F.H.M., Eggens M.L., Celander M., Seinen W., and van den Berg M. 1994. Temporal induction of cytochrome P450 in the mirror carp (*Cyprinus carpio*) after administration of several polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13** (5): 797-802.
- Vittozzi L. and De Angelis G. 1991. A critical review of comparative acute toxicity data on fresh water fish. *Aquatic Toxicology* **19**: 167-204.

- Walker C.H. 1998. The use of biomarkers to measure the interactive effect of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:65-70.
- Wall K.L. and Crivello J.F. 1998. Chlorzoxazone metabolism by winter flounder liver microsomes: evidence for existence of a CYP2E1-like isoform in teleost. *Toxicology and Applied Pharmacology* 151:98-104.
- Wall K.L. and Crivello J.F. 1999. Effects of starvation on liver microsomal P450 activity in juvenile *Pleuronectes americanus*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 123:273-277.
- Wang R., Nakajima T., Tsuruta H., and Honma T. 1996. Effect of exposure to for organic solvents on hepatic cytochrome P450 isozymes in rat. *Chemico Biological Interactions* 99:239-252.
- Waxman D.J. 1999. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptor CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369 (1): 11-23.
- Weiss C.M. and Gakstater J.H. 1964. Detection of pesticides in water by biochemical assay. *Journal of WPCF* 36 (2): 240-252.
- White J.A., Gou Y.D., Batez K., Beckett-Jones B., Bonasoro J., Hsu K.E., Dilworth F.E, Jones G., and Petkovich M. 1996. Identification of the retinoic acid inducible all trans retinoic acid 4-hydroxylase. *Journal of Biochemical Chemistry* 271:29922-29927.
- White R.F., Feldman R.G., Eviator I.I., Jabre J.F., and Niles C.A. 1997. Hazardous waste and neurobehavioral effects: A developmental perspective. *Environmental Research* 73:113-124.
- Whitlock J.P. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39:103-125.
- Williams D.E. and Buhler D.R. 1982. Purification of cytochrome P448 from  $\beta$ -naphthoflavone treated rainbow trout. *Biochemical and Biophysical Acta* 717: 398-404.
- Williams D.E. and Buhler D.R. 1984. Benzo[a]pyrene hydroxylase catalyzed by purified isozymes of cytochrome P450 from  $\beta$ -naphthoflavone fed rainbow trout. *Biochemical Pharmacology* 33: 3743-3753.
- WHO (World Health Organization). 1985. Trichloroethylene. *Environmental Health Critical* 50: 133.
- Williams D.E., Lech J.J. and Buhler D.R. 1998. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis. *Mutation Research* 399:179-192.

- Winston G.W., Shane B.S., and Henry C.B. 1988. Hepatic monooxygenase induction and promutagen activation in channel catfish from a contaminated river basin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 16 (3): 258-271.
- Wong C.k.C., Yeung H.Y., Woo M.H., and Wong M.H. 2001. Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine and liver of tilapia exposed to coastal sediments. *Aquatic Toxicology* 54:69-80.
- Woodworth J.G., Munday B.L., and Campin D. 1998. Evaluation of biomarkers for exposure of fish to eucalypt based pulp mill effluent and for determination of routes of exposure. *Environmental Toxicology Water Quality* 13: 285-296.
- Yang Y.H., Wang J.L., Miranda C.L., and Buhler D.R. 1998. CYP2M1: cloning, sequencing, and expression of a new cytochrome P450 from rainbow trout liver with fatty acid (w-6) hydroxylation activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 352 (2): 271-280.
- Yawetz A., Benedek-Segal M., and Woodin B.R. 1997. Cytochrome P4501A immunoassay in freshwater turtles and exposure to PCBs and environmental pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (9): 1802-1806.
- Yawetz A., Goldman D., Stegeman J.J., and Woodin B.R. 1993a. The effect of PCB on the induction of cytochrome P450 enzyme, detected by monoclonal antibody against the P4501A1 gene products, in barl owl and marsh turtle hepatic microsomes. *Water Sciences Technology* 27 (7-8): 457-464.
- Yawetz A., Manelis R., and Gasith A. 1993b. Cholinesterase enzymatic profiles and the exposure of fish to organophosphorous and carbamate pesticides in Israel. *Water Technology* 27:465-472.
- Yawetz A., Zilberman B., Woodin B.R., and Stegeman J.J. 1998. Cytochrome P4501A, P4503A and P4502B in liver and heart of *Mugil capito* treated with CYP1A inducers. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6:13-25.
- Zapata-Perez O., Sima-Alvarez R., Norena-Barroso E., Gumes J., Gold-Bouchot G., Ortega A., and Albores-Medina A. 2000. Toxicity of sediments from Bah'ia de Cetumal, Mexico, as assessed by hepatic EROD induction and histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Environmental Research* 50:385-391.
- Zhou H.Y. and Wong M.H. 2000. Accumulation of sediment sorbed PCBs in tilapia. *Water Research* 34 (11): 2905-2914.

toxic hydrocarbons and is occasionally contaminated by pesticides. These findings are alarming, especially because the water sources of this reservoir are Rosh HaAyin Springs and the National Water Carrier's - two main sources of drinking water in Israel.

Tilapia exposed to water from the central section of the Yarqon river or to water from the Kfar Saba-Hod HaSharon wastewater treatment plant (WWTP), usually died within a few hours. Despite the short exposure time, a significant inhibition of AChE activity in the gills and brain could be detected in some individuals. This is an indication that the effluent of this WWTP contains insecticides residues, which can later reach the central section of the Yarqon river.

Tilapia were also kept for thirty days in a special device through which water continuously flowed, installed at the Ramat-HaSharon WWTP - a plant which constantly releases tertiary effluents to the Yarqon. These fish showed a 75% inhibition of the AChE activity in the gills ( $P < 0.01$ ), but not in the brain. The significant P4501A induction ( $P < 0.01$ ) in these fish, and in others exposed to water from the plant elsewhere, indicated the presence of toxic hydrocarbon compounds in the plant's discharge.

The "Seven Mills" dam marks the confluence of the polluted water of the Yarqon's central section and its salty lowermost section. Specimens from five different fish species were either caged in or caught at this site. All specimens showed a significant decrease of AChE activity in the gills and liver tissues. In the cichlid *Tilapia zillii*, for example, there was 82% in the gills and 94% in the liver. In three species captured at this site, *Sarotherodon galileus*, *Liza ramada* and *Cyprinus carpio* a dramatic induction of hepatic cytochrome P4501A was found, reaching 42 ( $P < 0.05$ ), 15 ( $P < 0.001$ ) and 13.5 ( $P < 0.001$ ) times the induction level of fish from reference sites, respectively. *Liza ramada* caught in the salty water near the river's estuary on two different occasions, had a cytochrome P4501A contents 12.5 and 19 times higher ( $P < 0.001$ ) than of mullet from a pond that served as a reference. The EROD activity in these fish was also considerably elevated ( $P < 0.001$ ).

Both P4501A induction and AChE activity inhibition in teleosts consistently indicated that the Yarqon's water contains toxic pollutants in amounts that do have importance. These biomarkers point to a chronic pollution of the river's central and salty sections by organophosphates and carbamats residues, and by toxic industrial waste. Wastewater treatment plants contribute to the pollution as well by discharging highly toxic compounds. The Rosh HaAyin reservoir contains chronic low level of

nitrosamines and industrial organic solvents. Hybrid tilapia were exposed to known mammalian P450E1 inducers – ethanol and trichloroethylene (TCE). All of the samples, including the control microsomes, cross-reacted with human P450E1 antibody, but without a significant difference between bands intensities. Induced P4501A proteins but not P450E-like proteins were detected in microsomes from livers of thin lip mullet (*Liza ramada*) and common carp (*Cyprinus carpio*) from the Yarqon and from hybrid tilapia treated with  $\beta$ -naphthoflavone. Thus, elevation in P4501A content may have caused a decrease in expression of other P450 proteins (e.g. P450E-like).

The neurotoxic industrial solvent TCE is a widely distributed water contaminant. A three days exposure of hybrid tilapia to a constant concentration of 5 ppm TCE caused syndromes of neurotoxicity and finally for the death of the fish. In this fish, a dramatic decrease of AChE activity was detected in the gills and brain tissues (99% and 67%, respectively). Similarly, a significant inhibition ( $P < 0.01$ ) was found in liver, gills and brain tissues (99%, 95% and 58% decrease, respectively) in other individuals, which were exposed to 0.1 ppm TCE. However, in kinetic *in vitro* experiments done with gills homogenate of hybrid tilapia, TCE was not found to be inhibitor of AChE.

At Rosh HaAyin, a freshwater reservoir near the Yarqon main water source, hybrid tilapia, caged *in situ*, showed a significant inhibition ( $P < 0.05$ ) of AChE activity in the brain and gills tissues, as compared with fish from the same batch of fish kept in uncontaminated water. The cytochrome P4501A contents and EROD activity of the caged fish were, respectively, 4.4 times ( $P < 0.05$ ) and 2.3 times ( $P < 0.05$ ) higher than those of the control. Similarly, tilapia reared in the laboratory, in water from this reservoir, showed a significant inhibition of the AChE activity in the brain, (40% decrease,  $P < 0.01$ ) and in the gills (30% decrease,  $P < 0.05$ ) as compared with the control. *Cyprinus carpio* caught in the Rosh HaAyin reservoir, which were compared with those caught in the upper section of the river. Correspondingly, the cytochrome P4501A contents and EROD activity were 6.2 ( $P < 0.05$ ) and 8 times ( $P < 0.001$ ) higher. These results point to substantial quality deterioration of the water in Rosh HaAyin reservoir. The results also show that at the upper section of the river, the water's quality was much higher, at least as far as hydrocarbon pollutants are concerned.



## Abstract

During the last decades, aquatic ecosystems have been contaminated with numerous types of new man made pollutants. The spread of toxic compounds in the environment endangers many species and threatens the whole ecosystem. In Israel, the rapid industrialization and urbanization, especially in the coastal plain, have accelerated the pollution of local streams. The largest of these, the Yarqon river, is located in the densest population center of the country and hence suffers the most. The water of its main springs has been diverted, and effluents from wastewater treatment plants, and agricultural and industrial pollutants from around its basin, are continuously being discharged into it.

The effect of toxic pollutants on the deterioration of the quality of Yarqon water was monitored using two biomarkers in teleosts: the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills, brain, and liver tissues, and the induction of hepatic cytochrome P4501A and its typical catalytic activity, EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase). The first is a measure of exposure to organophosphate and carbamate pesticides. The second is a hemoprotein which is synthesized *de novo* in a response to exposure to toxic and carcinogenic environmental contaminants like polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). Water or local fish species were taken for evaluation from representative sampling sites along the river and its water resources. Groups of fish were introduced to these waters in various ways and then analyzed for the exposure's effect on these parameters. The results were compared with those obtained from reference sites or control groups.

Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) obtained from local commercial rearing ponds, were injected intraperitoneally (i.p.) with various doses of  $\beta$ -naphthoflavone, a known P4501A inducer. The hepatic P4501A contents and EROD activity were induced with dose dependency ( $r^2=0.65$ ,  $P<0.001$ ). These parameters were also correlated significantly ( $r^2=0.76$ ,  $P<0.001$ ).

In the present study, the detection of P4502E-like enzymes was examined as novel biomarker for water pollution with toxic and carcinogenic xenobiotics, like

**TEL-AVIV UNIVERSITY  
GEORGE S. WISE FACULTY OF LIFE SCIENCES  
GRADUATE SCHOOL**

**INDUCTION OF CYTOCHROMES P4501A AND  
P4502E-LIKE AND ACETYLCHOLINESTERASE  
ACTIVITY IN TELEOST AS BIOMARKERS FOR  
MONITORING POLLUTION IN YARQON RIVER**

Thesis submitted towards the M.Sc. degree in Ecology and Environmental  
Quality at Tel-Aviv University

By

Ori Palevitch

The research was performed in the Department of Zoology  
Institute for Nature Conservation Research

Under the supervision of

Dr. Aminadav Yawetz

March 2002

**TEL-AVIV UNIVERSITY  
GEORGE S. WISE FACULTY OF LIFE SCIENCES  
GRADUATE SCHOOL**

**INDUCTION OF CYTOCHROMES P4501A AND  
P4502E-LIKE AND ACETYLCHOLINESTERASE  
ACTIVITY IN TELEOST AS BIOMARKERS FOR  
MONITORING POLLUTION IN YARQON RIVER**

**Thesis submitted towards the M.Sc. degree in Ecology and Environmental  
Quality at Tel-Aviv University**

**By**

**Ori Palevitch**

**The research was performed in the Department of Zoology  
Institute for Nature Conservation Research**

**Under the supervision of**

**Dr. Aminadav Yawetz**

**March 2002**