

דו"ח מדעי שנתי לזקופה 7/1999 - 7/1998,
הוענין המשך, ודרישת תקציב להמשך המחקר בשנה השניה:
7/1999-7/2000
מוגש ללשכת המדען הראשי, המשרד לאיכות הסביבה, מדינת ישראל
במחקר:

ניטור זיהום מי הירקון בשאריות קוטלי חרקים
זרחנאורגניים, קרבמטים, ופסולת תעשייתית רעילה
בעזרת הביומרקרים: פרופיל אצטילכולינאסטרז
וציטוכרום P450A בדגגי גרם

שנת מחקר ראשונה מתוך שתי שנות מחקר

מוגש ע"י

ד"ר עמינדב יעבץ, חוקר ראשי

ומר רמי מנליס, תלמיד לתואר שלישי

המכון לחקר שמירת הטבע, הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת ת"א



60513884

**דו"ח מדעי שנתי לתקופה 7/1998 - 7/1999,
תוכנית המשך, ודרישת תקציב להמשך המחקר בשנה השניה :**
7/1999-7/2000
מוגש ללשכת המדען הראשי, המשרד לאיכות הסביבה, מדינת ישראל
במחקר:

**ניטור זיהום מי הירקון בשאריות קוטלי חרקים
זרחנאורגניים, קרבמטים, ופסולת תעשייתית רעילה
בעזרת הביומרקרים: פרופיל אצטילכולינאסטרז
וציטוכרום P4501A בדגי גרם**

שנת מחקר ראשונה מתוך שתי שנות מחקר

מוגש ע"י

ד"ר עמינדב יעבץ, חוקר ראשי

המכון לחקר שמירת הטבע, הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת תל
אביב, תל אביב 69978. טל. 03-6408004, פקס. 03-6407304,
E-mail: amidav@post.tau.ac.il

ומר רמי מנליס, תלמיד לתואר שלישי



חתימת החוקר הראשי:

12/8/1999

תאריך:

המכון לחקר שמירת הטבע, הפקולטה למדעי החיים, אוניברסיטת ת"א

האנזים אצטילכולינאסטרז

בעלי-החיים מגיבים לסביבתם החיצונית והפנימית, בין היתר באמצעות מערכת העצבים. מערכת זו אחראית לביצוע פעולות גוף רצוניות ולא רצוניות, באמצעות מסרים היוצאים ממרכזים שונים במוח. מסרים אלה מולכים לאורך תא עצב בצורה של דחפים חשמליים. אולם, בין תא עצב אחד למשנהו, או בין תא עצב לתא שריר או לבלוטה שאותם הוא מעצבב, קיים מרווח סינפטי שאינו מאפשר לדחף החשמלי לעבור אלא באמצעות טרנסמיטור.

סינפסות שבהן הטרנסמיטור הוא אצטילכולין (ACh) קרויות סינפסות כולינרגיות. תא עצב המעביר דחפים חשמליים לכיוון הסינפסה, קרוי תא עצב קדם סינפטי, תא עצב המעביר דחפים מהסינפסה והלאה קרוי תא עצב אחר סינפטי. הדחף החשמלי המגיע לקצה תא העצב הקדם סינפטי גורם לשחרור הטרנסמיטור אל תוך המרווח הסינפטי. מיד לאחר הפעלת האתר האחר סינפטי מפורק הטרנסמיטור על-ידי האנזים אצטילכולינאסטרז (AChE).

אצטילכולין הוא נאורוטרנסמיטור שגורם לשינוי בחדירות קרום העצב הפוסט סינפטי ליוני נתרן ואשלגן. כל זמן שהאצטילכולין נשאר באזור השקע הסינפטי, כשהוא קשור לרצפטורים בממברנה הפוסט סינפטית אין ממברנה זו יכולה לחזור למצב המנוחה שלה, ולהיות מוכנה להעביר שדר נוסף, ולכן עיכוב האנזים אצטילכולינאסטרז גורם להפרעה בתפקוד העצבי עד כדי גרימת מוות. האנזים אצטילכולינאסטרז אחראי לאינאקטיבציה מהירה של מעבר המסר במערכת כולינרגית. אנזים זה הוא בעל אפיניות רבה לאצטילכולין.

אצטילכולין הוא המתווך העצבי בסינפסות כולינרגיות כגון: הסינפסות של מערכת העצבים האוטונומית ובחיבורי עצב-שריר של העצבים המוטוריים. הוא נאגר בשלפוחיות בקצה הפרה סינפטי. בכל שלפוחית יש מנה קבועה של מולקולות אצטילכולין כ- 2,000 מולקולות. הנאורוטרנסמיטור נוצר ונאגר בקצוות עצבים מוטוריים. האימפולסים העצביים העוברים באקסון הסימפטי, בקצה הפרה סינפטי, הם שגורמים לשחרור אצטילכולין.

בנוסף, יוני סידן (Ca^{2+}), חופשיים גורמים לשפיכת אצטילכולין לשקע הסינפטי. ישנו מנגנון המווסת את רמת יוני הסידן החופשיים בסיב העצב. הוספת יוני מגנזיום (Mg^{2+}) מקטינה את שחרורו של האצטילכולין. אצטילכולין גורם לאחר קישור לרצפטור ממברנלי לשינוי בחדירות קרום הסיב הפוסט סינפטי ליוני נתרן ואשלגן. הפיכת ממברנת העצב לחדירה למעבר יונים אלו, גורמת לדפולריזציה של הממברנה הפוסט סינפטית ולהמשך העברת השדר העצבי.

אצטילכולינאסטרז מאופיין בפעילות ספציפית גבוהה ובמהירות פעולה מהגבוהות בטבע. האנזים מופיע ברקמות שונות ובאורגניזמים שונים החל מחסרי חוליות ועד חולייתיים גבוהים כולל האדם. האנזים הוא פולימורפי ויש לו שתי צורות, צורה אסימטרית וצורה גלובולרית.

הצורה האסימטרית מורכבת משלושה זנבות קולגניים באורך של 500nm המחוברים בניהם בקשרי S-S. בראש כל זנב נמצאות 4 יחידות קטליטיות. מספר הזנבות בעלי היחידות הקטליטיות נע מאחד עד שלוש והם מכונים: A_{12} , A_8 , A_4 . הצורה האסימטרית מצוייה בעיקר בדגי חשמל אך גם בעופות. חלוקת הצורות השונות של הצורה האסימטרית משתנה בהתאם לצורכי הגוף. לדוגמה A_{12} מצוי בשריר fast-twitch של התרנגול מאחר ויש צורך בשינוי תנועה פתאומי כתוצאה מסיגנלים הפוכים הבאים במהירות האחד אחר השני, חייב להיות פירוק מהיר של האות העצבי של התנועה הקודמת דבר המצריך מעורבות של הרבה יחידות קטליטיות. הקשר בין הצורה האסימטרית לממברנה הינו על בסיס חשמלי ולכן המסת הצורה האסימטרית מהממברנה יכולה להיעשות ע"י מלח בתהליך של salting

out ולא ע"י דטרונט. הקשר לממברנה מתווך ע"י קלציום ולכן תוספת EDTA תגרום לשחרור הצורה האסימטרית של האנזים מהממברנה.

הצורה הגלובולרית היא membrane anchored form, כלומר מעוגנת באופן אינטגרלי בממברנה וניתן לשחררה מהממברנה ע"י סולוביליזציה בעזרת דטרונט המפרק את הממברנה. הצורה הגלובולרית מורכבת מ-1, 2, או 4 יחידות קטליטיות הקשורות זו לזו בעזרת קשרי דיסולפיד המכונות G_1 , G_2 ו- G_4 . האזור הממברנלי של הצורה הגלובולרית של האנזים לא מכיל חומצות אמינו הידרופוביות. האנזים נקשר לממברנה בקשר קוולנטי דרך הקצה ה-C-terminal לאתנולאמין שנקשר לאוליגוגליקן שמתחבר לגלוקוזאמין. הגלוקוזאמין נקשר בקשר גליקוזידי לפוספוליפיד פוספטידיל אינוזיטול שהוא מרכיב אינטגרלי של הממברנה. ניתן לכן להפריד את האנזים מהממברנה ע"י שימוש באנזים פוספוליפז C החותך בין הפוספטידיל אינוזיטול ביס פוספט לגלוקוזאמין.

הפעילות הקטליטית של אצטילכולינאסטרז

האנזים אצטילכולינאסטרז שבקצה העצב הפוסט סינפטי מקטלו את ההידרוליזה של האצטילכולין. האצטילכולינאסטרז מפרק את האצטילכולין לאצטיל ולכולין, במטרה למנוע עירור בלתי פוסק של הסיב הפוסט סינפטי. עירור נמשך של מערכת העצבים נגרם ע"י אינסקטיצידיים אורגנוזרחניים וקרובמטים. כתוצאה מכך חל שיתוק של מערכות איברים חשובות ביותר לתפקוד האורגניזם, כמו: חסימת קשרי עצב-שריר בשרירי החזה והפרעה בתפקוד מרכז הנשימה במוח המאורך.

האנזים אצטילכולינאסטרז לא דורש לפעילותו האנזימטית קבוצה פרוסטטית או מתכת. הפעילות הקטליטית שלו נובעת ממבנה החלבון עצמו. פיתולי מולקולת החלבון מקרבים חומצות אמיניות מסוימות בחלבון האנזים זו לזו, ליצירת אזור פעיל. אזור זה מכיל שני אתרים:

- א. אתר קישור המעורב בקיבוע לסובסטרט, הכולל אתר אניוני - Anionic site.
- ב. אתר פעיל המקטלו את ההידרוליזה של הסובסטרט וקרוי - Esteratic site.

האתר הפעיל של האנזים אצטילכולינאסטרז כולל את ההידרוכסיל של שייר החומצה האמינית סרין. בקטליזה מעורבים שני אתרים נוספים שהם טבעות אימידאזול של שני שיירי היסטידין שונים. החומצה האמינית סרין לא מקטלת כאשר היא חופשייה, את ההידרוליזה של אסטרים כגון: אצטילכולין, וכן לא מגיבה עם אורגנוזרחניים. לפיכך, שייר ההידרוכסיל חייב לעבור שפעול על ידי האימידאזול של שייר היסטידין שבמולקולת האנזים. האזור הפעיל של האנזים חייב להיות בעל מבנה מרחבי מתאים שיאפשר את ההתקפה המשולבת של הקבוצות הפעילות, שאינן סמוכות, כגון האימידאזולים וההידרוכסיל. הפעילות האופטימלית של האנזים היא ב- $pH=8$, דבר המאפיין את הדרישה של אנזים זה לקבוצות פונקציונאליות חומציות ובסיסיות באתר הפעיל. אתרי הקישור כוללים קבוצות פונקציונליות שונות, כמו, האתר האניוני. אתרי קישור אלה קרובים לאתר הפעיל של האנזים.

האנזים אצטילכולינאסטרז הוא בעל turn over number מהיר ביותר, כל 10^6 שניות ישנו חילוף של מולקולת הסובסטרט.

פוסטפורילציה וקרובמיזציה של אצטילכולינאסטרז

רעלי עצב מסוג האורגנוזרחניים והקרובמטים פועלים בסינפסות כולינרגיות, הם נקשרים לאנזים אצטילכולינאסטרז ומונעים ממנו לפעול ולפרק את האצטילכולין. כתוצאה מכך מצטבר אצטילכולין בסינפסות וגורם לגירוי מתמשך של התא האחר סינפטי דבר אשר עלול ליצור הפרעות חמורות בתפקוד איברים חיוניים בבעל-החיים כגון: בתפקוד שרירי השלד, בלוטות הפרשה ומערכת העצבים המרכזית. הפרעות אלה עלולות להסתיים במוות אך יש להם גם אפקטים פתולוגיים כרוניים מצטברים כגון גרימת פולינורופתיה מושהית.

האורגנוזרחניים והקרבמטים רגישים להידרוליזה. הם עוברים פירוק מהיר ומסיסים במים. לפיכך למרות רעילותם, הם בדרך כלל לא משאירים שיירים בשטח. רעלים אורגנוזרחניים עוברים הידרוליזה בסיסית. היא נעשית על-ידי התקפה נוקליאופילית על הזרחן P, שהוא δ⁺. כאשר הזרחן קשור לחמצן במקום לגופרית הוא רגיש יותר להידרוליזה בסיסית, בגלל האלקטרו-שליליות הרבה יותר של החמצן בהשוואה לגופרית. אורגנוזרחניים וקרבמטים נקשרים לאצטילכולינאסטרז תוך עירוב אתרים שאליהם נקשר אצטילכולין. מבחינת הפעילות של האתר על מולקולת הרעל, יש אנלוגיה מוחלטת. הרעל עובר שבירה הידרוליטית כמו האצטילכולין. התוצאה היא פוספורלציה או קרבמיזציה של האתר הפעיל של האנזים אצטילכולינאסטרז. כתוצאה מכך חלה חסימה של האתר הקטליטי של האנזים ואיבוד הפעילות. במקרה של פוספורלציה התהליך הוא כמעט בלתי הפיך ואילו במקרה של קרבמיזציה האנזים יכול לעבור החלמה.

הקינטיקה של עיכוב AChE ע"י אורגנוזרחניים וקרבמטים

עיכוב AChE מבוצע ע"י פוספורילציה של האתר הקטליטי ה- "esteratic site" שהוא קבוצת ההידרוכסיל של החומצה האמינית סרין. ניתן להתייחס לאורגנוזרחניים וקרבמטים כסובסטרטים ולתאר את מהלך האינטראקציה שלהם עם האנזים מורכב מהשלבים הבאים:

1. שלב רברסיבלי של יצירת הקומפלקס [אנזים-סובסטרט] המאופיין ע"י קבוע דיסוציאציה - K_a שיחידותיו ריכוז מולרי [M], והוא מדד לאפיניות שבין האורגנוזרחני או הקרבמט לאנזים AChE. בקרבמטים ניתן להראות בקלות יחסית קיום קומפלקס רברסיבלי [אנזים-מעכב] ולתהליך יצירת הקומפלקס מידה ניכרת של הפיכות, כלומר חל גם פירוק ניכר של הקומפלקס ושחרור האנזים מהקרבמט עוד לפני שמתרחשת הקרבמיזציה. הוכחת קיומו של קומפלקס כזה לגבי האורגנוזרחניים היא מורכבת, ומכל מקום מידת הפיכות שלו, כלומר שחרור האנזים מהקומפלקס עוד לפני שמתרחש הזירחון של האנזים היא זניחה.

2. שלב הפוספורילציה או הקרבמיזציה של AChE שמאפיין אותו קבוע ספציפי - K_2 שהוא קבוע קצב מונומולקולרי, שיחידותיו - min^{-1} .

3. דיסוציאציה ספונטנית של האנזים המזורחן או זה הקשור לקרבמט. לתהליך זה קבוע קצב מונומולקולרי - K_3 שיחידותיו - min^{-1} . במקרה של אנזים מזורחן תהליך החלמה של האנזים כה איטי עד שהוא חסר משמעות ביולוגית. בקרבמטים ישנה החלמה ספונטנית של האנזים המעוכב.

התכונות הקינטיות של אצטילכולינאסטרז ממוח ומזימי דג האמנון

נבדקה הקינטיקה הבימולקולרית של עיכוב האנזים אצטילכולינאסטרז, מרקמות המוח והזימים של דגי אמנון על-ידי אורגנוזרחניים וקרבמטים שונים.

בניסיונות עם האורגנוזרחניים פרתיון ומלתיון השתמשנו במקום בפרתיון בפראוכסון ובמקום במלתיון במלאוכסון. הפראוכסון והמלאוכסון הם תוצרי האקטיבציה המטבולית של הפרתיון והמלתיון. בקטליזה של מערכת ציטוכרומים P450, המצויה ברקמות שונות באורגניזם ובעיקר בכבד, עוברים הפרתיון והמלתיון ראקציה של דסולפורציה חימצונית שבה מוחלף אטום הגופרית, המצוי במולקולות אלה בקשר כפול עם אטום הזרחן, באטום חמצן. הראקציה מגדילה מאוד את רעילות התוצר, ואכן הפראוכסון מעכב חזק הרבה יותר של מולקולת האנזים אצטילכולינאסטרז מאשר הפרתיון.

הקינטיקה של ראקציית העיכוב הבימולקולרית, במקרה של עיכוב אצטילכולינאסטרז ממוח ומזימי האמנון ע"י פראוכסון, הראתה על קיום הבדל רב במידת הרגישות של אנזימים אילו לאורגנוזרחני. האנזים ממוח האמנון עוכב ע"י הפראוכסון בטווח ריכוזים של 10 mM - 3.3 בעוד שטווח ריכוזי הפראוכסון שבהם ניתן היה להראות עיכוב של האנזים מהזימים היה נמוך בשלושה סדרי גודל, בין 6-100 mM. ערכי קבועי ראקציית העיכוב הבי מולקולרית (Ki), שחושבו מהנתונים הקינטיים, $2.7 \pm 0.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ לאנזים מהמוח ו- $7.5 \pm 0.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ לאנזים מהזימים נותנים ביטוי כמותי להבדל העצום ברגישות של שני אנזימים אלה לפרתיון. בהשוואה שבין ערכי ה-Ki אצטילכולינאסטרז המצוי בזימי האמנון מראה רגישות גבוהה פי 278 לעיכוב ע"י האורגנוזרחני פראוכסון, בהשוואה לזו של האנזים מהמוח. השאלה הנשאלת מיד היא האם ניתן להרחיב ולראות כתופעה כללית יותר את הממצא שהאנזים מזים הדגים רגיש יותר מהאנזים שבמוח לעיכוב ע"י אורגנוזרחניים. בשלב זה עדיין אין בידינו ה-Ki לראקציית העיכוב של אצטילכולינאסטרז מזימי האמנון ע"י מלתיון.

הממצא הבולט ביותר לגבי ראקציית העיכוב של אצטילכולינאסטרז מהאמנון ע"י קוטלי חרקים קרבמטים הוא שלא היה הבדל בין רגישות האנזים מהמוח לבין זו של האנזים מהזימים עם שני הקרבמטים שנבדקו (carbaryl, lannate).

עקרון שיטות הניטור בעזרת פרופיל אצטילכולינאסטרז

השימוש ההולך וגובר בקוטלי חרקים בחקלאות גורם לכך שפעמים רבות מזדהמים מקורות ומקווי מים המצויים בסמוך לשטחים חקלאיים בשאריות של חומרים רעילים אלה. האופי השומני של קוטלי החרקים גורם להצטברותם בשרשרת המזון ולפגיעה במערכות האקולוגיות של מים מתוקים כולל פגיעה בדגים. קוטלי החרקים האורגנוזרחניים והקרבמטים הם כיום חומרי הדברה הנפוצים ביותר בחקלאות. האורגנוזרחניים והקרבמטים הם רעלי עצב הגורמים לעיכוב של האנזים אצטילכולינאסטרז (AChE) בממברנה הפוסט סינפטית של סינפסות כולינרגיות.

קוטלי החרקים האורגנוזרחניים והקרבמטים רגישים להידרוליזה. הם עוברים פירוק מהיר ומסיסים במים. לפיכך למרות רעילותם, הם בדרך כלל לא משאירים שאריות וקשה לזהותם בשטח. היתרון של שיטת פרופיל אצטילכולינאסטרז באבחון מציאות של שאריות נמוכות של חומרי הדברה מסוג האורגנוזרחניים והקרבמטים במים ניתן לסיכום בנקודות הבאות:

1. שאריות קוטלי החרקים האורגנוזרחניים והקרבמטים נמהלים במים בעוד שבדגים הם מתרכזים בפזה הליפידית של ממברנות רקמת הזימים.
2. מעבר נפח גדול של מים דרך הזימים, תוך כדי פעילות הנשימה של הדג, גורמת לזמינות גבוהה של האנזים בזימים למעכב.
3. אצטילכולינאסטרז המצוי בזימי האמנון רגיש מאוד לעיכוב ע"י האורגנוזרחניים והקרבמטים. במקרה של הפרתיון האפיניות שבין האנזים והמעכב גבוהה בשלושה סדרי גודל.
4. ראקציית עיכוב האנזים אינה הפיכה עם אורגנוזרחניים ומראה רק רברסיבליות מוגבלת עם קרבמטים.

מערכת הציטוכרומים P450

בנוסף לזיהום מים מתוקים ע"י קוטלי החרקים, שכיח ביותר זיהום מים בשאריות של פסולת תעשייתית מסוג הידרוקרבונים אליפטים וארומטיים ונגזרות רעילות ביותר של דיבנזו-ניטרופורנים, דיבנזו-דיאוקסינים ופוליכלורניטד-ביפנילים. האפקט הביולוגי המשולב של שני סוגי המזהמים, חומרי הדברה האורגנוזרחניים מצד אחד ושאריות הפסולת

התעשייתית ההידרוקרבונית מצד שני, עשוי להגביר במידה רבה את הרעילות עקב שילוב סינרגיסטי של פעילות התרכובות הקסנוביוטיות האלה ברקמות הדגים.

הדבר המאפיין את המזהמים הסביבתיים העוברים תהליכי ביואקומולציה הוא היותם מסיסים בשומן. הדבר נכון למרבית קוטלי החרקים ולפסולת ההידרוקרבונית התעשייתית. במהלך האבולוציה התפתחה מערכת אנזימטית של נשאי אלקטרונים מיקרוזומליים הכוללת כאקספטור סופי של אלקטרונים את הציטוכרומים P450. מערכת אנזימטית זו מבצעת מונואוכסיגנציה של הסובסטרט ההידרופובי ע"י ביקוע של מולקולת חמצן אטמוספרי מומס והחדרת חמצן אטומרי למולקולת הסובסטרט. כתוצאה נוצר אתר פעיל במולקולת הסובסטרט המאפשר המשך מטבוליזם, לרוב ע"י קוויגנציה לחומצה גלוקורונית, והרחקה של התצמיד, שכרגיל הוא מסיס ולא רעיל, דרך השתן.

ציטוכרומים P450 בחלקם מקודדים ע"י גנים שונים המצויים במצב של רפרסיה. הסובסטרטים של הציטוכרומים P450 יכולים להיות גם אינדוסרים הגורמים לביטול הרפרסיה ולסינתזה מחדש של סוגים מסויימים של ציטוכרומים P450. קבוצות מוגדרות של כימיקלים משמשים כאינדוסרים של גנים מסויימים של ציטוכרום P450. הכימיקלים ההידרוקרבוניים ההידרופוביים, שהוזכרו מקודם כמזהמים ממקור תעשייתי של מים מתוקים, גורמים לאינדוקציה של גנים מתת המשפחה CYP1A. למרות שהאינדוסרים של CYP1A כוללים כימיקלים מקבוצות שונות ומגוונות, ניתן לראות מאפיינים דומים בקונפיגורציה המרחבית של התרכובות, שגורמים לאינדוקציה. התברר, שהתרכובות שגורמות לאינדוקציה של CYP1A הן רעילות ביותר לאורגניזם ושחלק מהן הוא מוטגני, קרצינוגני וטרטוגני. בדגים תת המשפחה CYP1A כוללת כנראה רק גן אחד המקודד להמופרוטאין - ציטוכרום P4501A.

תרכובות כימיות מזהמות סביבה, שמקורן בעיקר בתעשיות פטרוכימיות, פחם, תחנות-כוח, תעבורה ימית, תעשיית נייר, פלסטיקה ודליפות של נפט גולמי גורמים לאינדוקציה של גנים ספציפיים ולאינדוקציה של סוגים מוגדרים של ציטוכרומים P450.

התרכובות השייכות לקבוצות הכימיקלים:

polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls (PCB), chlorinated dibenzodioxines, chlorinated dibenzofurans.

גורמות לאינדוקציה של אנזימים השייכים למשפחת הגנים CYP1 שבה תת משפחה אחת CYP1A שבה ידועים עד היום ביונקים שני גנים, המקודדים לשני סוגים של ציטוכרומים P450 והם: P4501A1 ו-P4501A2 (Yabusaki et al, 1984). הגן CYP1A2 מיוחד בכך שהוא עובר אינדוקציה גם ע"י התרכובת isosafrol, וזאת בנוסף לאינדוקציה ע"י התרכובות שהוזכרו למעלה כאינדוסרים של הגן CYP1A. כמו P4501A1 וגם P4501A2 עושה מטבוליזם לחומרים פרומוטגניים, ושני האנזימים יכולים להיות מעורבים בתהליכים מחוללי סרטן (Gelboin, 1980).

אינדוקציה של הגנים CYP1A ו-CYP1A2 גורמת לעלייה בפעילויות הקטליטיות האופייניות לציטוכרומים P450 שלהם הם מקודדים. שתי ריאקציות אופייניות המשמשות כאינדיקציה לאינדוקציה של הציטוכרומים מתת המשפחה CYP1A הן:

7-Ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD), and Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH).

הגנים לציטוכרומים P4501A1 ו-P4501A2 מהווים חלק מלוקוס הנקרא: Ah locus (aromatic hydrocarbon locus) הכולל גם אנזימי דטוקסיפיקציה אחרים כמו גלוטטיון טרנספראז (Pickett et al., 1984), ו-UDP-glucuronosyltransferase (Owen, 1977), ועוד. ה-Ah locus נשלט ע"י רצפטור ציטופלסמטי הנקרא Ah receptor (Ah-R) שהוא בעל משקל מולקולרי 95-126 KD והוא בעל אפיניות קישור גבוהה לתרכובת מזהמת סביבה רעילה 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) המבצעת רגולציה של ה-Ah-receptor (Landers and Bunce, 1991).

בדגים, הוכח קיומן של משפחות גנים שונות של ציטוכרומים P450, ובעיקר אינדוקציה של תת משפחת הגנים CYP1A (Stegeman and Hahn, 1994). בדגים קיים קושי בהבחנה בין שני הגנים השייכים לתת המשפחה הזו. הציטוכרום שאובחן כשייך לתת המשפחה CYP1A שבדרך מהדג rainbow trout, הראה הומוולוגיה של 55-59% של רצף חומצות האמינו, הן עם P450A1 והן עם P450A2 של יונקים. לכן נהוג להגדיר גן אחד בלבד בתת משפחה זו בדגים, והוא נקרא CYP1A, והחלבון קרוי בהתאמה P450A (Heilmann et al, 1988).

אינדוקציה של הפעילות הקטליטית EROD או AHH ברקמות של דגים, בסביבתם הטבעית, יכולה לתת אינפורמציה על מציאות תרכובות קרצינוגניות המזהמות את הסביבה הימית ברמה הגורמת לנזק פיסיולוגי ופתולוגי לאורגניזמים החיים. בידוד ציטוכרום P450A ממספר מינים של דגים, יחד עם פיתוח נוגדנים פוליקלונליים ומונוקלונליים לאותם המופרוטאינים, אפשר הרחבת המחקר לאפיקים סביבתיים. פותחו שיטות אימונוכימיות לזיהוי אינדוקציה של ציטוכרום P450A בדגים, ונמצא הקשר שבין אינדוקציה זו לזיהום ההביטט הימי בכימיקלים רעילים.

בשיטה המפותחת על ידינו קביעת איכות מים מתוקים, מבחינת מציאות מזהמים הידרוקרבוניים רעילים, נעשית ע"י קביעה כמותית של אינדוקציה של ציטוכרום P450A ברקמות שונות של דגים המאכלסים או מוכנסים למערכות הולכת ואחזקת מים מתוקים.

הזיהוי האיכותי של אינדוקציה של ציטוכרום P450A נעשה בשיטות אימונוכימיות (עם נוגדן ספציפי), יחד עם קביעת 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD), פעילות קטליטית האופיינית לציטוכרום זה.

שיטות העבודה

הכנת הזימים ורקמת המוח לאנליזה של AChE

הדגים מוגדרים, נשקלים ונמדד אורכם. בעזרת משור חשמלי פותחים את קופסית המוח והמוח מועבר בשלמותו, לאחר שנשקל, להומוגניזר עם בוכנת טפלון שם הוא עובר הומוגניזציה בבופר: $\text{pH} = 7.4$, $0.1\text{M K}_2\text{HPO}_4$, ביחס 0.1 גרם מוח ל- 1 ml בופר מקורר ל- 0°C . ההומוגנט השלם משמש כמקור לקביעת פעילות האנזים brain-acetylcholinesterase. בניסויים הקינטיים השתמשנו בנוזל העליון המתקבל לאחר צנטריפוגציה של הומוגנט המוח ב- $1000\times\text{g}$, במשך 10 דקות. פעילות האנזים נקבעה עם הסובסטרט acetylthiocholine. לקביעת פעילות האנזים gills-acetylcholinesterase, הוכן הומוגנט של הזימים כפי שתואר עם הומוגנט המוח.

האנליזה הביוכימית של פעילות AChE

האנליזה הביוכימית של פעילות האנזים אצטילכולינאסטרז ברקמות המוח והזימים נעשתה בהתאם לשיטה הספקטרופוטומטרית של Ellman (1961).

תערובת הראקציה כללה את המרכיבים:

$4.5 \cdot 10^{-4}$ M acetylthiocholine,
 $7.5 \cdot 10^{-5}$ M 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid,

ב- 2.5 ml של בופר פוספט ($\text{pH} = 8.0$, 0.1M). הריאקציה החלה ע"י הוספה של 50 μl מהומוגנט זימים או לחילופין 25 μl מהומוגנט מוח. מעקב אחר התפתחות

הראקציה נעשה באורך גל של 412 nm בעזרת ספקטרופוטומטר ממוחשב בעל קרן כפולה מסוג : UVidec- 610, תוצרת JASCO, יפן.

הכנת המיקרוזומים לקביעת ציטוכרום P450

מיד לאחר קטילת הדגים הוצאו הכבדים והלבבות ונשטפו בבופר Tris HCl PH=7.4 עם 50mM 0.15M KCL. הכנת המיקרוזומים לפי Yawetz et al, 1983, לצורך הכנת הלב כולו ובמספר מיקרים אוחדו לבבות של מספר דגים מאותה קבוצת טיפול. משקל ריקמת הלב, להכנת המיקרוזומים, נע בין 0.4-0.7g. מן הרקמות הוכנו הומוגנטיים בבופר Tris HCl PH=7.4 עם 50mM 0.15M KCL. ההומוגנטיים הוכנסו לאולטרצנטריפוגה מסוג BECKMAN Model L5-50 למשך 10 דקות ב- 9,000xg לאחר מכן 10 דקות נוספות ב- 12,000xg, עברו סינון להרחקת המישקעים והוכנסו ל 70 דקות ב- 105,000xg. התהליך כולו נעשה בתנאי קור. בסופו של תהליך זה מתקבל משקע של הממברנות של הרטיקולוס האנדופלסמי (מיקרוזומים), אליהן קשורים בין היתר חלבוני מערכת P450. המיקרוזומים הורחפו בבופר 50mM Tris HCl PH=7.4 שהכיל 1mM EDTA, 1mM DTT ו- 20% גליצרול (בופר הרחפה). 1.5ml מבופר זה למיקרוזומים של הכבד ו- 1ml למיקרוזומים של הלב. מבחנות המיקרוזומים הוחזקו בחנקן נוזלי (-170°C) עד ביצוע הבדיקות השונות.

קביעת תכולת P450 (specific content)

תכולת P450 נקבעה מספקטרום הפרש עם CO בהתאם לשיטה של Omura and Sato מ-1964. מבחנת הראקציה הכילה כ- 1mg חלבון למיליליטר בבופר 0.1M K_2HPO_4 PH=7.4. אל מבחנה המכילה 1.5ml תרחיף מיקרוזומלי, בועב CO במשך 60 שניות. הדוגמה חולקה לשתי קיווטות ולאחת מהן הוספו מספר גרגרים של סודיום דיטיונט. תכולת P450 נקבעת על פי ספקטרום הפרש הבליעה בין מיקרוזומים מחוזרים עם סודיום דיטיונט שקשרו CO למיקרוזומים שקשרו CO אך לא חוזרו, בספקטרופוטומטר בתחום אורכי הגל 400-500nm כפי שתואר על ידי Yawetz et al., 1983, תוך שימוש במקדם בליעה מולרי של $9.1 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. התכולה הספציפית התקבלה לאחר חילוק התוצאה בתכולת החלבון הכללית. הפרשי הבליעה בבדיקה זו ובשאר הבדיקות הספקטרופוטומטריות נקראו בספקטרופוטומטר מסוג Jasco UVIDEc-610 Double beam Spectrophotometer.

קביעת EROD activity (7-Ethoxyresorufin O-deethylase) פלואורימטרית בשיטה

ריכוז הסובסטרט היה $2 \mu\text{M}$, וכמות החלבון המיקרוזומלי $50-100 \mu\text{g}$. שלבי העבודה היו כמתואר על ידי Burke and Mayer (1974). שיטה זו נחשבת ע"פ רוב לשיטה רגישה ואמינה יותר מהשיטה הספקטרומטרית. הסובסטרט הוכן בריכוז המתאים בתוך תמיסה שהכילה:

7.2mM KH_2PO_4 , 35mM Na_2HPO_4 PH=7.4, 0.25mM NADP, 2.5mM Glucose-6-Phosphate dehydrogenase ו- 1unit/ml : Glucose-6-Phosphate

בניגוד לראקציה הספקטרופוטומטרית בה הוסף ספק האלקטרוניס NADPH ישירות למערכת, בראקציה הפלואורימטרית NADP הופך ל- NADPH בצורה רציפה בעיקבות הראקציה המתרחשת בין G-6-P לבין G-6-P-D.

מבחנת הראקציה הכילה :

1. $50\mu\text{g}$ או $100\mu\text{g}$ חלבון (בהתאם לניסוי), כאשר המיקרוזומים הושלמו לנפח של $100\mu\text{l}$ עם בופר המכיל 0.8mM HEPES 200mM Sucrose ו-20% גליצרול, $\text{PH}=7.4$.
2. 1ml סובסטרט המוסף למיקרוזומים לאחר שחומם 5 דקות ב 30°C .
3. 2ml אצטון קר המוסף למבחנת הראקציה לאחר 5 דקות בהן מתפתחת הראקציה ב- 30°C .

מבחנת הרקע מכילה אותם מרכיבים אך האצטון מוסף מיד לאחר הוספת שאר המרכיבים כך שלא תיתכן התפתחות של ראקציה. לאחר הוספת האצטון המבחנות עורבבו היטב והוכנסו לצנטריפוגה ב- $9,000\times\text{g}$ למשך 5 דקות במטרה להשקיע את החלבונים. מתקבלת תמיסה צלולה. כדי לבצע את הקריאה נקבע סטנדרט של Resorufin 100pmol , הוא תוצר הפרוק של 7-ethoxyresorufin. הסטנדרט הכיל אם כן 100pmol resorufin (מריכוז ידוע), מומסים במתנול, 1ml בופר 0.8m MHEPES 200mM Sucrose , 20% גליצרול, $\text{PH}=7.4$ ו- 2ml אצטון קר. אורך הגל של ה- excitation היה 537nm , (עירור האלקטרונים ומעבר ממצב בעל אנרגיה נמוכה יותר למצב בעל אנרגיה גבוהה יותר). אורך הגל של ה- emission היה 583nm , (אורך הגל של פליטת האנרגיה). על ידי חילוק קצב הפעילות בכמות החלבון שבתערובת הראקציה התקבלה הפעילות הספציפית.

immunoblotting

הפרדת חלבונים נעשתה על גל SDS-PAGE (Poly acrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate). התהליך משמש להפרדת שרשרות פוליפפטידיות על פי משקלה המולקולרי של תת היחידה המתקבלת לאחר חיזור גשרי S-S עם מרקפתואתנול והפרדת קשרים הידרופובים בעזרת SDS. קשירת SDS הופכת את החלבונים לטעונים שלילית והם מורצים בשדה חשמלי. התהליך נעשה לפי השיטה של Burnette, (1981). הגל בנוי מגרדינט של 8-14% אקרילמיד וביסאקרילמיד.

הכנת המיקרוזומים להרצה כללה מהילת המיקרוזומים בבופר STB: 0.25M Tris, 40% glycerol, 4% mercaptoethanol, 0.008% Bromophenol blue, 0.5% SDS, המכיל 20pmol של P450 או 10pmol של P450 למשך 5 דקות במטרה לגרום לדנטורציה של החלבון ונישמרו בהקפאה של -20°C . הזרקה הדגימות לבארות שבגל נעשתה כך שכל באר הכילה 10pmol או 20pmol של דגימת הכבד או הלב בהתאמה. ההרצה נעשתה במתח של 90V למשך שעה ו-בהמשך במתח של 100V עד הגיע החלבונים לתחתית הגל. החלבונים הועברו לפילטר ניטרוצלולוז של 0.22micron , במתח של 200V למשך לילה ב- 4°C . כדי לחסום אתרי פעולה לא ספציפיים עובר הפילטר אינקובציה למשך שעה באמבט מיטלטל עם 42°C ב- 5%(W/V) אבקת חלב מומסת בבופר Tris saline (TBS) המכיל: 20mM Tris, pH 7.5, ו- 0.5M NaCl. הניטרוצלולוז עבר אינקובציה של שעות ב- 25°C , עם הנוגדנים ראשוניים שהם: anti scup P450IA, Mab 1-12-3 (Kloepper- Sams et al, 1987; Park et al., 1986) תוך טילטול באמבט מיטלטל. הנוגדנים מהולים בתמיסת TBS/milk (המתוארת לעיל) בריכוז של $100\mu\text{g}/\text{ml}$. לאחר מכן נשטף הניטרוצלולוז למשך 10 דקות בבופר TBS, המכיל 10.5% Tween 20, ולמשך 10 דקות נוספות שוב בבופר TBS.

לאחר השטיפות הפילטר עובר אינקובציה למשך שעה (25°C) עם הנוגדנים השניוניים שהם goat anti mouse והם קשורים לאנזים alkaline-phosphatase. פיתוח ראקציה צבע על ידי אינקובציה עם בופר 0.1M NaHCO_2 , $\text{PH}=9.8$ המכיל

0.165mg/ml - ו- 1mM MgCl₂, 0.33 mg/ml nitroblue tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate מומס ב- dimethylformamide. לאחר התפתחות הצבע נשטף הניטרוצלולוז מספר פעמים במים מזוקקים. קריאת התוצאות נעשתה על פי צפיפות הצבע (שהתפתח בכל דגימה) שנמדדה בדנסיטומטר מסוג Hoefler Scientific Instruments GS-300 Scanning- Densitometer בהשוואה לצפיפות הצבע של סטנדרט ידוע שהוא חלבון P4501A נקי או מיקרוזומים מכוילים. בחילוק בכמות החלבון הכללית התקבלה התכולה הספציפית של P4501A.

אתרי הדגימה בירקון:

לאתרי הדגימה נחל ירקון ולמערכות המים הקשורות אליו ניתנו סימנים מוסכמים המופעים באיורים ומצויינים להלן (ראה מפת נחל ירקון):

אזור המעיינות (AM), כביש 40 (R4), אבו ראבח (AR), פרק אפק (PA), מעל מוצא השפכים של בית החרושת "סנו" נחל הדס (USN), מתחת למוצא השפכים של "סנו" נחל הדס (DSN), ירקון - לפני כניסת נחל קנה (AK), בריכת מיתקן שפכים הוד השרון - כפר סבא לפני הזרמת הקולחין לנחל הדס (HH), נחל הדס (HD), נחל שילה (SL), ירקון - אחר כניסת נחל קנה (NK), סכר תע"ש (TS), סכר חקלאי (CH), נחל הדסים לאחר מוצא הקולחין של ביוב רמת השרון (OR), עשר טחנות (10M), סכר איגוד (SE), שבע טחנות (7M), ראש ציפור (DH) - אתר חיבור הירקון עם נחל איילון, ושפך הירקון - רידינג (RID).

שימוש באמנונים בכלובים לניטור חשיפה לרעלי עצב בירקון.

כלובי רשת עם אמנונים הוכנסו לתקופות מוגדרות, בעונת השנה השונות, באתרי דיגום קבועים לאורך נחל הירקון. לאחר סיום התקופה שבה הוחזקו הדגים הם הועברו למעבדה לשם קביעת פעילות אצטילכולינאסטרז ברקמות המוח והזימים.

תכולת חלבון כללית

לפי שיטת Bradford (1976), תוך שימוש בסרום אלבומין כסטנדרט.

ניתוח סטטיסטי

המבחנים הסטטיסטיים כללו מבחני שונות פרמטריים מסוג t-test, ו-one and two way ANOVA. מבחן *a posteriori* להשוואה בין ממוצעים היה Student-Newman-Keuls test.

Acetylcholinesterase

- Bocquene G., Galgani, F., and Truquet P. 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Mar. Enviro. Res. 30, 29-35.**
- Cripe G.M., Goodman L.R. and Hansen D.J. 1984. Effect of chronic exposure to EPM and to Glutun on the critical swimming spand brain acetylcholinesterase. Aquatic. Tox. 5, 255-266.**
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., and Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-96.**
- Eto M. 1974. Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry. CRC Press. Inc. United States.**
- Kozlovskaya V.I. and Mayer F.L., 1984. Brain Acetylcholinesterase and backbone collagen in fish intoxicated with organophosphate pesticides. J. Great Lakes Res. 10 (3), 261-266.**
- Kuhr R.J., Dorough H.W., 1976. Carbamate insecticides: Chemistry, biochemistry and toxicology. CRC Press. Inc.**
- Nicholis J.G. and Martin A.R. and Wallace B.G. 1992. From neuron to brain. Sinauer Associates, INC.**
- Quinn M. 1987. Acetylcolinesterase: Enzyme struture, reaction dynamics, and virtual transition states. Chem. Rev. 87, 955-979.**
- Sokal R.R. and Rohlf F.J. 1969. Biometry. 776 pp. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA.**
- Timbrell J. A. 1987. Principles of biochemical toxicology. Taylor and francis LTD.**
- Worthing, C.R. and Walkers, S.B. 1983. The Pesticide Manual, 695 pp, The Lavenham Press Limited, Lavenham, Suffolk. UK.**
- Yawetz A., Zook-Rimon Z., and Dotan A. 1993. Cholinesterase enzymatic profiles in two species of wild birds exposed to insecticide sprays in their natural habitats. Archives Insect Biochem. Physiol. 22, 501-509.**

Yawetz A., Manelis R., and Gasith A. 1993a. Cholinesterase enzymatic profiles and the exposure of fish to organophosphorous and carbamate pesticides in Israel. Wat. Tech. 27, 465-472.

Ware G. W. 1983. Pesticides theory and application. Freeman W.H. and Company. United States.

Cytochrome P450

Bradford, M.A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding, *Analyt. Biochem.* 72, 248.

Burke, M.D. and Mayer, R.T. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of amicrosomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene. *Drug. Metab. Disp.* 2, 583.

Burnette W.M. 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. *Analyt. Biochem.* 112, 195-203.

Gelboin H.V. 1980. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: Role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107-1165.

Heilmann 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.

Klopper-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 P-450E of the marine fish scup. *Archiv. Biochem. Biophys.* 253, 268-278.

Landers J.P. and Bunce N.J. 1991. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.* 276, 273-287.

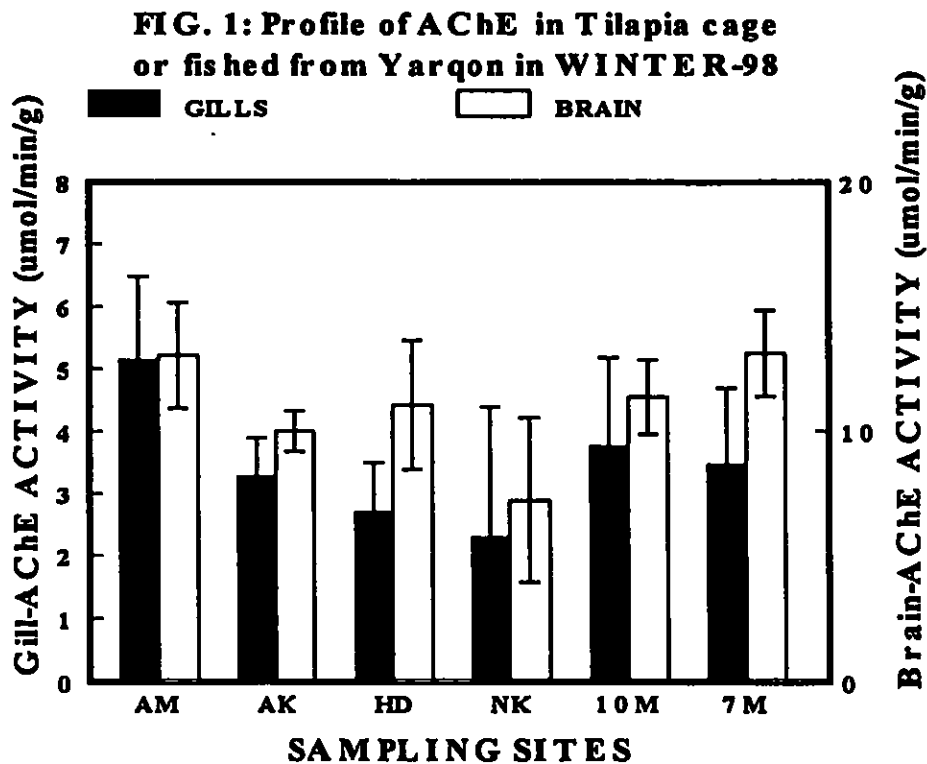
- Nebert D.W., and Gonzalez F.J. 1987. P450 Genes: Structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 945-993.
- Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O, Okuda K., and Nebert D.W. 1993. The P450 superfamily - update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12, 1-51.
- Omura T., and Sato R. 1964. The carbon-monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378
- Owen I .S., 1977. Genetic regulation of UDF-glucuronosyltransferase induction by polycyclic aromatic compounds in mice: co-segregation with aryl hydrocarbon (Benzo[a]pyrene) hydroxylase induction. *J. Biol. Chem.* 252, 2827-2833.
- Pickett C.B. Telakowski-Hopkins C.A., Ding C.J.-F., Argenbright L., and Lu A.Y.H. 1984. Rat liver glutathione s-transferase. Complete nucleotide sequence of glutathione s-transferase m-RNA and the regulation of the Ya, Yb, and Yc m-RNA by 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 259, 5182--5188.
- 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" (D.C. Malins and G. K. Ostrander, Eds.), CRC Press, Inc. Florida, 87-205pp.
- Yabusaki Y., Murakami H., Nakamura K., Shimizu M. Oeda K., and Ohkawa H. 1984. Characterization of complementary DNA clones coding for two forms of 3-methylcholanthrene inducible rat liver cytochrome P-450. *J. Biochem.* 96, 793-804.
- Yawetz A., Manelis R., and Fishelson L. 1992. The effects of Aroclor 1254 and petrochemical pollutants on cytochrome P450 from the digestive gland microsomes of four species of Mediterranean molluscs. *Comp. Biochem. Biophys.* 103C, 607-614.
- Yawetz, A., Woodin B.R. and Stegeman, J.J. 1998. Cytochrome P450 (CYP) in liver of the turtle *Chrysemys picta picta* and the induction and partial purification of CYP1A-like proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1381, 12-26.
- Yawetz, A., Zilberman, B., Woodin, B. and Stegeman, J.J. 1988a. Ctochromes P4501A, P4503A, and P4502B in liver and heart of *Mugil capio* treated with CYP1A inducers. *Emviron. Toxicol. Pharmacol.* 6, 13-25.

תוצאות

1. ניטור מידת החשיפה של אמנונים בכלובים לחקר זיהום מי הירקון בשאריות של אורגנוזרחניים וקרבמטים, תוך בירור השפעת העונתיות ומיקוד הקטעים של הנחל בהם הבעיה חמורה יותר (פרק זה ניתן בדו"ח הביניים החצי שנתי).

בשל הרגישות הרבה, הזמינות המיידית ומשך הזמן הארוך יחסית הנדרש להתחדשות האנוים שבזימי האמנון רמת פעילות AChE בזימים מייצגת מצב כרוני של חשיפה לרמת שאריות נמוכה של קוטלי החרקים האורגנוזרחניים והקרבמטים. עיכוב בפעילות AChE במוח באמנון מייצגת מצב יותר אקוטי שבו נגרם נזק פיסולוגי לדג.

מידת החשיפה של האמנונים לשאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים שבמי הירקון אינה שווה אלא שונה באופן מובהק בעונות השונות של השנה. התוצאות המוצגות באיורים 1-3, מסכמות את ממוצעי פעילות AChE במוח ובזימים של אמנונים מתחנות הדיגום השונות שבירקון בעונות: חורף, אביב וקיץ 1998.



החודשים: מרץ, אפריל ומאי, נלקחו בחשבון כתקופת האביב, החודשים: יוני, יולי ואוגוסט, כתקופת הקיץ, החודשים: ספטמבר, אוקטובר ונובמבר, כתקופת הסתיו, והחודשים דצמבר, ינואר ופברואר, כחודשי החורף.

פרופיל אצטילכולינאסטרז באמנונים שמהירקון, בעונת חורף 1998 מוצגת באיור 1. מהתוצאות נראה שמבחינת זיהום מי הירקון באורגנוזרחניים וקרובמטים בעונת החורף החשיפה של אמנונים לקוטלי חרקים אלה הייתה נמוכה יחסית לזו שבשאר עונות השנה.

קטע הירקון ממעלה סכר נחל קנה (AK), ועד מורד סכר נחל קנה (NK), יחד עם נחל הדס (HD), הוא קטע המזהם באופן כרוני בשאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרובמטים, אך בחורף הירידה בפעילות AChE בזימים ובמוח אמנונים שנחשפו במקטע זה של הירקון הייתה יחסית נמוכה.

פרופיל אצטילכולינאסטרז באמנונים שמהירקון, בעונת אביב 1998 מוצגת באיור 2. פעילות AChE מראה ירידה נמוכה במוח אמנונים מקטע הירקון הסמוך לשפך נחל קנה (NK) ו-(AK). גם באתר הדיגום בירקון הסמוך לכביש 40 (R4) ונחל שילה (SL) ניתן לראות ירידה נמוכה בפעילות האנוזים שבמוח.

בפעילות AChE בזימים ניתן להבחין במגמה מובהקת ($P < 0.05$) של ירידה בפעילות האנוזים במדגמי האמנונים מהמעיינות לכיוון עשר תחנות. הדבר מעיד על חדירה מתמדת של אורגנוזרחניים וקרובמטים למי הירקון בעונה זו אך בריכוזים שבדרך כלל אינם פוגעים באופן חמור בפיסילוגיה של דגי האמנון.

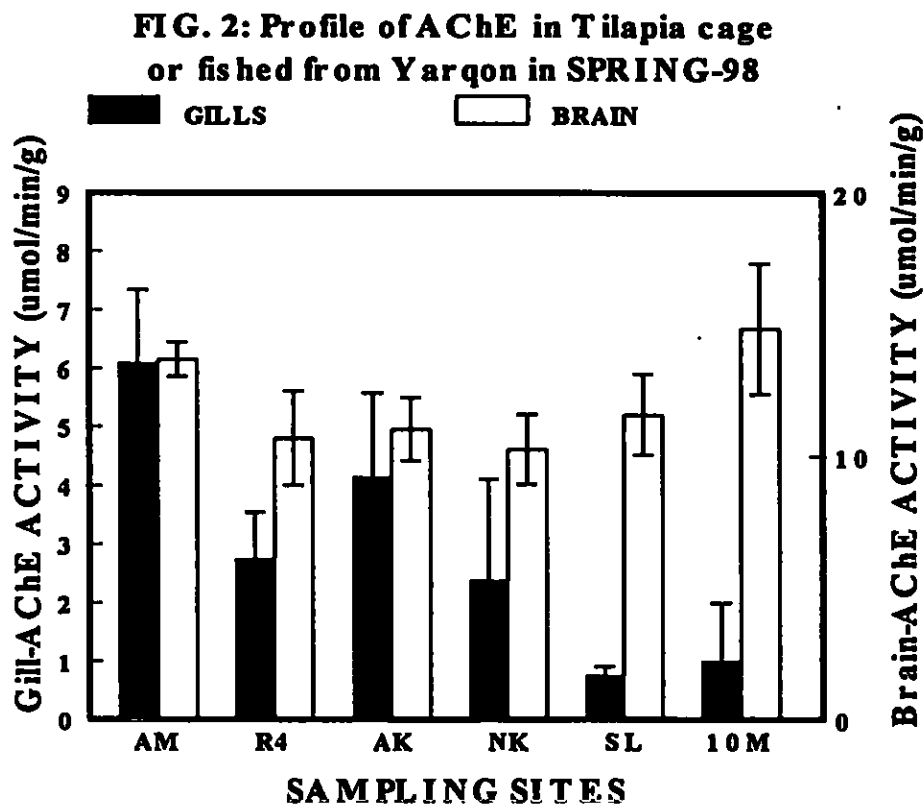
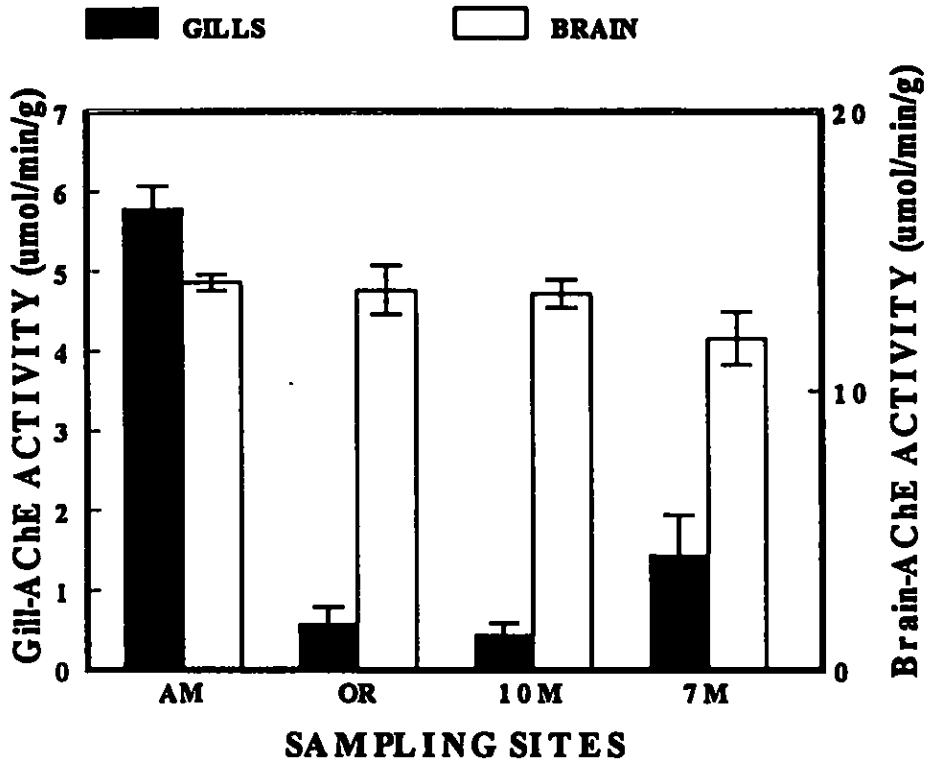
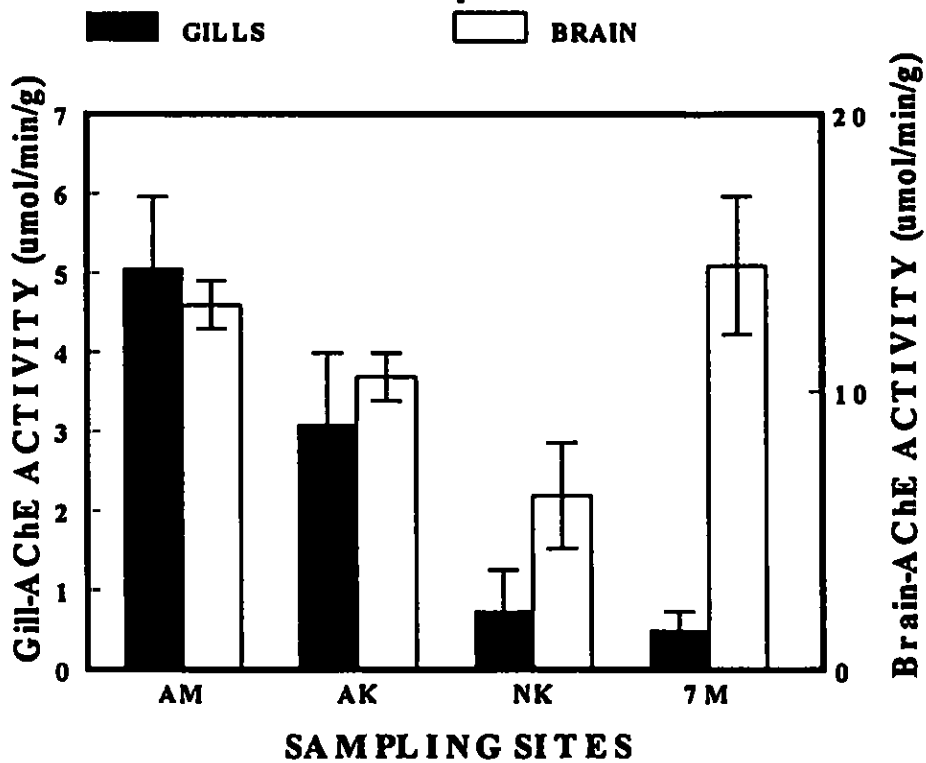


FIG. 3: Profile of AChE in Tilapia cage from Yarqon in the SUMMER-98



פרופיל אצטילכולינאסטרז באמנונים שמהירקון, בעונת קיץ 1998 מוצג באיור 3. בעונת הקיץ של שנת 1998 הדגים ששהו בכלובים שבאתרים שבקטע המזוהם של הירקון (ליד נחל קנה) לא החזיקו מעמד ומתו לפעמים תוך יום לאחר הצבת הכלובים.

FIG. 4: Profile of AChE in Tilapia cage or fished from Yarqon in SUMMER-97



המצאים שבאיר 3 לא נותנים לכן תמונה נאמנה ורמת החשיפה של האמנונים לשאריות אורגנוזרחניים וקרבמטים בקיץ 1998 לא הייתה שונה למעשה בהשוואה לזו שבקיץ 1997.

בנתונים שהתקבלו בקיץ 1997 (איור 4) הובחנה מגמה מובהקת של ירידה בפעילות AChE ממעלה הנחל ועד לשפך הירקון, הן בזימים ($P < 0.01$) והן במוח ($P < 0.05$). יוצאת מהכלל היא הרגנרציה של הפעילות הנורמלית של אצטילכולינאסטרז במוח האמנונים מאתר 7 טחנות (7M). תקופת הקיץ נראתה בהתאם לממצאים של שנת 1997 כתקופה שבה החשיפה של הדגים לשאריות אורגנוזרחניים וקרבמטים היא הרבה ביותר ולריכוזים שיש להם משמעות פיסיולוגית.

המגמה של שיפור באיכות מי הירקון, מבחינת זיהומם בשאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים, באתרים 10 טחנות (10M) ובעיקר ב- 7 טחנות (7M) נראת כמגמה קבועה בכל עונות השנה.

בהתאם לממצאים של שנת 1998 ושנת 1997 וממצאים שנתקבלו מהשנים הקודמות של המחקר ניתן מבחינת מציאות שאריות של קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים לחלק את הירקון למספר מיקטעים אופייניים.

אזור המעיינות [AM], כביש 40 [R4], עד לפני סכר נחל קנה [AK] הוא קטע נקי של הירקון. מידת החשיפה של הדגים לשאריות אורגנוזרחניים וקרבמטים בקטע זה היא נמוכה.

האתרים ממורד סכר נחל קנה [NK] עד לסכר חקלאי [CH] הם קטע של הירקון ויובליו המאופיין בכך שיש בו חשיפה מוגברת לשאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים דבר המתבטא בכך שבאמנונים שנחשפו בקטע זה למי הירקון פעילות אצטילכולינאסטרז במוח, ובעיקר בזימים נמוכה. אזור זה של הירקון אכן גובל בשטחים חקלאיים. יחד עם זאת התמונה המתקבלת באנליזה רב שנתית היא פחות חמורה כיוון שאין בה נתונים של מקרי ההרעלה ותמותת הדגים. יש לציין את השכיחות הרבה של הרעלות דגים שהתרחשו בעבר במקטע זה של הירקון. בתנאים שבשגרה הירידה ברמת פעילות AChE במוח האמנונים היא ב- 25% בעוד שפעילות האנזים בזימים יכולה לרדת עד כדי 60% מהפעילות הנורמלית. קטע זה של הירקון מאסף בנוסף לנחל קנה נחלים נוספים כגון נחל הדס (HD) המנקז את ביוב כפר סבא והוד השרון, ונחל שילה (SL), המנקז את ביוב ראש העין וקיבוץ עינת. נראה מהתוצאות שמי נחל שילה מחדירים למי הירקון כמות גדולה יותר של שאריות אורגנוזרחניים וקרבמטים מאשר מי נחל הדס.

בין אתר 10 טחנות [10M] ל- 7 טחנות [7M] ניתן להבחין בקטע של הירקון שבו רמת הפעילות של אצטילכולינאסטרז במוח האמנונים מצויה בתחום הנורמלי. אזור זה של הירקון גובל בפארק הירקון, אין בו פעילות חקלאית ויש בו פעילות קיט.

מבחינת פעילות אצטילכולינאסטרז בזימי האמנונים ניתן לראות שהפעילות בקטע המוצא והמעיינות היא נורמלית או מתקרבת לנורמלי, בקטע של האזור החקלאי הפעילות נמוכה ואף נמוכה מאוד והיא נשארת נמוכה גם בקטע 10 טחנות ועד לשבע טחנות מכיון שהאנזים שבזימים רגיש לעיכוב בכמה סדרי גודל יותר מהאנזים שבמוח ורמת הפעילות שלו חוזרת לנורמלי באיטיות רבה ביותר.

עיכוב של פעילות אצטילכולינאסטרז במוח האמנונים יש בה ביטוי לפגיעה פיסיולוגית ולאקוטיות של ההרעלה. זאת מאחר שפעילות מעוכבת של אצטילכולינאסטרז במוח חוזרת באמנונים מהר לרמה הנורמלית.

הפעילות הנמוכה בזימים פירושה לכן שהחל מהאזור החקלאי מזוהם הירקון באופן כרוני בשאריות של חומרי הדברה. הנתונים המתקבלים מפרופיל אצטילכולינאסטרז במוח האמנונים מלמדים על אותו אזור של הירקון שבו יש לדגים בעיה פיסיולוגית מיידית עם שאריות קוטלי חרקים אלה. אזור זה כולל את כל השטח שבו יש חקלאות אינטנסיבית.

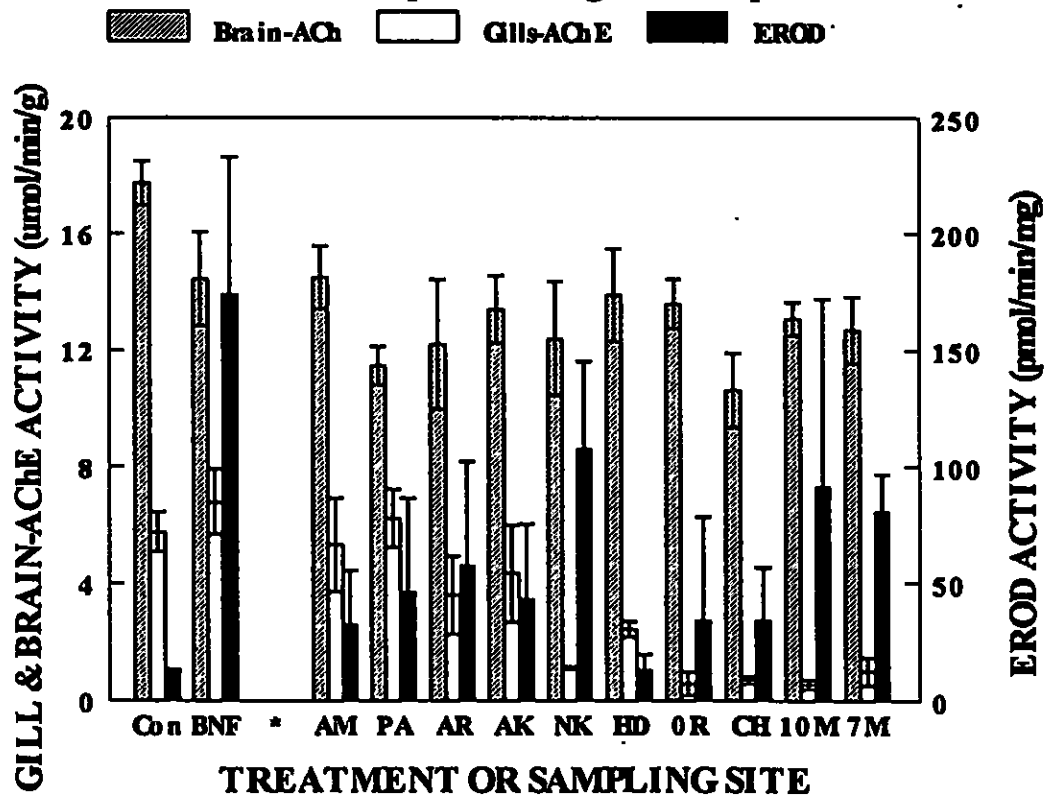
2. שימוש בביומרקר ציטוכרום P4501A1 ופעילות EROD לניטור חשיפה של אמנונים לשאריות תרכובות הידרוקרבונים רעילות במי הירקון.

ניסיונות שדה ומעבדה בוצעו עם דגי אמנון לשם חקר מידת החשיפה של הדגים לשאריות הידרוקרבוניות רעילות במי הירקון. אתרי הדגימה כיסו את הירקון בקטע שמהמעיינות המהווים גם מקור של מי שתייה, ועד לאתר שבע תחנות שהוא תחילת הירקון המלוח. לנתונים אלה חשיבות רבה כיוון שיש פעילות קיט לאורך הנחל.

הנתונים שהתקבלו מוצגים באיור 5. באיור זה נתונים על פעילות EROD בכבד ופעילות AChE ברקמות הזימים והמוח של אמנונים ששמשו כביקורת, אמנונים שטופלו ב-βNF שהוא אינדוסר של ציטוכרום P4501A, ואמנונים שנידונו או הוחזקו תקופה של עד שבועיים בכלובי רשת באתרי הדיגום שבירקון.

מנתונים ראשוניים (איור 5, BNF) התברר שניתן לגרום בדג האמנון לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A ולכן הוא יכול לשמש כאורגניזם ביואינדיקטורי לשם ניטור חומרים מסוכנים מסוג זה במים. האינדוקציה בוצעה במעבדה ע"י הזרקה של החומר βNF לחלל הבטן של הדגים, בחמש מנות של 5 mg/Kg האחת, ובמרווח של 3-4 ימים בין טיפול לטיפול. חומר זה ידוע בכושרו להשרות אינדוקציה של ציטוכרום P4501A בבעלי חיים. האינדוקציה לא גרמה לשינוי בפעילות AChE ברקמות המוח והזימים של הדגים המטופלים. ניתן לכן להסיק שחשיפה לאינדוסרים של ציטוכרום P4501A לא גורמת לפגיעה בפעילות AChE ומכאן עיכוב פעילות האנזים בדגים מהשטח מבטאת באופן סלקטיבי חשיפה של האמנונים לקוטלי חרקים מסוג האורגנוזרחניים והקרבמטים.

FIG. 5: Gills-, brain-AChE & EROD in liver of Tilapia fished/caged in Yarqon



בדגי הביקורת שהובאו מברכות גידול אמנוניים בקיבוצים (Con) נמצאה רמה נמוכה ביותר של ציטוכרום P4501A ומידה נמוכה ביותר של פעילות EROD האופיינית לציטוכרום זה. ניתן לכן להסיק שהדגים בבריכות נחשפים לריכוזים נמוכים ביותר של תרכובות הידרוקרבוניות רעילות. דגים אלה, מברכות הגידול, משמשים אותנו בשלב זה כשהם מוחזקים תקופה מוגדרת של זמן בכלובי רשת וכך נחשפים למהמים ההידרוקרבוניים שבמי הירקון.

הממצאים שהתקבלו מהירקון עד עתה מעלים את החשד שזיהום המים מתחיל עוד במעינות (AM), שם הוא נמוך מאוד, והוא הולך וגובר בכיוון מורד הנחל כפי שניתן לראות מאיור 5. פעילות EROD היא ביטוי לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A ולכן עלייה בפעילות אנזימטית זו מעידה שדגי האמנון נחשפו לשיירים של תרכובות הידרוקרבוניות רעילות ממקור תעשייתי. בהתאם לתוצאות פעילות EROD בכבד האמנוניים שנדגמו בתחנות השונות מראה מגמה מובהקת ($P < 0.05$) של עלייה עם מורד הירקון החל מהמעינות (AM) ועד לאתר שבע תחנות (7M).

הדבר מעיד שיש הצטברות של תרכובות בעלות פעילות ביולוגית מסוכנת במהלך הזרימה של הירקון. תוצאות אלה מתאימות לממצאים קודמים שלנו שהראו אינדוקציה של ציטוכרום P4501A ופעילות EROD בכבד דגי קיפון שנדגמו באתרים ראש ציפור (DH) ורידינג (RID) שבירקון המלוח.

למעשה לא ניתן להגדיר בירקון איזור נקי לחלוטין משיירי פסולת הידרוקרבונית רעילה ואינדוקציה נמוכה יחסית של פעילות EROD נמצאה בכל הקטע הנחשב כנקי בירקון כולל המעינות (AM), פרק אפק (PA), אבו ראבח (AR) והירקון לפני כניסת נחל קנה (AK).

העובדה שאינדוקציה נמוכה של (EROD) נרשמה באמנוניים שנחשפו למי הירקון באתרים שונים שבירקון הנקי יכולה לעורר חשד שהזיהום ההידרוקרבוני הרעיל מגיעה גם בדרך האוויר ע"י שקיעה של חלקיקי פיח שלהם ספוחים תרכובות אלה. מקור החלקיקים יכול להיות ארובות מפעלי תעשייה סמוכים או נפולת של ארובות תחנת הכוח רידינג. כדי לברר נקודה זו נבדוק בהמשך את נתוני שושנת הרוחות באיזור ביחס למקורות האפשריים של זיהום האוויר.

באתר מורד קנה (NK) רמת החשיפה של האמנוניים היא הגבוהה ביותר ומידת הרעילות של מי הירקון לדגים היא רבה ורק לעיתים רחוקות האמנוניים מסוגלים לשרוד באתר זה יותר ממספר ימים. הנתונים התקבלו לכן מדגים שנידגו באתר שלהם כנראה סבילות רבה במיוחד כלפי המזהמים הכימיים של מי הירקון באתר זה.

מידת החשיפה של האמנוניים לשאריות הידרוקרבוניים רעילים בנחל הדס (HD) ונחל הדסים (OR) אינה רבה וניתן מכאן להסיק שתרומת הביוב של כפר סבא-הוד השרון (נחל הדס) וביוב רמת השרון (נחל הדסים) היא בעיקרה ביוב אורגני ושעיקר שאריות התרכובות ההידרוקרבוניות באות מהביוב התעשייתי של כפר-סבא (ישירות לנחל קנה) והביוב התעשייתי פתח תקוה-סגולה (נחל שילה).

העובדה שהאינדוקציה של EROD שנמדדה באמנוניים שמאתר הסכר החקלאי (CH) אינה רבה נגרמת כנראה לא מהעדר שאריות של מזהמים הידרוקרבוניים במי הירקון באתר זה אלא מהרעילות הגבוהה של מי הירקון באתר זה שלא מאפשרים לאמנוניים לשהות באתר מספיק זמן כדי לעורר את תהליך האינדוקציה.

פעילות EROD בכבד אמנוניים מהאתרים שבע ועשר טחנות (10M, 7M) היא גבוהה יחסית והיא נופלת אך במעט מזו שהובחנה באמנוניים מהאתר המזוהם ביותר – מורד נחל קנה (NK). מכאן הקטע המרכזי של הירקון תורם ללא ספק במידה משמעותית מאוד לזיהום הירקון המלוח בחומרים הידרוקרבוניים רעילים.

האינדוקציה המכסימלית של פעילות EROD התקבלה באמונים מאתר מורד נחל קנה (NK). רמת אינדוקציה זו הייתה כ- 50% מהאינדוקציה המכסימלית שקבלנו עד עתה בנסיונות חשיפה מבוקרת של אמונים לאינדוסר של ציטוכרום P4501A - β BNF (ראה BNF איור 5). מידת החשיפה של האמונים שבמי הירקון לשאריות מזהמים הידרוקרבוניים רעילים היא משמעותית ויש בה סיכון ביולוגי.

יש לציין עם זאת שהנתונים שהבאנו עד עתה הם הנתונים הקטליטיים. עדיין לא סיימנו את הקביעה האימונוכימית של רמת ציטוכרום P4501A במידגמים. קביעת רמת האינדוקציה של הציטוכרום מבוצעת עתה במעבדתינו. הנתונים על רמת האינדוקציה של חלבון הציטוכרום עצמו אמורים להוסיף מימד נוסף להבנת הממצאים.

התמונה שהתקבלה עם הביואינדיקטור AChE בזימים מראה חשיפה רבה של האמונים לשאריות אורגנוזרחניים וקרובמטים החל מאתר מורד נחל קנה (NK) ובהמשך מורד הנחל (איור 5). פעילות gills-AChE באמונים מהאתרים שלפני חיבור נחל קנה לירקון הייתה נורמלית כמו בביקורת. החל ממורד נחל קנה במורד הירקון פעילות AChE בזימי האמונים מאתרי הדגימה השונים הייתה נמוכה באופן מובהק ($P < 0.05$) בהשוואה לפעילות זו באמונים מאתר שמעל לסכר שלפני כניסת נחל קנה (AK) ועד לאתר המעינות (AM). בקטע זה של הירקון, ממורד קנה ועד 7 תחנות נחשפים האמונים לשני סוגי המזהמים, הן לשאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרובמטים והן לשאריות פסולת הידרוקרבונית רעילה, שילוב הצופן בתוכו הגברה של רעילות של מי הירקון לאורגניזמים החיים.

עיקוב הפעילות של אצטילכולינאסטרו ניכר רק בזימים (gills-AChE) בעוד שהפעילות במוח (brain-AChE) לא הייתה שונה באופן מובהק בדגי האמנון שהתקבלו מאתרי הדגימה השונים, החל מהמעיינות וכלה בשבע תחנות, דבר המעיד שבמהלך איסוף הנתונים של סדרת בדיקות זו החשיפה לחומרי ההדברה מקבוצות האורגנוזרחניים והקרובמטים הייתה ברמה מתונה.

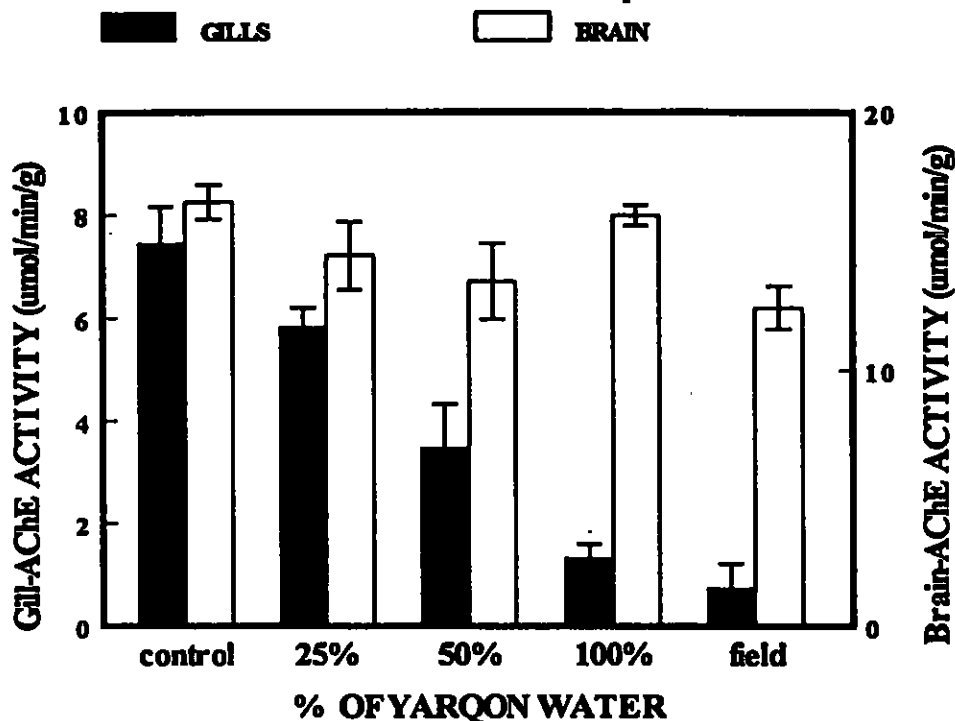
3. פיתוח נוהל לקביעת זיהום מים בשטח ע"י הבאת מדגמי מים למעבדה וחשיפת אמונים למיהולים שונים של מים אלה למשך פרקי זמן קבועים.

הצורך בפיתוח נוהל בדיקה שכזה הוא לשם בדיקת מדגמי מים מאתרים שבהם לא ניתן להציב כלובים עם אמונים בשל סיבות שונות כגון זיהום רב מידי של המים הגורם לתמותה מיידית של הדגים כפי שמתרחש באיזור המזוהם של הירקון ובעיקר בנחל קנה. גם עומס אורגני ומחסור בחמצן עשוי לגרום לתמותת דגים ולחוסר אפשרות של הצבת כלובים באתר מסויים. כן ישנם אתרים בהם הכלובים נפרצים או נגנבים. הפרמטרים הביוכימיים שיבדקו בשיטה זו הם פעילות AChE ואינדוקציה של ציטוכרום P4501A ופעילות EROD.

במקרה של קביעת חשיפה לאורגנוזרחניים וקרובמטים בעזרת פרופיל AChE זמן החשיפה יכול להיות קצר. באיור 6 מסוכס נסיון שבו הובא למעבדה מדגם מים מהירקון מאתר שבין שבע לעשר תחנות. האמונים נחשפו לשה"כ 6 ליטר של מים אלה ולשני דילולים שהכילו 25% ו- 50% של המים (עם מי מעיינות) למשך 3 ימים.

התוצאות מציגות יחס ברור שבין ריכוז ותגובה כאשר 100% של מי הירקון גרם לעיכוב פעילות AChE בזימים בשיעור דומה מאוד לזה שהתקבל באמונים ששהו בכלובים בשטח, באתר שממנו נלקח מדגם המים לקביעה המעבדתית.

Fig 6: AChE of Tilapia exposed 3 days to 6L of various dilutions of Yarqon water



הפעילות האנזימטית שעוכבה הייתה זו שבזימים ולא במוח דבר המתאים לחשיפה של הדגים לריכוזים נמוכים, טוב לטללים, שהאפקט הפיסיולוגי שלהם כנראה שאינו חמור מאוד מבחינת הדג.

4. שימוש באמנונים בכלובים לניטור חשד למקור זיהום בירקון - בית החרושת "סנו".

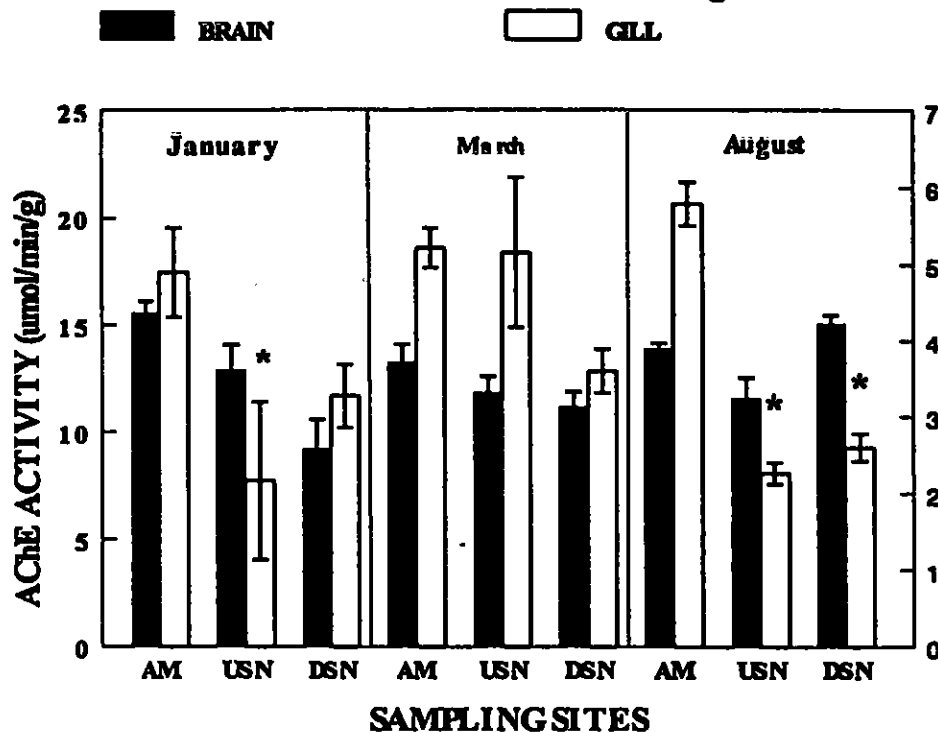
השתמשנו בשיטת האמנונים בכלובים בנסיון לאתר גורם החשוד בזיהום כרוני של מי הירקון, במקרה זה בית החרושת "סנו".

בהתאם לתוצאות שהתקבלו ומוצגים באיור 7 ניתן אכן לאבחן זיהום מי הירקון שנגרם כנראה ע"י "סנו" למשל באוגוסט 1998. הזיהום שנגרם גרם לעיכוב של AchE המצוי בזימים ולא של זה המצוי במוח ולכן מדובר על רמה נמוכה של שאריות.

העיכוב שהתקבל בפעילות AChE בזימי באמנונים שמעל למוצא השפכים של "סנו" (USN) לא שונה מזה שהתקבל במורד נחל הדס לאחר מוצא צינור השפכים של "סנו" (DSN) ולכן לא ניתן לקבוע בביטחון שאכן הזיהום נובע מ-"סנו".

יחד עם זאת, מהנסיון שהצטבר אצלנו ברור לנו שזרימת מי הירקון אינה מהירה מספיק כדי למנוע דיפוסיה של המזהמים במעלה הזרם.

**Fig. 7: AChE of Tilapia caged in Hadas
above/below Sano waste discharge**



5. שימוש באמנונים בכלובים לניטור חשד למקור זיהום בירקון - מתקן טיהור שפכים הוד השרון - כפר סבא, בריכת מי קולחין מטהורים לפני הזרמה לנחל הדס (HH)

מכון הטיהור כפר סבא והוד השרון מטפל בשפכים בהתבססו על שיטת הבוצה המשופעלת. לאחר תהליך הטיהור של השפכים, הקולחין מוזרמים לנחל הדס - קנה ומשם הם מגיעים לנחל הירקון.

במטרה לאבחן מציאות שאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים בקולחין של מכון טיהור השפכים כ"ס-הוד השרון הושמו דגי אמנון בכלוב בבריכה ההשבה המוזנת באופן רצוף במי קולחין לאחר שעברו טיפול ראשוני ושניוני. שמונה מחזורים של אמנונים הוחזקו בכלוב רשת בתקופה שבין : 4/99 - 11/98. משך השהיה של האמנונים בכלובים היה עד 9 ימים.

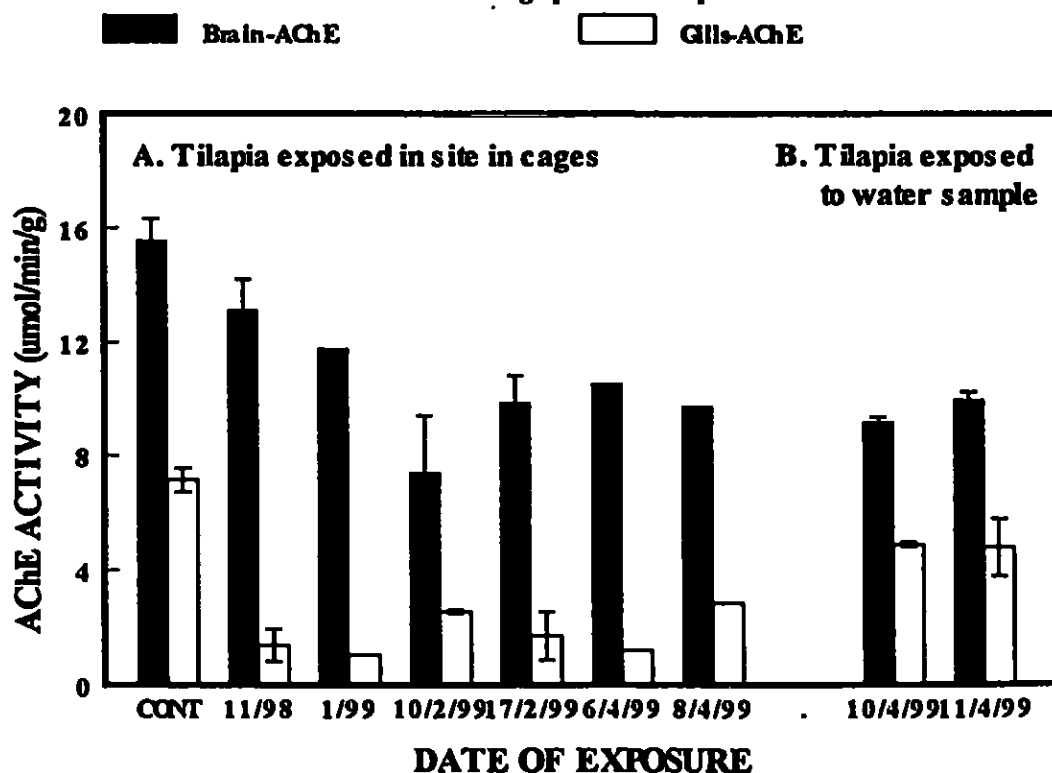
כמו כן, חשפנו למי הקולחין דגי אמנון שגודלו במעבדה באוניברסיטת תל אביב. מי קולחין אלה הובאו ישירות מבריכת ההשבה של מים במכון הטיהור והאמנונים שהו 48 שעות ב- 20 ליטר של מי הקולחין לפני שנקבעה פעילות הביומרקר AChE ברקמות הזימים והמוח שלהם. במטרה לאבחן המצאותם של שאריות חומרי הדברה מסוג אורגנוזרחניים וקרבמטים

טבלה 1. רמת עיכוב פעילות האנזים אצטילכולינאסטרז בזימים ובמוח אמנונים ששהו בכלובים במי הקולחין של בריכת ההשבה של מכון סיהור השפכים של הוד השרון - כפר סבא.

% עיכוב פעילות אצטילכולינאסטרז		% תמותה	מספר דגים	זמן שהיה (ימים)	הוצאה	הכנסה	מחזור
בזימים	במוח						
80.6	15.7	25	4	5	12.11.98	08.11.98	1
85.1	24.4	75	4	9	06.01.99	29.12.98	2
64.1	52.4	33	3	7	10.02.99	04.02.99	3
75.8	36.6	33	3	6	17.02.99	12.02.99	4
-	-	100	4	5	04.04.99	30.3.99	5
82.8	32.3	75	4	3	06.04.99	04.04.99	6
60.1	37.5	75	4	3	08.04.99	06.04.99	7
-	-	100	4	2	09.04.99	08.04.99	8

הממצאים מתוארים בטבלה 1, ובאיור 8.

FIG 8: AChE in Tilapia caged in Kfar-Sava sewage purification plant



הממצאים כפי שמובאים בטבלה 1 מראים על עיכוב של פעילות האנזים אצטילכולינאסטרזאז הן ברקמת המוח והן ברקמת הזימים באסופות הדגים ששהו במי הקולחין במחזוריים השונים בכל תקופת הניטור. במהלך המחקר הוכנסו בכל פעם שלושה עד ארבעה דגי אמנון לכלוב רשת שבבריכת מי הקולחין. כפי שניתן לראות מהתוצאות כי חלה תמותה גבוהה של למעלה מ- 50% במידגם הדגים בחלק מהמחזוריים השונים (טבלה 1). רמת עיכוב האנזים אצטילכולינאסטרזאז בזימים נמצאה כגבוהה מ- 50% בכל המידגמים. ובמחצית מן המידגמים הגיעה רמת העיכוב של האנזים בזימים ל- 80%. במקביל, ממוצע העיכוב של האנזים במוח במידגמים השונים הגיע ל- 33.2%. תוצאות אילו מורות על חשיפה של הדגים לרעלי עצב מסוג אורגנוזרחניים וקרבמטים. הרמה הגבוהה של עיכוב האנזים AChE הן ברקמת הזימים והן ברקמת המוח מלמד על שיעור גבוהה של שאריות קוטלי חרקים אלה במי הקולחין דבר המסביר גם את התמותה הגבוהה של האמנונים באסופות הדגים ששהו במי הקולחין.

בעקבות התמותה הגבוהה במחזוריים של חודשי מרץ – אפריל נלקחו 25 ליטר מי קולחין ישירות ממתקן הטיהור למעבדה באוניברסיטת תל אביב שם נחשפו למים אלה אמנונים למשך 48 שעות. ניתוח התוצאות של פעילות אצטילכולינאסטרזאז הן במוח והן בזימים של האמנונים שנחשפו למי הקולחין מורה על חשיפה לחומרי הדברה מסוג אורגנוזרחניים וקרבמטים {איור 8}.

במקביל לבדיקת הדגים בשיטת פרופיל אצטילכולינאסטרזאז במעבדה באוניברסיטת תל אביב, נשלח מדגם אמנונים מאלה ששהו בכלוב במכון לטיפול בשפכים כפר סבא-הוד השרון וכן אמנונים שנחשפו במעבדה למדגם מי הקולחין לבדיקה כימית אנליטית במעבדות אמינולב בע"מ, לידי ד"ר אורי גולנר.

ברקמות של מדגם אמנונים מאלה ששהו בכלוב בבריכת המכון לטיהור השפכים נמצא ברקמת הזימים שאריות של קוטל החרקים האורגנוזרחני דיאזינון בריכוז של 0.05 ppm. ברקמות אמנונים שנחשפו למי הקולחין במעבדה נמצאו שאריות דיאזינון בריכוז של 0.03 ppm. במי הקולחין נמצא החומר דיאזינון ברמה של 0.57 ppb. בנוסף נמצא במי הקולחין החומר אתוקסיקווין בריכוז של 0.1 ppb. הממצא הכימי אנליטי מאשש לכן את הממצאים שהתקבלו בשיטת פרופיל אצטילכולינאסטרזאז של מציאות ריכוז משמעותי של חומרי ההדברה מסוג אורגנוזרחניים, ויתכן שגם קרבמטים, במי הקולחין של מתקן הטיהור.

תקציר

אינפורמציה בנוגע למידת זיהום נחל הירקון בהיבט רב שנתי, עונתי ואזורי התקבלו בעזרת הביומרקים: פרופיל אצטילכולינאסטרזאז בזימים ופרופיל אצטילכולינאסטרזאז במוח דגי האמנון. בזימי האמנונים ניתן היה להבחין מידה שונה של פעילות gill-AChE בקטעים שונים של הירקון. בקטע המוצא והמעיינות הפעילות הייתה נורמלית או מתקרבת לנורמלי. בקטע של האזור החקלאי הפעילות הייתה נמוכה, ולעיתים נמוכה מאוד, והיא נשארה נמוכה גם בקטע שבין 10 טחנות עד לשבע טחנות. הפעילות הנמוכה בזימים מלמדת שהחל מקטע הירקון הגובל בשטחים חקלאיים הירקון מזדהם באופן כרוני בשאריות של חומרי הדברה. בקטע זה של הירקון חל עיכוב לא רק של פעילות אצטילכולינאסטרזאז בזימים, אלא גם עיכוב של האנזים שבמוח. ומכאן האמנונים בקטע זה של הירקון נחשפים לרמת שאריות כאלה של אורגנוזרחניים וקרבמטים שנגרם נזק פיסיולוגי לדגים.

מידת החשיפה של האמנונים לשאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים שבמי הירקון אינה שווה אלה שונה באופן מובהק בעונות השונות של השנה. פרופיל אצטילכולינאסטרז באמנונים שמהירקון, בעונת האביב מעיד שבעונה זו ישנה חדירה מתמדת של אורגנוזרחניים וקרבמטים למי הירקון. אך בדרך כלל בריכוזים שאינם פוגעים באופן חמור בפיסולוגיה של דגי האמנון. בעונת הקיץ ניכרת מגמה מובהקת של ירידה בפעילות AChE במורד הירקון, הן בזימים והן במוח. יוצאת מהכלל היא הרגנרציה של הפעילות הנורמלית של אצטילכולינאסטרז במוח האמנונים מאתר 7 טחנות (7M). בעונת הסתיו האמנונים נחשפים לרמות נמוכות של קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים ניתוח זה הוא של המצב השגרתי. יש לציין שבעונת הסתיו לאחר הגשמים, ובעיקר הגשמים הראשונים של העונה, חלה חדירה מסיבית של שאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים. מבחינת זיהום מי הירקון באורגנוזרחניים וקרבמטים עונת החורף היא התקופה שבה נמצאה החשיפה הנמוכה ביותר של אמנונים לקוטלי חרקים אלה, בהשוואה לשאר עונות השנה. יחד עם זאת הובחנה ירידה מוגבלת בפעילות AChE בזימים ובמוח אמנונים ממורד סכר נחל קנה (NK).

במטרה לאבחן מציאות שאריות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים בקולחין של מכון טיהור השפכים כ"ס-הוד השרון הושמו דגי אמנון בכלוב בבריכה ההשבה המוזנת באופן רצוף במי קולחין לאחר שעברו טיפול ראשוני ושניוני. כמו כן, נחשפו למי הקולחין דגי אמנון שגודלו במעבדה באוניברסיטת תל אביב. באמנונים שנחשפו בשתי הדרכים למי הקולחין נמצא עיכוב של פעילות AChE בשיעור של עד 80% בזימים ועיכוב של 33% של הפעילות הנורמלית ברקמת המוח.

בבדיקה כימית אנליטית במעבדות אמינולב ע"י ד"ר אורי גולנר נמצאו בזימים של אמנונים ששהו בכלוב בבריכת המכון לטיהור השפכים שאריות של קוטל החרקים האורגנוזרחני דיאזינון בריכוז של 0.05 ppm. ברקמות אמנונים שנחשפו למי הקולחין במעבדה נמצאו שאריות דיאזינון בריכוז של 0.03 ppm. במי הקולחין עצמם נמצא החומר דיאזינון ברמה של 0.57 ppb. בנוסף נמצא במי הקולחין החומר אתוקסיקווין בריכוז של 0.1 ppb. הממצא הכימי אנליטי מאשש לכן את הממצאים שהתקבלו בשיטת פרופיל אצטילכולינאסטרז של מציאות ריכוז משמעותי של חומרי ההדברה מסוג אורגנוזרחניים, ויתכן שגם קרבמטים, במי הקולחין של מתקן הטיהור.

בעזרת אמנונים בכלובים בוצע ניטור שמטרתו הייתה לאתר גורם החשוד בזיהום כרוני של מי הירקון, במקרה זה בית החרושת "סנו". בהתאם לתוצאות שהתקבלו ניתן אכן לאבחן זיהום מי הירקון שנגרם כנראה ע"י "סנו" אך העיכוב שהתקבל בפעילות AChE בזימי באמנונים שמעל למוצא השפכים של "סנו" (USN) לא שונה מזה שהתקבל במורד נחל הדס לאחר מוצא צינור השפכים של "סנו" (DSN) ולכן לא ניתן לקבוע בביטחון שאכן הזיהום נובע מ-"סנו". יש לבדוק האם מוצא השפכים של "סנו" הוא מתקן טיהור השפכים הוד השרון-כפר סבא.

בוצעו ניסיונות שדה של שימוש בביומרקר EROD, שהוא פעילות קטליטית ספציפית של ציטוכרום P4501A, לניטור חשיפה של אמנונים לשאריות תרכובות הידרוקרבוניות רעילות במי הירקון. מנתונים של ניסיונות של חשיפת אמנונים במעבדה ל-βNF שהוא אינדוסר של הציטוכרום התברר שניתן לגרום בדג האמנון לאינדוקציה של ציטוכרום P4501A ולכן מין דג זה יכול לשמש לשם ניטור חומרים מסוכנים מסוג זה במים. האינדוקציה לא גרמה לשינוי בפעילות AChE ברקמות המוח והזימים של הדגים המטופלים ומכאן ניתן להסיק שחשיפה לאינדוסרים של ציטוכרום P4501A לא גורמת לפגיעה בפעילות AChE ומכאן עיכוב פעילות האנזים בדגים מהשטח מבטאת באופן סלקטיבי חשיפה של האמנונים לקוטלי חרקים מסוג האורגנוזרחניים והקרבמטים.

הממצאים שהתקבלו מהירקון מראים מידה נמוכה של אינדוקציה של ציטוכרום P4501A ופעילות EROD בכבד כבר בחלקים שנחשבו נקיים יחסית בירקון והם המעיינות (AM), פרק אפק (PA), אבו ראבח (AR) והירקון לפני כניסת נחל קנה (AK). פעילות EROD בכבד האמנונים שנדגמו בתחנות השונות מראה מגמה מובהקת ($P < 0.05$) של עלייה עם מורד הירקון החל מהמעיינות (AM) ועד לאתר

שבע תחנות (7M). הדבר מעיד שיש הצטברות של תרכובות בעלות פעילות ביולוגית מסוכנת במהלך הזרימה של הירקון.

העובדה שאינדוקציה נמוכה של (EROD) נרשמה באמנונים שנחשפו למי הירקון באתרים שונים שבירקון הנקי יכולה לעורר חשד שהזיהום ההידרוקרבוני הרעיל מגיעה גם בדרך האויר ע"י שקיעה של חלקיקי פיח שאליהם ספוחים תרכובות אלה. מקור החלקיקים יכול להיות ארובות מפעלי תעשייה סמוכים או נפולת של ארובות תחנת הכוח רידינג. כדי לברר נקודה זו נבדק בהמשך את נתוני שושנת הרוחות באיזור ביחס למקורות האפשריים של זיהום האויר.

באתר מורד קנה (NK) רמת החשיפה של האמנונים היא הגבוהה ביותר ומידת הרעילות של מי הירקון לדגים היא רבה ורק לעיתים רחוקות האמנונים מסוגלים לשרוד באתר זה יותר ממספר ימים. הנתונים התקבלו לכן מדגים שנידונו באתר שלהם כנראה סבילות רבה במיוחד כלפי המזהמים הכימיים של מי הירקון באתר זה. מידת החשיפה של האמנונים לשאריות הידרוקרבונים רעילים בנחל הדס (HD) ונחל הדריס (OR) אינה רבה וניתן מכאן להסיק שתרומת הביוב של כפר סבא-הוד השרון (נחל הדס) וביוב רמת השרון (נחל הדריס) היא בעיקרה ביוב אורגני ושעיקר שאריות התרכובות ההידרוקרבוניות באות מהביוב התעשייתי של כפר-סבא (ישירות לנחל קנה) והביוב התעשייתי פתח תקוה-סגולה (נחל שילה).

פעילות EROD בכבד אמנונים מהאתרים שבע ועשר תחנות (10M, 7M) היא גבוהה יחסית והיא נופלת אך במעט מזו שהובחנה באמנונים מהאתר המזוהם ביותר - מורד נחל קנה (NK). מכאן שהקטע המרכזי של הירקון תורם ללא ספק במידה משמעותית מאוד לזיהום הירקון המלוח בחומרים הידרוקרבוניים רעילים. על זיהום הירקון המלוח בתרכובות הידרוקרבוניות רעילות דיווחנו בעבר לגבי דגי קיפון שנידונו באתרים ראש ציפור (DH) ושפך הירקון ליד רידינג (RID) לאחר שבכבד הקיפונים מאתרים אלה נמצאה אינדוקציה של ציטוכרום P4501A ובמקביל אינדוקציה של פעילות EROD.

נראה לכן שהירקון מזוהם בתרכובות הידרוקרבוניות רעילות שמקורם יכול להיות משפכים של תעשייה, מתחבורה, מנפולת אפר של ארובות תחנות כוח ומפעלי תעשייה, או משילוב של מקורות אלה. במבט ראשון נראה שמדובר בזיהום רצוף וכרוני לאורך כל הירקון החל ממוצא נחל קנה ועד לשפך, באם ניקח בחשבון את הממצאים שהתקבלו בעבר עם דגי בורי.

האינדוקציה המירבית של פעילות EROD בכבד אמנונים מהירקון היתה כאמור באמנונים שהתקבלו מאתר - מורד נחל קנה - NK, והיתה כ- 50% מהאינדוקציה המכסימלית שקבלנו עד עתה בנסיונות חשיפה מבוקרת של אמנונים לאינדוסר של ציטוכרום P4501A - β NF. מידת החשיפה שהתקבלה כאמנונים מהשטח משמעותית ומעידה לכן על מידת חשיפה של אמנונים לשאריות הזיהום הידרוקרבוניים במי הירקון שיש בה סיכון ביולוגי.

יש לציין עם זאת, שהנתונים כוללים עד עתה רק את הקביעה הקטליטית של ציטוכרום P4501A. עדיין לא סיימנו את קביעת הרמה של ציטוכרום P4501A במידגמים, ואנו מבצעים זאת עתה בשיטות אימונוכימיות. הנתונים שיתקבלו בהמשך על רמת האינדוקציה של הציטוכרום עצמו יוסיפו מימד חשוב ביותר לניתוח התוצאות.

תכנון המשך העבודה לשנת המחקר השנייה 1999-2000

1. ניטור זיהום המים באיזור שפך הירקון סביב תחנת הכוח רידינג, והירקון המלוח, בפסולת הידרוקרבונית רעילה ושאריות זרחנורגניים וקרובמטים בעזרת הביואינדיקטורים: אינדוקציה של ציטוכרום P4501A ועיכוב פעילות AChE בדגי אמנון.

דג האמנון נמצא על ידינו בנסיונות אינדוקציה ראשוניים כמתאים לפרוייקט הניטור. במקרה שיתעוררו קשיים של שימוש באמנונים כמין ביואינדיקטורי לקביעת זיהום המים במים מליחים נבצע חלק זה של המחקר בעזרת דגי קיפון.

האיזור שיבדק הוא מי הים סביב תחנת הכוח רידינג, מוצא צינור השפד"ן, אתר חיבור צינור המזוט של תחנת הכוח, המעגן ומוצא מי הקירור באיזור שפך הירקון והירקון המלוח מאתר תחילת הירקון המלוח ועד לשפך הירקון.

שיטת העבודה תהיה חשיפת אמנונים בכלובים לפרק זמן של כשלושה שבועות באתרים המפורטים להלן:

(SD) - מוצא צינור השפכים של השפד"ן, כ- 100 מטר מהחוף, צפונית למעגן הדלק של רידינג.

(RS) - אתר מילוי המזוט סמוך למצופי העגינה של מיכליות הדלק כ- 500 מטר בים, מערבית לתחנת רידינג.

(RM) - מעגן רידינג - סמוך לאתר השאיבה של מי הקירור לתחנה.

(RID) - שפך הירקון - רידינג.

(DH) - ראש ציפור אתר חיבור הירקון עם נחל איילון.

כיוון שמדובר כאן על חשיפה של אמנונים במים מליחים יבוצע הניטור בהתאם לתוכנית המפורטת להלן:

לכל ניסוי תיוחד מראש אסופת דגי אמנון שיעברו בדיקה מקדימה של תכולת ופעילות הביומרקרים המתאימים כדי לוודא שהדגים לא נחשפו לפני הגעתם למעבדה למזהמים מסוגים אלו שאת נוכחותם במי הירקון ושפכו בכוונתנו לבדוק.

אסופת הדגים תעבור אקלימציה במשך כחודש ימים למי ים במעבדה. חלק מהדגים שעברו אקלימציה ישמשו כביקורת, חלק יעברו טיפול באינדוסר מתאים של ציטוכרום P4501A כדי להשוות את מהלך האינדוקציה של הציטוכרום באמנונים המצויים במים מליחים. שאר האמנונים מאותה אסופה יחולקו בין הכלובים שיונחו באתרי הדיגום השונים כ- 6 אמנונים בכלוב.

2. המשך השימוש בביומרקרים ציטוכרום P4501A ו- AChE באמנונים לקביעת מידת החשיפה של הביוטה נחל הירקון לשאריות פסולת הידרוקרבונית רעילה וקוטלי חרקים מסוג האורגנוזרחניים והקרובמטים.

כדי להתגבר על הרעילות הגבוהה של מי הירקון באתרים שונים, כגון מורד נחל קנה או בשל קושי בהנחת הכלובים הנובע מסיבות שונות כגון גניבת הכלובים או חוס מים וזרימה גבוהה באתר מוצא מי הקירור של תחנת רידינג, נשתמש בשיטת חשיפה המפורטת להלן:

מי הירקון מאתרי הדיגום שיפורטו להלן יובאו למעבדה. המים עם או בלי מיהול, בהתאם לצורך, יוכנסו לאקווריומים. לכל אקווריום יוכנסו 60 ליטר מי ירקון ו- 5 אמנונים בגודל בינוני (כ- 15 ס"מ). המים יוחלפו פעמיים עד שלוש בשבוע במי ירקון שיובאו מאתרי הדגימה המתאימים. האמנונים יחשפו למים אלה במשך שלושה שבועות. לאחר תום מועד החשיפה יקבעו הביואינדיקטורים ציטוכרום P4501A ו- ACbE.

אתרי הדיגום יהיו:

(AM) אזור המעינות, מים מאתר זה ישמשו כביקורת,

(HH) - מתקן טיהור שפכים הוד השרון - כפר סבא, בריכת מי קולחין מטוהרים לפני הזרמה לנחל הדס,

(NK) - ירקון - אחר כניסת נחל קנה,

(7M) - אתר 7 תחנות,

(RO) - מוצא מי הקירור של תחנת רידינג.

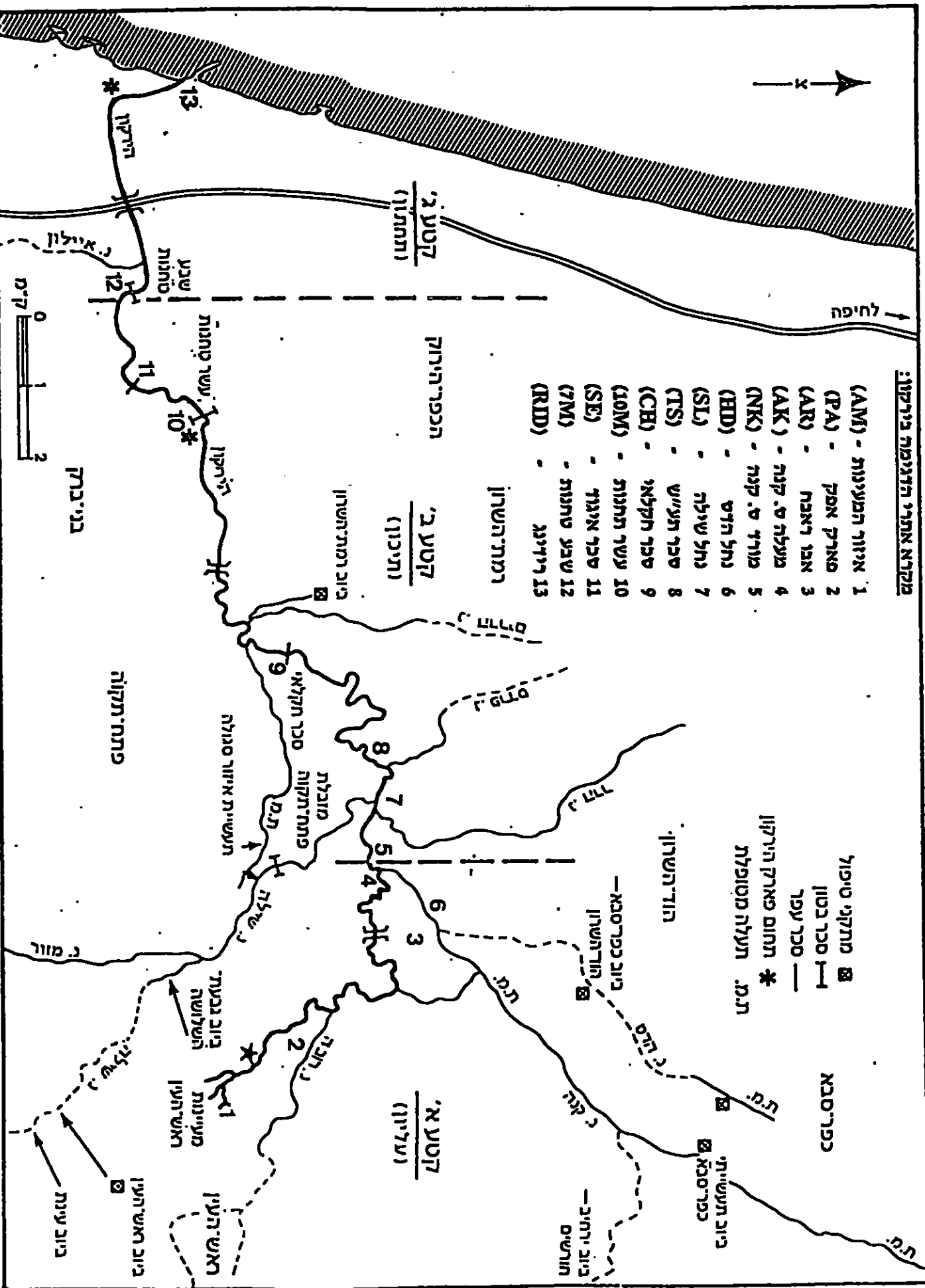
3. סיום האנליזה הכמותית של תכולת ציטוכרום P4501A במדגמים שנאספו מהאתרים השונים בנחל הירקון בשנת המחקר הראשונה ושבדו"ח זה נמסר לגביהם רק פעילות EROD.

4. ביצוע ניסיונות מעבדה לשם קביעת האפקט המשולב של חשיפה מקדימה של הדגים לשאריות פסולת תעשייתית על מידת הרעילות קוטלי חרקים אורגנוזרחניים וקרבמטים לדגים.

5. חקר האפקט של התנאים הפיסיולוגיים והכימיים הספציפיים לבית הגידול - נחל הירקון על כושר ההישרדות של מינים נוספים של דגי הירקון כגון הקרפיון שידוגו באתרי הדגימה השונים שלאורך הירקון.

מקרא אתרי הצינמה בירקון:

- 1 איזור המעיינות - (AM)
- 2 מארק אפק - (PA)
- 3 אבו ראבה - (AR)
- 4 מעלה ס. קנה - (AK)
- 5 מורד ס. קנה - (KA)
- 6 נחל הדס - (HD)
- 7 נחל שילה - (SL)
- 8 סבר תעיש - (TS)
- 9 סבר תקלאי - (CH)
- 10 עשר תחנות - (SM)
- 11 סבר איגוד - (SE)
- 12 שבע טחנות - (M)
- 13 רייזנג - (RD)



■ מתקני טיפול
 — סכר בטון
 — סכר עפר
 * תחום מארק הירקון
 ת.מ. תעלה מטופלת

אגן נחל הירקון