

ПАТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В ОРГАНІЗМІ МОЛЮСКІВ ЗА ДІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

*Досліджено вплив йонів важких металів на клітини миготливого епітелію, гепато-панкреаса, статевої залози *Lymnaea stagnalis* та миготливого епітелію *Batavusiana musiva*. Витримування *L. stagnalis* у воді з цими токсикантами призводить до відторгнення та злуцнення епітеліального шару, деструкції підстиляючих його тканин, дегенерації сполучної тканини травної та статевої залоз. У *B. musiva* за наявності йонів важких металів розвивається патологічний процес, який має фазний характер.*

Постановка проблеми

Небезпечність важких металів для гідробіонтів пов'язана з багаторічним збереженням їх у водних екосистемах і біологічною активністю багатьох із них. Після надходження у організм гідробіонтів важкі метали зв'язуються з реактивними групами білкових макромолекул та інших біологічно активних речовин (ферментів, гормонів). Через це вказані токсиканти впливають на обмін фізіологічно важливих речовин. Накопичуючи важкі метали, молюски потерпають від них навіть тоді, коли концентрація їх у воді незначна (нижче порогової). Крім того, концентруючи у собі отруйні речовини, гідробіонти самі стають токсично небезпечними.

Аналіз попередніх досліджень

Щороку з атмосфери на поверхню Світового океану випадає $2 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$ т свинцю, $2 \cdot 10^3$ – $3 \cdot 10^3$ т ртуті, $5 \cdot 10^2$ – $1,4 \cdot 10^4$ т кадмію і 10^3 – $3 \cdot 10^4$ т

миш'яку [7]. У донних відкладах – акумуляторах важких металів (Zn, Cu, Pb, Ni, Mo, Va, Ti) – концентрація останніх у 2–6 разів вища за таку у ґрунті [2].

У моллюсків щодо дії на них важких металів існують певні захисні механізми, які спричиняють адаптацію тварин до низьких концентрацій токсиканта та зумовлюють стійкість їх до його токсичного впливу. У клітинах моллюсків є металозв'язуючі білки, багаті на цистеїн та насичені SH-лігандами, через які утворюються комплекси з Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} [4, 13]. Так, устриці здатні акумулювати великі концентрації міді та цинку без будь-яких видимих токсичних ефектів [12]. Проте вже за наявності у водному середовищі 5 мг/л Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+} спостерігаються запальні процеси у зябрах двостулкових моллюсків: спочатку відбувається набрякання постлатеральних клітин, потім – міграція в епітелій гранулярних гемоцитів. Мідь викликає ендотеліальний набряк і деформацію частин зябрових філаментів, свинець – втрату війок латеральних клітин або відторгнення цих клітин, срібло – вакуолізацію ендотеліальних клітин [14].

Наявні у літературі відомості щодо впливу важких металів на організм прісноводних моллюсків стосуються дуже невеликої кількості видів і є уривчастими та неповними, що спонукало нас до проведення токсикологічних досліджень.

Матеріал і методика досліджень

Матеріалом служили 288 екз. ставковика озерного *Lymnaea stagnalis* L., зібраного в басейні р. Тетерів у період з 1997 по 2001 рр., та 110 екз. перлівниці *Batavusiana musiva gontieri* Bourguignat, 1881, зібраної в басейні р. Уж у період з січня по травень 2002 р.

Для виготовлення гістологічних зрізів матеріал фіксували рідиною Буена [5]. Серійні зрізи товщиною 5–10 мкм виготовляли за загально-відомою методикою [1]. Фарбування зрізів здійснювали гематоксиліном Гейденгайна – еозином [6]. Для просвітлення їх використано гвоздичне масло. Зрізи поміщали у канадський бальзам. Вимірювання досліджуваних структур здійснювали на постійних гістологічних препаратах за допомогою окуляр-мікрометра, відкаліброваного за різних збільшень мікроскопу МБИ-6 ($\times 20$, $\times 40$, $\times 90$). Гістологічні зрізи фотографували з-під мікроскопа МБИ-6 із мікрофотонасадкою МФН-3, використовуючи при цьому фотокамеру “Зеніт” з об’єктивом “Геліос”.

Об’єктом дослідження впливу важких металів на перлівницевих були ізольовані препарати миготливого епітелію зябер і переднього краю ноги цих моллюсків. У токсикологічних дослідах використано хлориди хрому, кадмію і цинку. Дослід проведено за описаною раніше методикою [8]. За допомогою мікроскопу БІОЛАМ Р–15 ($\times 203$) встановлювали час повного пригнічення активності війок миготливого епітелію, який позначили як показник тривалості їх биття.

Результати досліджень

При перебуванні піддослідних тварин у концентраціях сульфату міді, нижчих за $0,1 \text{ мг/дм}^3$, протягом 48 год. ніяких морфологічних змін у гістологічній структурі голови, ноги та гепатопанкреаса не відмічено.

За 1 мг/дм^3 токсиканту у воді вже через 24 год. після початку досліду спостерігається набрякання циліндричного миготливого епітелію голови та ноги. Форма його клітин зазнає значних змін, а саме – вони стають майже кубічними. При цьому епітеліальний шар починає потроху відставати від базальної мембрани. Однак цей процес носить локальний характер і спостерігається не у всіх особин, а приблизно лише у 30% ставковиків. За нашими спостереженнями, вплив сульфату міді на епітелій голови та ноги можна поділити на декілька фаз (табл. 1), а вищеописана картина гістологічних зрушень при цьому якраз і відповідає першій з них. При цій же концентрації токсиканту за 48-годинної експозиції у молюсків відбувається злушчування та відторгнення епітелію. Цей процес охоплює до 25% загальної поверхні тіла ставковиків і супроводжується руйнуванням міжклітинного цементу. Такий рівень ушкодження відповідає гістологічній картині другої фази впливу токсиканту на покриви тіла та вистилки порожнини легень.

*Таблиця 1. Відторгнення покривного епітелію у *L. stagnalis* за дії сульфату міді*

Час, год.	Концентрація, мг/дм^3				
	10000	1000	100	10	1
1					
3	4	4	3		
6		4	4		
12				1	
24				2	1
36				4	1
48					2

Примітка: “1–4” – фази ушкодження.

За 10 мг/дм^3 сульфату міді у воді чітко фіксуються перша та друга фази перебігу патологічного процесу (12 та 24 год. від початку експозиції відповідно), а за 100 мг/дм^3 через 6 год. від початку досліду спостерігається наступна (третя) його фаза. На ній патологічний процес заходить ще далі, а злушчення епітелію відбувається на ділянках, що становлять від 25 до 50% загальної поверхні тіла ставковика. Іноді ж спостерігається і інтенсивний цитоліз покривного епітелію. Через 12 год. від початку досліду з концентрацією полютанту у воді 100 мг/дм^3 зафіксовано четверту (останню) фазу дегенерації епітелію голови та ноги. Вона відрізняється від попередньої, перш за все, ступенем ушкодження покривів тіла (епітелій злушується на ділянках, що охоплюють понад 50% поверхні тіла тварин). Крім того, тут досить часто реєструються цитоліз та каріолізис.

Йони важких металів, проникаючи у сполучнотканинний та м'язевий шари, викликають тут деструктивні процеси, котрі призводять в решті рещт до руйнування значних ділянок цих тканин.

Витримування ставковиків у розчинах, які містять йони важких металів, супроводжується різким гальмуванням ендogenousного дихання у гепатопанкреасі, зниженням цитохромоксидазної активності та змінами окисно-відновного потенціалу [9]. Під дією цих токсикантів відбуваються деструктивно-некротичні зміни травної залози ставковика. Найголовнішими з них є деформація клітин і каріопікноз, каріорексис та каріолізіс клітин печінкової паренхіми, деструкція основної речовини сполучної тканини, тощо. Ми виділяємо такі фази (табл. 2) гістологічних зрушень гепатопанкреаса, які мають місце у перебігу процесу отруєння цих тварин. На першій з них (0,1 мг/дм³; 24–48 год.) спостерігаються незначні деструктивні зміни, які полягають, перш за все, у деформації клітин сполучної тканини.

Таблиця 2. Патологічні зміни гепатопанкреаса *L. Stagnalis* за дії сульфату міді

Час, год.	Концентрація, мг/дм ³					
	10000	1000	100	10	1	0,1
1	2	1				
3	4	3	3			
6		4	4	1		
12				2	1	
24				2	1	1
36				3	2	1
48					2	1

Примітка: "1–4" – фази ушкодження.

Друга фаза (1 мг/дм³; 36–48 год.) характеризується дегенерацією клітин сполучної тканини та клітин стінок ацинусів, з'являються перші ознаки деструкції клітинних елементів сполучної тканини, котра втрачає при цьому свої цементуючі властивості (рис. 1). Іноді спостерігається плазморексис, який відбувається внаслідок втрати тваринами частини тканинної води. Однак усі вищеописані явища на цій фазі отруєння молюсків зачіпають зазвичай лише незначні за площею ділянки залози. За 10 мг/дм³ (36 год. після початку досліду) на третій фазі отруєння процеси ці посилюються, а руйнація охоплює до 40–50% сполучної тканини гепатопанкреаса. Посилюється також процес руйнування вапнякових та печінкових клітин. Звичайним для цієї фази є й ушкодження сполучнотканинної капсули, що оточує травну залозу. Остання – четверта фаза патологічних змін гепатопанкреаса (100 мг/дм³; 6 год. від початку експозиції) – супроводжується подальшим поглибленням усіх цих процесів, а обсяг зруйнованих тканин при цьому, як правило, значно перевищує 50%.

Друга фаза – це фаза підвищення активності. На цьому етапі процесу отруєння мобілізуються захисні властивості організму і активуються відповідні фізіологічні та біохімічні процеси. Концентрації $1 \cdot 10^{-3}$ – $3 \cdot 10^{-2}$ г/дм³ йонів хрому, $5 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-3}$ г/дм³ йонів цинку, $3 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ г/дм³ йонів кадмію викликають збільшення тривалості биття війок миготливого епітелію на 25.7–41.7% порівняно з контролем.

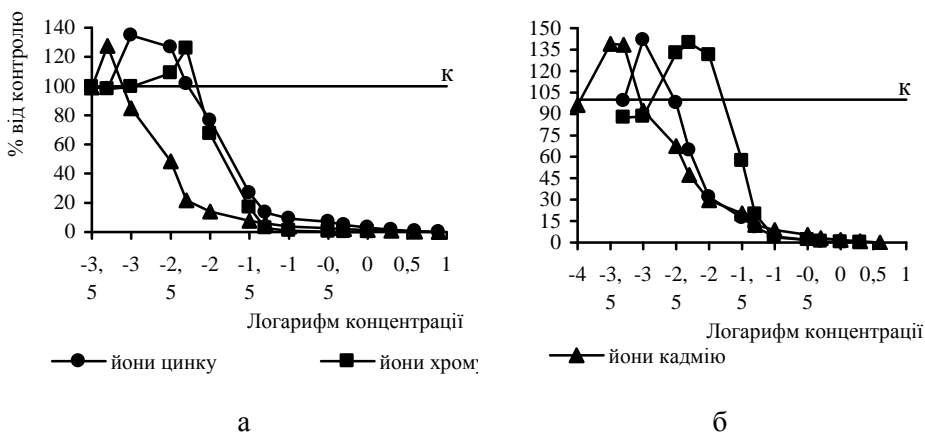


Рис. 2. Залежність тривалості биття війок миготливого епітелію зябер (а) і ноги (б) *B. musiva* (% від контролю) від концентрації йонів важких металів у розчині

Найбільш токсичним із досліджених йонів важких металів для переживаючих клітин миготливого епітелію перлівницевого є кадмій. Концентрації його у середовищі, котрі викликають початкові стадії процесу отруєння, та концентрації йонів кадмію, що спричиняють різке скорочення тривалості биття війок миготливого епітелію, набагато менші, ніж йонів хрому та цинку. Незважаючи на той факт, що цинк вважається найменш токсичним для гідробіонтів серед обраних важких металів, отримані нами відомості свідчать, що миготливий епітелій має до нього вищу чутливість, ніж до хрому.

Третя фаза процесу отруєння – депресія. Вона відповідає концентраціям $3 \cdot 10^{-2}$ – 2 г/дм³ Cr^{3+} , $3 \cdot 10^{-2}$ – 8 г/дм³ Zn^{2+} , $5 \cdot 10^{-4}$ – 8 г/дм³ Cd^{2+} . У межах цих концентрацій відбувається скорочення тривалості биття війок миготливого епітелію порівняно з контролем. Четверта і п'ята фази, які зазвичай швидко йдуть одна за одною, – це сублетальна і летальна. Вони спостерігаються за 2 – 16 г/дм³ Cr^{3+} , 8 – 32 г/дм³ Zn^{2+} , 8 – 64 г/дм³ Cd^{2+} у розчині. На першій з них відбувається миттєве припинення биття війок миготливого епітелію після стикання досліджуваного матеріалу з розчином токсиканту, на другій – воно відсутнє.

Найбільші руйнування клітин миготливого епітелію спостерігаються за дії на молюсків кадмію. Хром і цинк викликають невеликі зміни в

клітинних мембранах [10]. Катіони важких металів у розчині концентруються поблизу поверхні цитоплазматичної мембрани, утворюючи подвійний електричний шар. Вони знижують величину поверхневого потенціалу і підвищують проникність мембрани. Внаслідок цього спостерігається масова втрата клітинами йонів Mg, Ca, K, необхідних для нормальної життєдіяльності [11]. Падіння потенціалу на мембрані призводить до розладнання дихання і фосфорилування [3]. Зменшення метаболічної активності, а саме: зниження дегідрогеназної активності і вмісту АТФ, супроводжується сповільненням биття війок миготливого епітелію.

Порушення йонами важких металів цитоплазматичної мембрани клітин миготливого епітелію зафіксовано також нами. На початкових етапах руйнування цих структур за дії летальних концентрацій вказаних токсикантів спостерігається вихід цитоплазми назовні крізь пошкоджені ділянки клітинних мембран. Цей процес посилюється в умовах тривалої дії високих концентрацій йонів важких металів і ускладнюється поступовим відокремленням клітин одна від одної.

Висновки

Важкі метали викликають у ставковика суттєві дегенеративно-некротичні зрушення. Витримування *L. stagnalis* у воді з цими токсикантами призводить до відторгнення та злущення епітеліального шару, деструкції підстилаючих його тканин, тобто до руйнації всіх покривів їх тіла, дегенерації сполучної тканини травної та статеві залоз, а потім і їх структурних елементів (ацинусів).

Різка зміна середовища, викликана інтенсивним зростанням концентрації йонів важких металів у воді, призводить до порушення біохімічних та фізіологічних процесів у організмі перлівницевих, що згодом неодмінно викличе сповільнення темпів росту та скорочення тривалості життя моллюсків, а надалі – повне зникнення популяції у забрудненій акваторії.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження будуть направлені на виявлення впливу важких металів, що найширше розповсюджені у водному середовищі, на інших прісноводних моллюсків класу *Gastropoda* і класу *Bivalvia* з метою установлення видів, найстійкіших щодо дії цих токсикантів та видів, які зазнають найбільших пошкоджень за умов перебування в середовищі з важкими металами.

Література

1. *Захваткін В.О.* Посібник з мікроскопічної техніки. – Львів: Вид-во Львів. держ. ун-ту, 1961. – 77 с.
2. *Зубкова Е. П.* Тяжёлые металлы в донных отложениях р. Днестра и Дубоссаровского водохранилища // Гидробиол. журн. – 1996. – 32, № 4. – С. 94–102.

3. Кагава Ясуо. Биомембраны / Пер. с яп. А. А. Селищевой. – М.: Высш. шк., 1985. – 303 с.
4. Коновалов Ю. Д. Металлосвязывающие белки зрелых яиц рыб // Гидробиол. журн. – 2000. – 36, № 1. – С. 64–75.
5. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностран. литер., 1962. – С. 751–762
6. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. – М.: Совет. наука, 1957. – 467 с.
7. Христофорова Н. К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжёлыми металлами. – Л.: Наука, 1989. – 192 с.
8. Черномаз Т. В. Реакция клеток мерцательного эпителия перловицевых моллюсков на действие тяжелых металлов // Гидробиол. журн.– 2003.– 39, № 6.– С. 90–94.
9. Babu G., Ramesh Rao P. Venkateswara. Effect of copper sulphate on respiration, electron transport, and redox potential in the digestive gland of the snail-host, *Lymnaea luteola* // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. – 1985. – 34, №3. – P. 396–402
10. Gabridge M. G., Dougherty E. P., Gladd M. F., Meccoli R. A. Effects of heavy metals on structure, function and metabolism of ciliated respiratory epithelium *in vitro* // In Vitro. – 1982. – 18 (12). – P. 1023–1032.
11. Gadd G., Gadd M., Mowll J. L. The relationship between cadmium uptake potassium release and viability in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Microbiol. Letteres. – 1983. – № 16. – P. 45–48.
12. Howard A. Y., Nickless G. Heavy-metal complexation in polluted molluscs. II. Oysters (*Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*) // Chem.-Biol. Interact. – 1977. – 17. – P. 157–263.
13. Roesijadi G. Low molecular weight, mercury-binding proteins in the gills of the mussel // Estuaries. – 1981. – 4, N 3. – P. 283.
14. Sunila I. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants // J. Invertebr. Pathol. – 1988. – 52, N 1. – P. 137–141.