

УДК 594.38:576.895.122:591.5

**ВПЛИВ ІОНІВ МІДІ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ГІСТОМЕТРИЮ  
ГЕМОЦИТІВ І ДЕЯКІ ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ВИТУШКИ  
(MOLLUSCA: GASTROPODA: PULMONATA: BULINIDAE)  
У НОРМІ ТА ЗА ІНВАЗІЇ ЇЇ ТРЕМАТОДАМИ**

**Г. Киричук, А. Стадниченко**

*Житомирський державний університет імені Івана Франка  
вул. Велика Бердичівська, 40, Житомир 10008, Україна  
e-mail: Stadnychenko@yandex.ru*

Наведено матеріали щодо впливу на гістометрію гемоцитів і деякі кількісні показники гемолімфи *P. purpura* трематодної інвазії та різних концентрацій іонів міді водного середовища. Показано, що за дії цих чинників відбувається зміна розмірів і об'єму клітинних елементів гемолімфи і їхніх ядер. Змінюються також кількість гемоцитів в 1 мм<sup>3</sup> гемолімфи і процентне співвідношення гемоцитів різних типів.

*Ключові слова:* *Planorbarius purpura*, гемоцити, трематодна інвазія, іони міді.

Внутрішнє середовище моллюсків представлено сукупністю гемолімфи і тканинної рідини, котрі забезпечують гуморальний зв'язок між усіма їхніми органами і тканинами. Гемолімфа – особлива рідка тканина. Вона складається з плазми і завислих у ній клітин – формених елементів, частка яких у гемолімфі становить (за об'ємом) 1–2% [14]. Формені елементи гемолімфи – багатофункціональні клітини. Вони відіграють транспортну, екскреторну, захисну роль (беруть участь у фагоцитозі, лейкоцитозі, інкапсуляції) [4, 5, 7, 15, 19]. Тому важливою умовою забезпечення життєздатності моллюсків є збереження стабільності їх внутрішнього середовища. Порушення його можливі за дії чинників як зовнішнього середовища (вплив полутантів, у тому числі й іонів важких металів), так і середовища внутрішнього (вплив ендопаразитів).

Завданням нашого дослідження було з'ясувати вплив іонів міді водного середовища на гістометрію гемоцитів і деякі кількісні гематологічні показники гемолімфи витушки пурпурної у нормі та за інвазії її партенітами і личинками трематоди *Echinoparyphium aconiatum* Dietz. Дотепер подібні дослідження не проводилися.

Результати дослідження доцільним буде враховувати при здійсненні біотестування у системі біологічного моніторингу стану природних вод.

Матеріалом дослідження стали 670 екз. сухих мазків гемолімфи витушки пурпурної *Planorbarius purpura* (O.F. Müller, 1774), зібраних у червні–вересні 2004–2005 рр. у водоймах і водотоках басейну р. Тетерів (околиці Житомира). Гемолімфу отримували повним знекровленням тварин. Фіксацію мазків здійснювали сумішшю Нікіфорова. Фарбували їх азур-еозином. Цито- і каріометричні показники отримано застосуванням загальноприйнятих методик [2]. Ядерно-цитоплазматичні індекси розраховано за Ташке [11]. Спостереження за живими гемоцитами проведено у вологій камері (у „вісячій” краплі) за слабого забарвлення їх розчином нейтрального червоного. Підрахунок кількості клітин гемолімфи здійснювали у камері Горяєва.

У токсикологічних дослідах використано тварин, підданих 14-добовій аклімації до лабораторних умов. Їх по 5–7 екз. утримували у ємностях (3 л) з дехлорованою відстоюванням (доба) водопровідною водою (рН 7,2–7,6; вміст кисню 8,6–9 мг/л; t = 21–23°C).

Молюсків підгодовували мацерованими у воді протягом 5–6 діб шматочками (2×2 см) білокачанної капусти.

Токсикологічні досліді (орієнтаційний і основний) поставлені за методикою Алексеева [1]. Орієнтаційним дослідом встановлено значення для міді летальних концентрацій:  $LK_0=0,001$  і  $LK_{100}=1$  мг/дм<sup>3</sup>. Графічним способом визначено [10] величину  $LK_{50}=0,05$  мг/дм<sup>3</sup>. В основному (хронічному) токсикологічному досліді (експозиція – 14 діб) використано концентрації, котрі відповідають 0,5; 2; 5; 10 ГДК (ГДК токсикологічне)<sup>1</sup>. Для приготування розчинів використано відстояну водопровідну воду і хлорид міді  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (ч.д.а.). Розрахунок концентрації проведено на іон міді.

Для виявлення трематодної інвазії з тканин гепатопанкреаса виготовляли тимчасові гістологічні препарати, котрі досліджували під мікроскопом МБИ–3 (10×20). Видову належність трематод визначали [6] виключно на живому матеріалі за одночасного забарвлення трематод слабкими розчинами нейтрального червоного і нільського блакитного. Для дослідження з числа заражених молюсків було відібрано тільки тих, які були інвазовані партенітами (редії) і розповсюджувальними личинками (церкарії) однієї трематоде – *Echinoparyphium aconiatum* Dietz. Марити її є кишковими паразитами водоплавних птахів.

Формені елементи гемолімфи у *P. purpura*, як і в інших червононогих легеневих молюсків, утворюються з камбіальних (адвентиціальних) клітин у трабекулах сполучної тканини легень [16] і мішкоподібної частини нирок [18]. Там відбувається формування прогемоцитів, які опісля, на думку деяких дослідників [20], дають початок еозинофільним мікрогранулоцитам і базофільним гранулоцитам<sup>2</sup>, тобто гемоцитам спеціалізованим. На думку ж інших авторів [5], усі три типи гемоцитів формуються внаслідок диференціуючого розвитку камбіальних клітин.

**Прогемоцити** – найдрібніші з усіх формених елементів гемолімфи *P. purpura* (табл. 1). Ці клітини, як і їхні ядра, округлої форми. Цитоплазма гомогенна (гіалінова), базофільна. Ядерно-цитоплазматичний індекс дуже високий. Прижиттєві спостереження свідчать, що ці гемоцити здатні фагоцитувати дрібні сторонні часточки.

**Еозинофільні мікрогранулоцити** майже у 3 рази більші за прогемоцити (табл. 1). На сухих мазках вони округлої форми, у „висячій” же краплі виявляють чималу рухову активність, утворюючи численні псевдоподії (переважно філоподії, рідше – лобоподії). Ядро округле. Цитоплазмі властива густа дрібна еозинофільна зернистість. Ядерно-цитоплазматичний індекс значно менший від такого у прогемоцитів. За вітальними спостереженнями, здатність до фагоцитозу у них відсутня. Натомість за поранень вони забезпечують „аглотинацію”<sup>3</sup>.

**Базофільні гранулоцити** близькі за своїми розмірами до гемоцитів попереднього типу (табл. 1). І клітини, і їхні ядра округлі (останні лише у дуже старих клітин бобовидні, часто – пікнотизовані). Ядерно-цитоплазматичний індекс більший за такий у еозинофільних мікрогранулоцитів. Відзначаються високою здатністю до фагоцитозу [7, 15, 19].

Частина їх перетворюється на екскреторні клітини – нефроцити, у цитоплазмі яких спостерігаються від 1–2 до кількох десятків темнозабарвлених вакуолей. За нашими при-

<sup>1</sup> Для міді зараз прийнято такі значення ГДК (за іоном міді): органолептичний – 1, токсикологічний – 0,001 мг/дм<sup>3</sup> [3].

<sup>2</sup> Класифікацію гематоцитів прийнято за Восталом [20].

<sup>3</sup> Збивання клітин у грудочки і закупорювання ними порушень цілісності циркуляторної системи. Справжня аглотинація у молюсків неможлива через відсутність фібриногену [16].

Таблиця 1

Показники гістометрії гемоцитів *P. purpura*

Гемоцити	Діаметр, мкм		Об'єм, мкм <sup>3</sup>		Ядерно-цитоплазматичний індекс
	клітини	ядра	клітини	ядра	
Прогемоцити	1,25±0,002	1,12±0,002	1,02±0,004	0,74±0,003	2,68±0,005
Еозинофільні мікрогранулоцити	3,56±0,086	1,27±0,019	27,23±1,90	1,17±0,11	0,068±0,005
Базофільні гранулоцити	3,66±0,069	1,81±0,069	17,01±1,15	4,34±0,46	0,27±0,015

життєвими спостереженнями, як і за відомостями інших авторів [4, 5], екскреторні клітини забарвлюються нейтральним червоним набагато інтенсивніше, ніж інші базофільні гранулоцити.

За трематодної інвазії відбуваються статистично вірогідні зміни переважної більшості гістометричних показників (табл. 2). Так, збільшуються розміри еозинофільних мікрогранулоцитів і базофільних гранулоцитів (у 2,5 і 1,2 разу відповідно) та їхніх ядер (в 1,5 і 1,3 разу) ( $P > 99,9\%$ ). У цих же категорій гемоцитів зростає об'єм клітин і їхніх ядер: у перших із них у 2, 5 і 3 відповідно, у других – в 1,7 разу ( $P > 99,9\%$ ). Отже, з трьох груп гемоцитів, наявних у гемолімфі *P. purpura*, означені вище гістометричні зрушення, зумовлені дією паразитарного чинника, наявні лише у гранульованих гемоцитів і відсутні у прогемоцитів, які виявилися дуже стійкими щодо шкодочинної дії на них паразитів. Наголосимо на тому, що у прогемоцитів, інвазованих трематодами, зберігається стабільність ядерно-цитоплазматичного індексу, тоді як у еозинофільних мікрогранулоцитів він зменшується в 1,1, а у базофільних гранулоцитів зростає в 1,3 разу.

Паразити впливають не лише на гістометричні характеристики гемоцитів гемолімфи *P. purpura*, але й на деякі інші кількісні її показники. У інвазованих особин зростає кількість гемоцитів в 1 мм<sup>3</sup> гемолімфи (рис. 1). Отже, у них посилюється процес кровотворення. Це є свідченням того, що *P. purpura* шкодочинній дії трематод успішно протиставляє свої захисно-приспосувальні можливості. Це – неспецифічна захисно-приспосувальна реакція, характерна для всіх гідробіонтів [9]. В основі її лежить піднесення інтенсивності загального обміну речовин до такого рівня, котрий забезпечує можливість збереження життєздатності особин протягом певного відтинку часу. У заражених трематодами особин змінюється і процентне співвідношення різних груп гемоцитів

Таблиця 2

Показники гістометрії гемоцитів *P. purpura*, інвазованих трематодою *Echinoparyphium aconiatum*

Гемоцити	Діаметр, мкм		Об'єм, мкм <sup>3</sup>		Ядерно-цитоплазматичний індекс
	клітини	ядра	клітини	ядра	
Прогемоцити	1,24±0,007	1,11±0,007	0,99±0,015	0,724±0,012	2,65±0,018
Еозинофільні мікрогранулоцити	4,90±0,168	1,94±0,126	69,08±6,725	3,80±0,5621	0,06±0,007
Базофільні гранулоцити	3,68±0,111	2,33±0,088	28,56±2,512	7,52±0,729	0,36±0,023

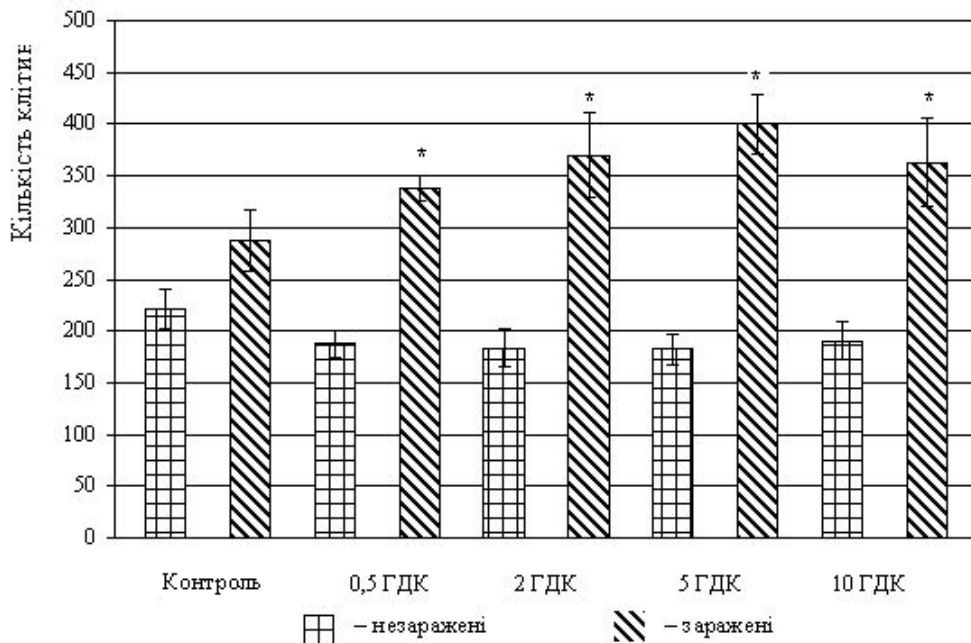
(табл. 3). Воно полягає у зменшенні в їх гемолімфі процентного вмісту прогемоцитів з 66 до 59% за рахунок збільшення на 7% вмісту везикулярних клітин. Процентний вміст гранульованих формених елементів залишається незмінним.

Для тваринних організмів, у тому числі і для прісноводних червононогих легеневих моллюсків, мідь є важливим мікроелементом. Фізіологічна активність міді пов'язана, головним чином, із включенням її до складу активних центрів окислювально-відновлювальних ферментів [12]. Водночас надлишкові кількості міді здійснюють на них токсичний вплив.

За 0,5–10 ГДК іонів міді у водному середовищі розміри прогемоцитів і їхніх ядер лишаються незмінними. Натомість вже за 0,5 ГДК токсиканта діаметр еозинофільних мікрогранулоцитів зростає на 9, а базофільних гранулоцитів – на 25%. У заражених тварин ці показники зменшуються на 19 і 17% відповідно ( $P > 94,5\%$ ).

За 2 ГДК іонів міді у воді в неінвазованих *P. purpura* триває, порівняно з попередньою концентрацією, збільшення розмірів гранулоцитів – на 42% перших із них і на 67% – других ( $P > 99,9\%$ ). В інвазованих же *P. purpura* має місце статистично ймовірне зниження значень цих показників. Подальше збільшення концентрації іонів міді (до 5 і 10 ГДК) жодних зрушень обговорюваних показників не викликає. Вони залишаються на тому ж рівні, котрий відзначено за концентрації токсиканта, що дорівнює 2 ГДК.

Розміри ядер еозинофільних мікрогранулоцитів за усіх використаних у досліді концентрацій іонів міді стабільні. Натомість у базофільних гранулоцитів за 0,5 ГДК іонів міді зареєстровано зменшення їхніх ядер на 30% ( $P = 98,6\%$ ). За 2–10 ГДК токсиканта жодних змін згаданого показника не відбувається. Щодо інвазованих тварин, то у них за 0,5 ГДК іонів міді зменшуються розміри ядер у обох категорій гранульованих клітин: у еози-



Вплив іонів міді на кількість гемоцитів в  $1 \text{ мм}^3$  гемолімфи *P. purpura* у нормі та за дії трематодної інвазії.

Таблиця 3

Вплив різних концентрацій іонів міді на співвідношення (%) клітинних елементів гемолімфи *P. purpura* у нормі та за інвазії її трематодами

Клітинні елементи	Контроль	0,5 ГДК	2 ГДК	5 ГДК	10 ГДК
Прогемоцити	66,19	43,02	25,22	18,53	33,66
	59,09	26,39	23,72	16,34	28,60
Еозинофільні мікрогранулоцити	14,40	13,96	34,22	37,65	26,62
	14,67	26,39	24,94	45,77	26,73
Базофільні гранулоцити	12,31	28,54	24,00	24,11	22,47
	11,25	36,11	30,78	29,43	35,20
Везикулярні клітини	7,10	14,48	16,56	19,51	17,25
	14,99	11,11	20,56	8,47	14,99

**Примітка.** У чисельнику наведено дані, котрі стосуються неінвазованих, у знаменнику – інвазованих особин.

нофільних мікрогранулоцитів на 36 ( $P=94,5\%$ ), у базофільних гранулоцитів на 47% ( $P>99,9\%$ ). При застосуванні вищих концентрацій токсиканта (2 ГДК–10 ГДК) обговорюваний показник залишається без змін.

Об'єм усіх типів гемоцитів за дії на *P. purpura* іонів міді водного середовища у діапазоні концентрацій 0,5–10 ГДК суттєвим зрушенням не підпадає. Щодо об'єму ядер, то у незаражених тварин за 0,5 ГДК токсиканта він зменшується у базофільних гранулоцитів на 76, у інвазованих особин – на 87% ( $P>99,9\%$ ). За цих же обставин скорочення об'єму ядер еозинофільних мікрогранулоцитів у інвазованих тварин становить 73% ( $P>99,9\%$ ). Ядерно-цитоплазматичний індекс за усіх концентрацій токсиканта в усіх піддослідних тварин відповідає нормі.

Найменша концентрація іонів міді, за якої спостерігається зменшення в  $1 \text{ мм}^3$  гемолімфи кількості прогемоцитів, – це 5 ГДК. Воно здійснюється на фоні збільшення такої еозинофільних мікрогранулоцитів і базофільних гранулоцитів. Останнє набагато інтенсивнішим є у заражених тварин.

У межах концентрацій 0,5–10 ГДК іонів міді у воді змінюється процентне співвідношення клітинних елементів у гемолімфі (табл. 3). Зі збільшенням концентрації токсиканта в межах 0,5–10 ГДК як у незаражених, так і в інвазованих тварин спостерігається зменшення частки прогемоцитів за рахунок збільшення таких еозинофільних мікрогранулоцитів і базофільних гранулоцитів. Проте в інвазованих особин цей процес виражений яскравіше, ніж у вільних від інвазії тварин. Так, якщо в незаражених *P. purpura* за 0,5 ГДК іонів міді у воді процентна частка прогемоцитів у гемолімфі зменшується в 1,4, то в заражених тварин – у 2,6 рази ( $P>99,9\%$ ), що вказує на більше гальмування у них гемопоезу. При цьому у других із них частка еозинофільних мікрогранулоцитів збільшується у 2,6 ( $P>99,9\%$ ), у перших же залишається на рівні норми. Це означає, що незаражені моллюски виявляються більш витривалими щодо дії на них

токсичного чинника порівняно з інвазованими трематодами тваринами. Останні, аби протистояти сукупній дії паразитів і токсиканта, посилюють утворення еозинофілних мікрогранулоцитів, що сприяє піднесенню рівня „аглотинації”, обмежуючи або взагалі припиняючи тим самим внутрішні кровотечі, які виникають при ушкодженні паразитами гепатопанкреаса. За інвазії стрімкіше зростає і процентна частка базофілних гранулоцитів. Цим певною мірою забезпечується фагоцитоз фрагментів зруйнованої трематодами міжацинарної сполучної тканини і клітин, котрі утворюють стінки ацинусів гепатопанкреаса.

Отже, іони міді водного середовища у концентраціях, які відповідають 0,5–10 ГДК, не впливають на гістометричні ознаки прогемоцитів гемолімфи *P. purpura*. Натомість у гранульованих гемоцитів спостерігається статистично вірогідне зрушення розмірів і об'єму як клітин формених елементів, так і їхніх ядер на фоні стабільного ядерноцитоплазматичного індекса. Молюски, інвазовані редіями і церкаріями *E. Aconiatum*, є більш чутливими порівняно з вільними від інвазії особинами щодо дії на них іонів міді водного середовища. Гістометричні зрушення, котрі виникають у них за згаданих обставин, зазвичай виражені чіткіше. Аналогічні спостереження стосуються і таких кількісних гематологічних показників, як кількість гемоцитів в 1 мм<sup>3</sup> гемолімфи та процентне співвідношення у ній формених елементів різних типів.

1. *Алексеев В. А.* Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента // Гидробиол. журн. 1981. Т. 17. С. 92–100.
2. *Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І.* Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології. Житомир: Полісся, 2005. 288 с.
3. *Гусева Т. В., Молчанова Я. П., Заша Э. А.* и др. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды. М.: Эколайн, 2000. 127 с.
4. *Заварзин А. А.* К сравнительной гистологии крови и соединительной ткани. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953а. 378 с.
5. *Заварзин А. А.* Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953б. 716 с.
6. *Здун В. І.* Личинки трематод в прісноводних молюсках України. К.: Вид-во АН УРСР, 1961. 141 с.
7. *Кедровский Б. В.* О клетках крови беззубки // Зоол. журн. 1924. Т. 4. С. 220–233.
8. *Лакин Б. Ф.* Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.
9. *Маляревская А. Я.* Биохимические механизмы адаптации гидробионтов к токсическим веществам // Гидробиол. журн. 1985. Т. 21. С. 70–82.
10. *Прозоровский В. Б.* О выборе метода построения кривой летальности и определения средней летальной зоны // Журн. общ. биол. 1960. Т. 21. С. 201–223.
11. *Ташкэ К.* Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. Бухарест: Изд-во АН СРР, 1980. 191 с.
12. *Харченко Т. А., Тимченко В. М., Ковальчук А. А.* и др. Гидроэкология украинского участка Дуная и сопредельных водоемов. К.: Наук. думка, 1993. 327 с.
13. *Ушин Н.* Опыт прижизненного окрашивания соединительной ткани и крови беззубки. Изв. НИИ при Пермск. ун-те. Пермь: Б. и., 1928. Т. 6. С. 31–33.
14. *George W. C., Ferguson J. H.* The blood of gastropod molluscs // J. Morphol. 1950. Vol. 21. P. 70–82.

15. Hill R. B., Welsh J. H. Blood cells / Physiology of Mollusca. N.Y.; London: Acad. Press, 1966. Vol. 2. P. 162–174.
16. Müller G. Morphologie, Lebensablauf und Bildungsort von *Lymnaea stagnalis* L. // Z. zeliforsch. 1956. Bd. 44. S. 519–556.
17. Nolf P. Contribution a l'étude de la coagulation du sang (6<sup>e</sup> mèm.). Le sang des invertébrés contient-il de la thrombine? // Arch. Intern. Physiol. 1909. T. 7. P. 246–251.
18. Pan T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. Bull. Mus. Compar. Zool. Harv. College. Harvard, 1958. Vol. 119. P. 238–299.
19. Rondelaud D., Barthe D. Etude descriptive d'une réaction amibocytaire chez *Lymnaea truncatula* Müller infestée par *Fasciola hepatica* L. // Z. Parasitenk. 1980. Bd. 64. S. 187–196.
20. Vostal Z. Príspevok k cytológii hemocytov ulitnikov (Gastropoda) // Biologia (ČSSR), 1969. T. 24. S. 384–392.

**THE INFLUENCE OF WATER ENVIRONMENT COPPER IONS ON  
HAEMOCYTES AND SOME QUANTATIVE CHARACTERISTICS  
OF THE HAEMOLYMPH OF THE COIL (*MOLLUSCA: GASTROPODA:*  
*PULMONATA: BULINIDAE*) NORMAL AND BY TREMATODA INVASION**

**G. Kirichuk, A. Stadnychenko**

*Ivan Franko State University of Zhytomyr  
40, V. Berdichevska St., Zhytomyr 10008, Ukraine  
e-mail: Stadnychenko@yandex.ru*

Presented data were obtained during the investigation of the influence of trematoda invasion and various concentrations of the water environment copper ions on the histometrics and some quantitative characteristics of haemolymph of the *P. purpura*. The change of the size and the volume of the cells and their nucleus, quantitative of haemocytes in 1 mm<sup>3</sup> of haemolymph and percentage attitude of the various type of haemocytes have been described.

*Key words:* *Planorbarius purpura*, haemocytes, trematoda invasion, copper ions.

Стаття надійшла до редколегії 18.04.07

Прийнята до друку 30.07.07