

TBTC1 독성에 의한 대복, *Gomphina veneriformis* 소화선의 미세구조적 변화 및 지방갈색소 축적

박정준¹, 이정식²

¹국립수산과학원 병리연구과, ²전남대학교 수산해양대학 수산생명의학과

Ultrastructural Changes in digestive gland and Lipofuscin Accumulation of the Equilateral Venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae) on Tributyltin chloride (TBTCI) Toxicity

Jung Jun Park¹ and Jung Sick Lee²

¹Pathology Division, NFRDI, Busan 619-705, Korea

²Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of tributyltin (TBT) on histopathological and ultrastructural changes in the digestive gland structure of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis*. Experimental period was 36 weeks. Experimental groups consist of control condition and 3 TBTCI exposure conditions (0.4, 0.6, 0.8 TBTCI $\mu\text{g L}^{-1}$). Outer envelop of the visceral mass of *G. veneriformis* exposed to TBTCI was observed disappearance of microvilli and cilia, decrease of mucous cell and partially destruction of epithelium. In the digestive gland showed an increase of number of hemocyte and mucopolysaccharide near the digestive tubule at early time of the exposure. Especially, in 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ group, collapse of digestive tubule with modification of epithelium was observed. TEM observation revealed the numerous glycogen granules in epithelium of the outer envelop and connective tissue. In the ciliated cell of the primary duct formed the cilia in cytoplasm. Basophilic cell was observed destruction of the rough endoplasmic reticulum and mitochondria. Also, nucleus in the epithelium of the digestive tubule was disappeared heterochromatin and nucleolus, and condense. As the concentration of TBTCI increased, the accumulation of lipofuscin increased in the digestive gland, but the collapse of digestive tubule induced a decrease of accumulation of lipofuscin.

Keywords: *Gomphina veneriformis*, ultrastructural change, digestive gland, lipofuscin, TBT

서 론

미환경부 (EPA)는 내분비계장애물질 (EDCs; endocrine disrupting chemicals) 을 생물의 항상성 유지, 생식활동, 발달 및 행동을 유지시키는 체내 호르몬의 기능 (합성, 분비, 특정 기관계로 이동, 세포 결합, 작용 및 특정물질 제거) 장애를 유발하는 외인성 물질이라고 정의하였다 (EPA, 1997).

유기주석화합물 (organotin compounds) 중 하나인 TBT (tributyltin) 는 1850년대 처음 발견된 이후 1960년대부터 선박방호용 페인트로 많이 이용되어왔다 (Yamada *et al.*, 1992). 하지만 1970년대 프랑스의 아카송만의 굴의 폐각기형 현상이 처음 보고된 이후 오염지역의 조사 및 독성실험 통해서 굴의 성장억제 및 폐각기형을 유발하는 것으로 보고되었다 (Waldock and Thain, 1983). 이후 1971년 Smith는 복족류의 암컷에서 수컷의 생식기가 발달되는 현상을 imposex라고 명명한 후 전세계 많은 지역에 서식하는 복족류에서 imposex가 보고되었다 (Gibbs and Bryan, 1986; Horiguchi, *et al.*, 1994; 2000; Chiavarini *et al.*, 2003). 더욱이 TBT는 생식 뿐만 아니라 기관계의 구조적 변화를 유도하여 기능적인 장애를 초래한다는 사실이 여러 연구자들에

Received November 30, 2009; Revised January 5, 2010; Accepted January 26, 2010

Corresponding author: Jung Jun Park

Tel: +82 (61) 569-3172 e-mail: jjpark@nfrdi.go.kr

1225-3480/24337

의해서 보고 되어왔다 (Rasmussen *et al.*, 1983; Regoli and Orlando, 1994; Quinn *et al.*, 2004).

이러한 유기주석 화합물의 유해성 때문에 국제해사기구 (International Maritime Organization; IMO) 에서는 "선박의 유해 방호시스템 사용 규제 국제협약"을 통해 2003년 1월 1일부터 TBT를 주성분으로 하는 선박용 페인트 등의 새로운 도포를 금지하기로 하였고, 2008년 1월 1일 이후 기 도포되어 있는 TBT를 주성분으로 하는 선박용 페인트 등을 선체로부터 완전 제거 또는 동 페인트가 해수로 용출되지 않도록 도막을 도포하도록 하고 있다 (Anonymous, 2001). 하지만 해수에서 TBT의 반감기는 수일에서 수주 정도인 반면, 해양 퇴적물에서는 수개월에서 수십년 이상이기 때문에 해수에서 TBT의 공급원이 차단된다 하더라도 TBT를 함유한 해양퇴적물이 오염원의 제공지로 작용하여 주변에 서식하는 수서생물들에게 지속적으로 영향을 줄 수 있다 (Adelman *et al.*, 1990. de Mora *et al.*, 1989).

이매패류의 소화선 (digestive gland)은 다수의 관 (tubule)들이 위와 연결된 구조를 하고 있으며, 이들의 주 기능은 세포내 소화이다. 여러 연구자들은 이매패류의 기관계 중에서 TBT가 가장 많이 축적되는 기관계는 소화선이라고 보고 하였으며 (Morrison, 1993; Gomez-Ariza *et al.*, 2000), 이 매패류들은 주로 저질 내에 서식하면서 여과섭식에 의해 먹이를 섭취하므로 오염물질은 체내에 쉽게 축적되지만 체내에서의 해독 (detoxification)과 체외방출은 낮기 때문에 해양저질과 수질의 오염상태를 알아보기 위한 지표종으로 많이 사용되고 있다 (Siah *et al.*, 2003).

지방갈색소 (lipofuscin)란 노화색소세포로서 외부에서 유입된 물질들을 용해시킨 이차용해소체 (secondary lysosome) 는 분해되어 용해소체 막을 통과하여 세포질 안으로 들어가게 되는데, 이때 더 이상 분해되지 않는 물질이 용해소체 내에 남아있으면서 다양한 지방과립과 전자밀도가 높은 과립을 가지고 있는 물질을 일컫는다 (Bubel, 1989). 따라서 EDCs에 의한 해양 연체동물의 영향에 관한 기존의 연구들에서 오염원에 의한 생물지표로써 지방갈색소의 축적이 사용되어져 왔다 (Viarengo *et al.*, 1990; Mathew and Damodaran, 1997)

본 연구의 목적은 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 TBTCI에 만성노출 시킨 대복, *Gomphina veneriformis* 소화선의 미세구조적인 변화를 관찰하고, 조직화학적 방법을 이용하여 지방갈색소의 축적을 증명하여 향후 이매패류를 이용한 TBT의 모니터링 연구에 있어서 지방갈색소의 biomarker 이용 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 대복, *Gomphina veneriformis*은 2005년 10월에 강원도 주문진읍 연안 (37°54' 27.23" N, 128°49' 38.95") 에서 채집한 각장 30.00-35.00 mm의 성체로서 개체수는 125개체였다.

2. 방법

1) 사육조건

채집한 개체들은 실험실로 운반하여 실험 수조에 약 2주 동안 순치시켰다. 순치기간 동안 수온, pH 등과 같은 환경상태를 측정하고, 사망개체는 사육수조 안에서 즉시 제거하였다. 본 실험에서 사용한 수조는 30 L의 지수형 순환 여과식 사육 유리 수조로써 사육수의 양은 실험 25 L로 일정하게 유지하였으며, 수조의 내부는 실험종의 서식환경과 비슷한 저질 환경을 제공하고자 채집지역의 모래를 두께 10 cm 정도 깔아 주어 실험개체들의 저질잡입이 가능하도록 하였다. 실험기간은 2005년 10월 25일부터 2006년 7월 3일까지 36주 동안 시행하였다. 실험기간 동안 광주기와 온도는 인위적인 조절 없이 자연조건으로 설정하였으며, 먹이는 *Isochrysis galbana* 3-4 × 10⁵ cell mL⁻¹를 2일에 1회씩 공급하였다. 실험기간 동안 실험 개체들의 배설물에 의한 pH의 변화 및 배설물 처리 그리고 수중의 TBTCI 농도를 일정하게 조절해 주기 위하여 먹이 공급시 사육수의 2/3를 교환하였고, 각 노출구의 설정 농도에 따라 교환 해수의 양에 맞춰서 TBTCI을 재 투입하였다.

2) 오염원

사용된 오염원은 tributyltin chloride (TBTCI; [CH₃(CH₂)₃]₃SnCl, Sigma) 를 acetone (CH₃COCH₃, Junsei) 으로 10,000 mg L⁻¹ 농도인 stock solution을 만든 다음 dimethyl sulfoxide (DMSO; (CH₃)₂SO, Junsei) 를 이용하여 100 mg L⁻¹ 농도인 substock solution을 만들었다. TBTCI substock solution은 각각의 TBTCI 노출 실험 수조에 희석하여 사용하였다.

3) 실험구

TBTCI 노출실험에 노출구의 농도를 정하기 위해 TBTCI을 인위적으로 노출시키지 않은 수조를 대조구로 하였으며, 두 차례에 걸친 예비실험을 통하여 LC₉ (20.0 μg TBTCI L⁻¹) 의 1/25 농도인 0.8 μg L⁻¹을 가장 높은 농도구로 정하고, 그보다 낮은 0.6과 0.4 μg L⁻¹를 농도구로 설정하였다.

4) 결과분석

(1) 광학현미경 관찰

광학현미경 표본을 위해 절취한 시료들은 Drury and Wallington (1980)의 방법에 따라 aqueous Bouin's fluid

에 24시간 동안 고정하고, 24-48시간 동안 흐르는 물에 수세하였다. 그 후 70%부터 100%까지 각각 40분 동안 에탈올을 이용한 단계별 탈수과정 후 xylene에 의한 치환 과정을 거쳐서 paraplant (McCormick, USA) 에 포매하였다. 포매된 시료는 microtome (RM2235, Leica, Germany) 을 이용하여 4-5 μm 두께로 연속 절편하여 슬라이드 글라스에 부착하였다.

광학현미경 표본제작에 사용된 염색과 반응은 Mayer's hematoxylin-eosin (H-E) 염색과 alcian blue-periodic acid and Schiff's solution (AB-PAS, pH 2.5) 반응 및 Masson's trichrome으로 확인하였다. 또한 lipofuscin을 관찰하기 위해 Long Ziehl-Neelsen 염색을 시행하였다. 이후 완성된 조직표본들은 광학현미경 (BX50F4, Olympus, Japan) 으로 관찰하였다.

(2) 전자현미경 관찰

전자현미경 조직표본 제작은 Cormack (2001)의 방법에 따라 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액으로 2-3시간 동안 전 고정하였으며, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 로 20분 동안 2-3회 수세 하였다. 그 후 1% osmium tetroxide (OsO_4) (Sigama) 로 1-2시간 후 고정한 후, 0.1 M phosphate buffer로 20분 동안 2-3회 세척하고, ethanol을 이용하여 70%부터 100%까지 각각 30분 동안 단계별로 탈수하였다. TEM을 이용하여 관찰하기 위한 표본들은 propylene oxide로 30분씩 2회 치환하고, 에폭시 수지로 포매 (60°C dry oven에서 36-48시간 동안 중합) 한 1-0.5 μm 두께의 semithin section을 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. TEM 관찰 절편은 ultramicrotome (MT-X, RMC, Germany)을 이용하여 두께 70 nm로 section 한 다음 grid에 올려서 uranyl acetate-lead citrate으로 염색하고, TEM (H-7500, Hitachi, Japan) 으로 관찰하였다. SEM을 이용하여 관찰하기 위한 표본들은 amyl acetate로 30분씩 2회 치환하고, CO_2 가스로 임계건조 (critical point drying) 한 다음 1분 동안 금이온 증착 (gold ion particle coating)하여 SEM (S-3000N, Hitachi, Japan) 으로 관찰하였다.

(3) 염색 친화도 판정

조직화학적 반응 후 점액세포의 염색 친화도 판정은 Pantone® Formula Guide coated first edition 2002 (Pantone Inc., USA) 를 기준으로 고유번호를 () 안에 표시하였다.

(4) 조직화학적 변화양상의 정량화

조직화학적 변화양상들 (상피층 두께, 지방 갈색소 분포 비율)을 정량화하기 위해 매 채집시기 마다 농도별로 5개체씩 화상 분석장치 (IMT, Visus, U.S.A)를 사용하여 분석하였다. 실험구들의 소화선세관 상피층 두께 (μm)를 조사하기 위해 개체 당 40-50회 측정하여 평균 두께를 계산하였다.

$$\text{Distribution of mucous cell} = \frac{\text{mucous cell area } (\mu\text{m}^2)}{\text{epidermal layer area } (\mu\text{m}^2)} \times 100$$

소화선 조직의 Long Ziehl-Neelsen 염색 시 적갈색으로 나타나는 지방갈색소의 분포 비율은 아래의 식으로 계산하여 백분율 (%)로 나타냈다.

$$\text{Distribution of lipofuscin} = \frac{\text{lipofuscin area } (\mu\text{m}^2)}{\text{digestive gland area } (\mu\text{m}^2)} \times 100$$

(5) 유의성 검증

대조구에 대한 농도구들의 유의적인 차이 ($P < 0.05$) 를 알아보기 위한 통계처리는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 one way ANOVA 처리 후 사후분석으로 Dunnett 방법을 시행하였다.

결 과

1. 대조구

대복의 내장낭 외막은 단층의 상피층이 근육층과 생식소 그리고 소화기관과 소화선과 같은 다양한 내장구조를 둘러싸고 있는 구조이다 (Fig. 1A). 단층의 상피층은 섬모세포와 상피세포 그리고 소수 점액세포로 구성되어 있으며, 섬모세포와 상피세포는 세포의 기저부에 핵이 존재하는 원주형이다 (Figs. 1B; 2A). 이들 상피층의 자유면에는 선조연과 섬모들이 잘 발달되어 있었다 (Figs. 1B; 2A and B). 또한 상피층의 안쪽에 존재하는 근육층은 다수의 근섬유다발들이 조밀하게 엮어있는 단단한 구조로서 부위에 따라 두께는 다양하였다 (Fig. 1B).

TEM 관찰 결과, 내장낭을 둘러싸고 있는 외막의 상피층을 구성하는 세포들은 상피세포와 섬모세포 그리고 분비세포들이며, 이들 세포들은 단층으로 구성되어 있었다 (Fig. 3). 외막의 상피세포들은 길이 10 μm 내외로 폭이 좁고 길이가 긴 전형적인 원주형으로서 세포의 자유면에는 길이 약 1 μm 의 미세 융모대가 형성되어 있었다. 세포의 기저부에는 장방형의 핵이 존재하고 있었으며, 이들 핵은 잘 발달된 핵막과 핵의 내부에는 이형염색질과 진정염색질이 관찰되었다. 핵의 상부에는 전자밀도가 높은 다수의 용해소체들이 존재하였으며, 세포질의 상부에는 다수의 미토콘드리아들이 관찰되었다. 이들 섬모세포들은 인접한 세포들과 부착반 그리고 부착띠로 연결되어 있

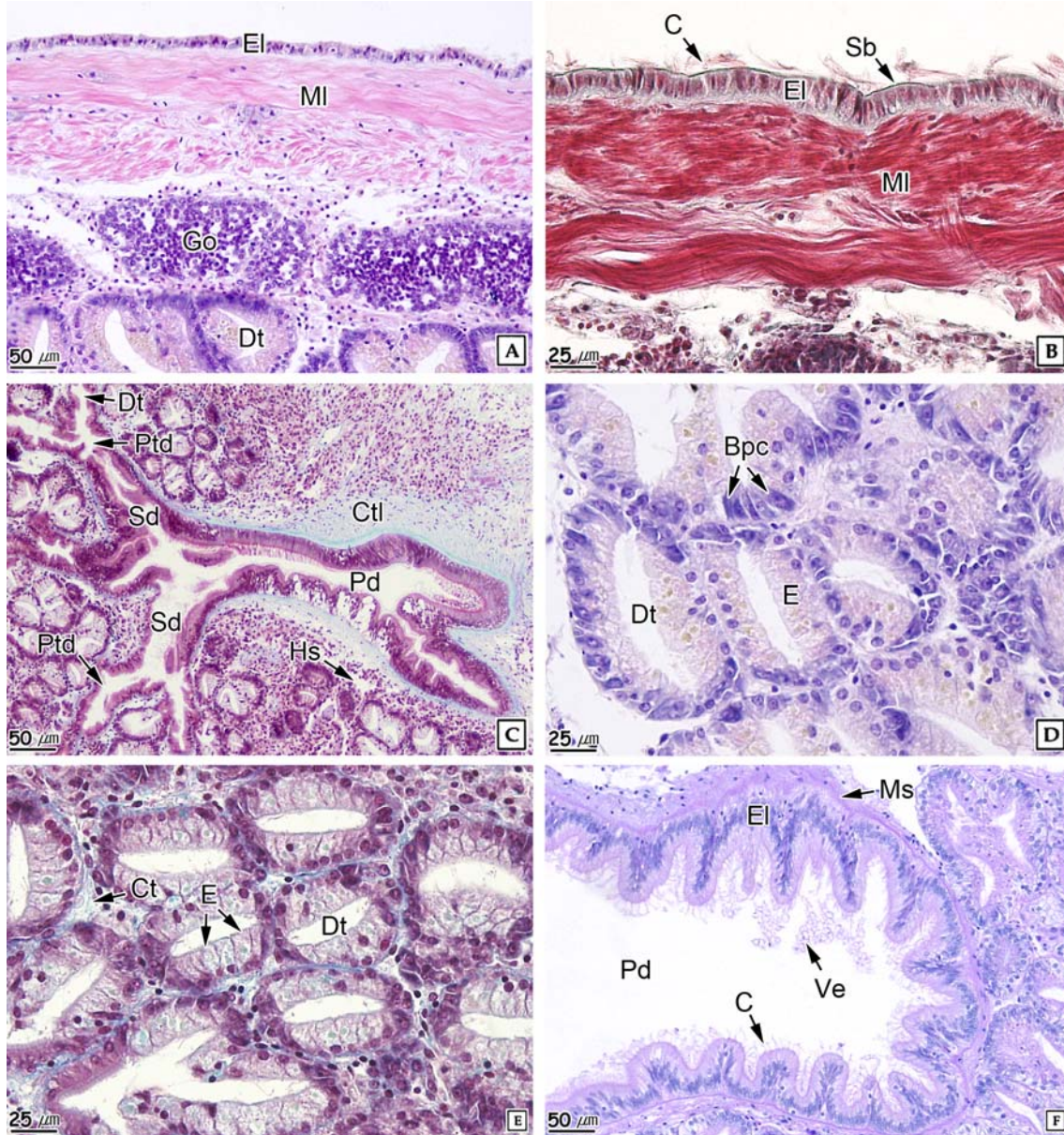


Fig. 1. Histological feature of the outer envelope of the visceral mass in the equilateral vein, *Gomphina veneriformis*. **A:** Cross section, note visceral mass constructed simple epithelium (EI), muscle layer (MI), gonad (Go) and mid-gut gland. H-E stain. **B:** Epidermal layer, showing the cilia (C) and striated border (Sb) on the free surface. Masson's trichrome stain. **C:** Ducts in mid-gut gland, note primary duct (Pd) seems like stomach and secondary duct (Sd) lead pretubular duct (Ptd). Masson's trichrome stain. **D:** Digestive tubule, note showing the basophilic cell (Bpc) and digestive cell (Dc) in the epidermal layer. H-E stain. **E:** Digestive tubule, note thin connective tissue (Ct) surrounded digestive tubules. Masson's trichrome stain. **F:** Primary duct, showing the alcian blue negative mucosubstance (Ms). AB-PAS (pH2.5). Dt, digestive tubule; EI, epidermal layer; Ve, vesicle.

었다 (Fig. 3A). 분비세포들은 상피층과 결합 조직층에 분포하고 있으며, 분비과립들은 전자밀도가 낮은 섬유성 과립으로 분비과립 사이에는 전자밀도가 높고, 크기가 다양한 과립들이 존재하고 있었다 (Fig. 3B). 상피층의 하단에 존재하는 근육

층에는 직경 약 9 nm의 근섬유들이 가로와 세로로 존재하고 있었다 (Fig. 3C).

대복의 소화선은 키가 큰 원주형 상피세포와 원주형의 거깃 중층상피세포들로 구성되어 있는 primary duct, primary

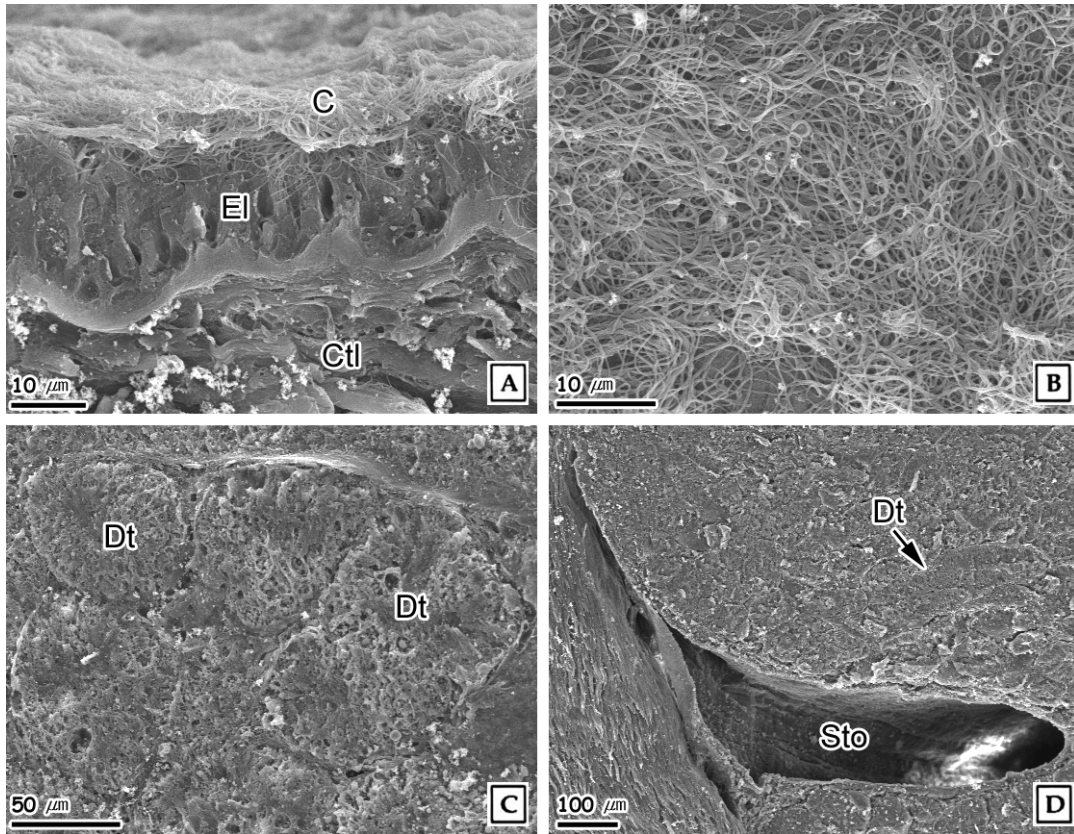


Fig. 2. Scanning electron micrographs of the digestive gland of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis*. **A:** Outer envelope, showing the epidermal layer (El) having ciliated simple epithelium. **B:** Frontal view, note numerous cilia (C) on the free surface of the epidermal layer. **C:** Mid-gut gland, showing numerous digestive tubule (Dt). **D:** Mid-gut gland, showing a stomach (Sto) and numerous digestive tubule. Ctl, connective tissue layer.

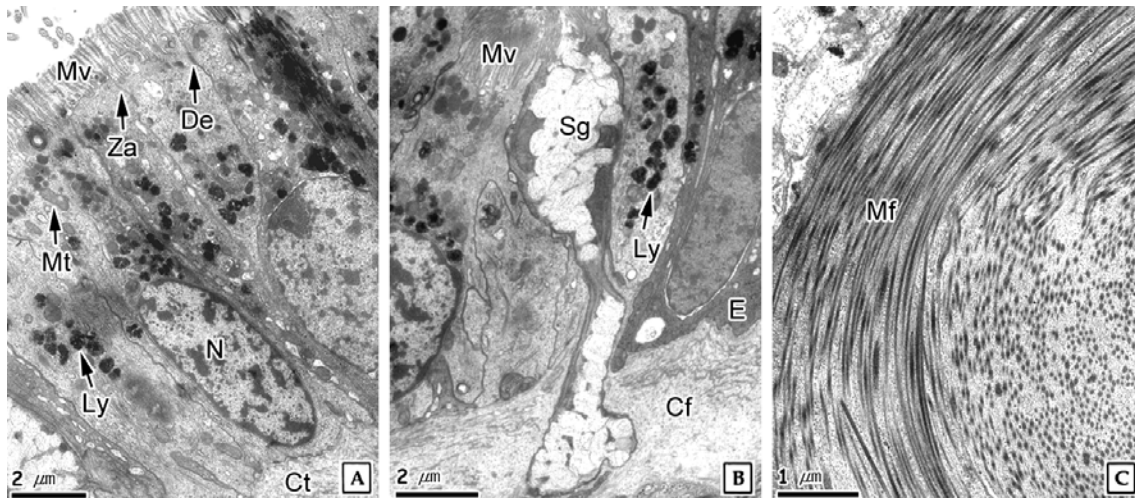


Fig. 3. Ultrastructure of the visceral mass of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis*. **A:** Long columnar epithelium in the epidermal layer, showing the numerous lysosome (Ly) and oval shape nucleus (N) in cytoplasm and microvilli on free surface of the cell. **B:** Secretory cell, note the containing secretory granules (Sg) with fibrous materials. **C:** Connective tissue layer, note cross and longitudinal sectioned muscular fiber (Mf). Cf, collagen fiber; De, desmosome; Gg, glycogen granules; Mv, microvilli; Za, zonula adhaerens.

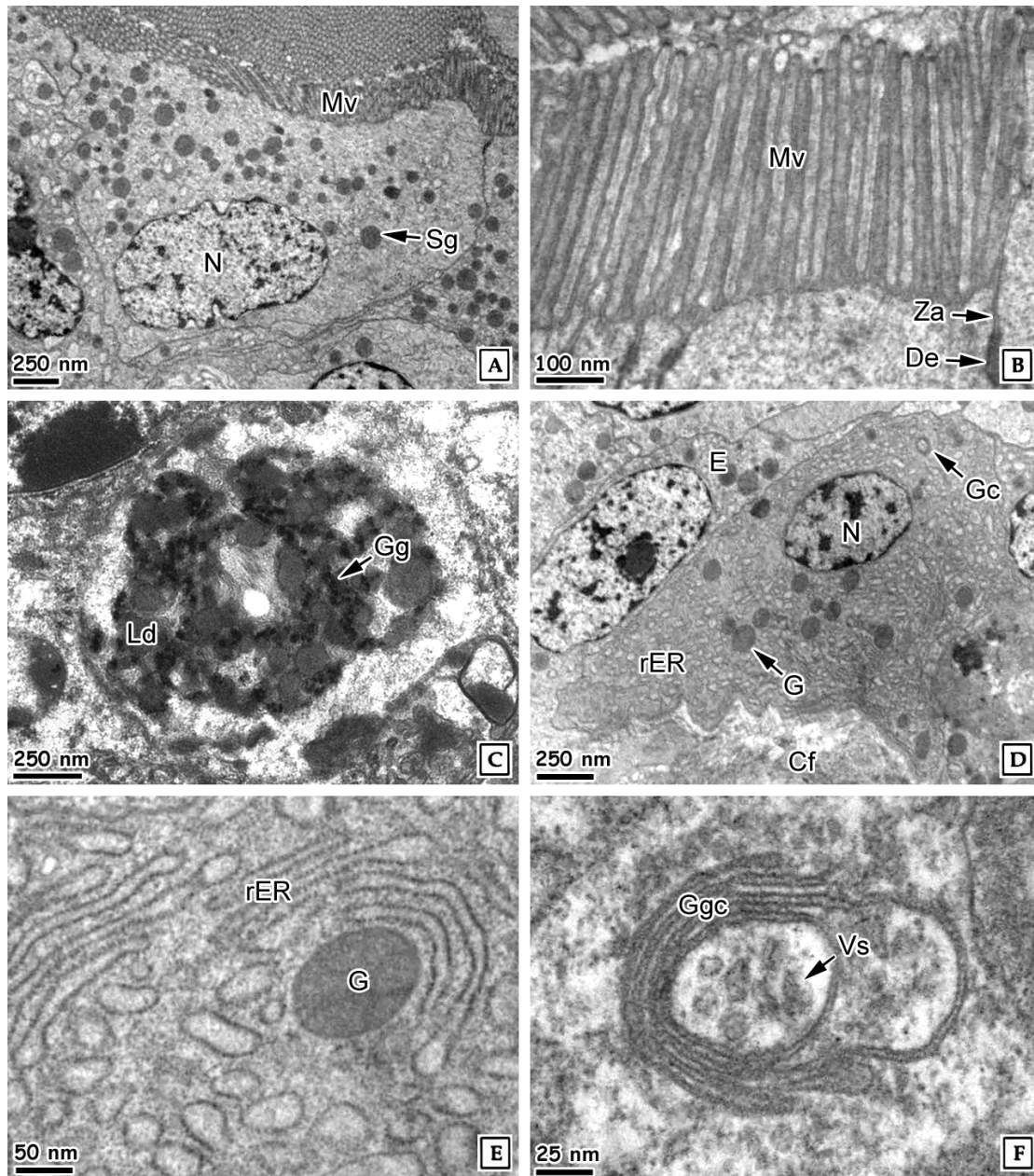


Fig. 4. Ultrastructure of the epithelium in the digestive tubule of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis*. **A:** epithelium, note that have numerous secretory granules (Sg). **B:** Lipofuscin in epithelium, note the containing numerous lipid droplet (Ld) and glycogen granules (Gg). **C:** Free surface of the deigestive cell, showing the microcilli (Mv) and zonula adherens (Za) and desmosome (De) in cell membrane. **D:** Basophilic cell, note possessing a well developed rough endoplasmic reticulum (rER). **E:** Cytoplasm of basophilic cell, showing the numerous rough endoplasmic reticulum and granule (G). **F:** Cytoplasm of basophilic cell, showing the Golgi complex with some vesicles (Vs). Cf, collagen fiber; Dc, digestive cell; Gc, Golgi complex; Ggc, Golgi cisternae; N, nucleus.

duct의 옆에서 분지형태로 뻗어 있으며, 원주형의 거짓중층상 피를 가지고 있는 secondary duct, secondary duct에서 분화되며, H 혹은 Y형태의 내강을 가지는 pretubular duct로

구성되었다. Pretubular duct는 3-4개의 소화선세관과 연결되어 있으며, 이들 소화선세관들은 교원섬유로 이루어진 결합 조직들에 의해서 지탱되고 있다 (Fig. 1C). 근육층과 생식소

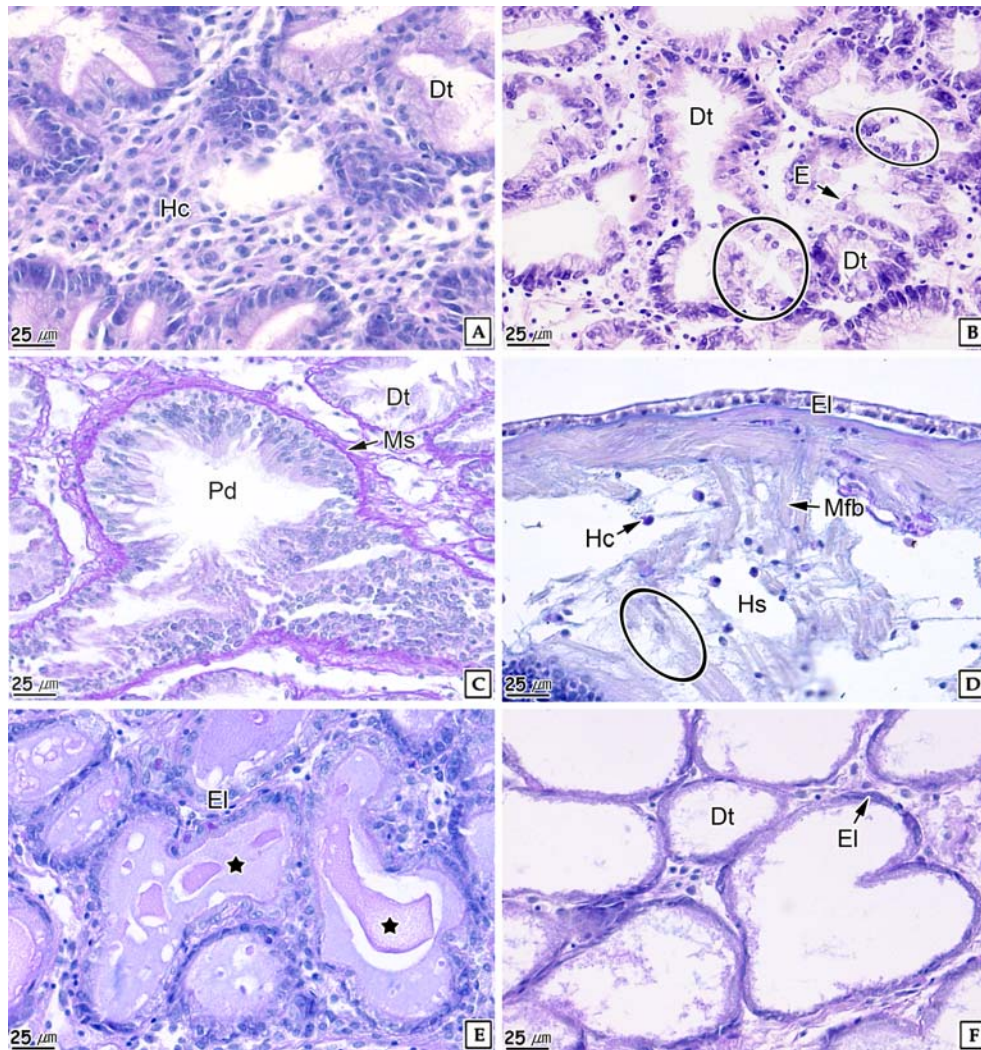


Fig. 5. Histopathological changes of the digestive gland of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. **A:** Interstitial tissue exposed to 0.4 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 12 weeks, showing increase of hemocytes (Hc). AB-PAS (pH 2.5) reaction. **B:** Digestive tubule exposed to 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 12 weeks, showing partially destruction of epidermal layer. H-E stain. **C:** 0.4 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 20 weeks, increase of mucosubstance (Ms) in surrounding primary duct (pd). AB-PAS (pH 2.5) reaction. **D:** Epidermal layer of outer envelope exposed to 0.6 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 28 weeks, note cutting of the muscle fiber bundle (Mfb) (circle) and change of the epithelium. AB-PAS (pH 2.5) reaction. **E:** Digestive tubule exposed to 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 36 weeks, note filled digestive substance (asterisk). AB-PAS (pH 2.5) reaction. **F:** Digestive tubule exposed to 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 36 weeks, showing change of the cells of the digestive tubule and destruction of epidermal layer (EI). AB-PAS (pH 2.5) reaction. Dt, digestive tubule; Dc, digestive cell.

의 하부에 존재하는 소화선세관은 다수의 관 (tubule) 구조로 되어있으며, 크기가 다양하였다 (Figs. 1D; 2C). 소화선세관과 세관 사이는 간질조직과 교원섬유로 구성된 결합조직이 존재하였으며, (Fig. 1E), 소화선세관의 주변에는 위와 장 같은 소화관들이 존재하였다 (Fig. 2D). 소화선세관은 두 종류의 상피세포로 구성되어 있는데, 하나는 소화세포이고, 다른 하나

는 호염기성세포이다 (Fig. 1D). 이들 상피세포들은 키가 큰 원주형 세포와 키가 작은 입방형 세포로서 단층의 원을 이루고 있으며, 소화선세관의 주변에는 얇은 결합 조직층이 관찰되었다 (Fig. 1E). 이들 결합 조직층에는 AB-PAS (pH 2.5) 반응 시 보라색 (2645c)으로 반응하는 물질들이 존재하였다 (Fig. 1F).

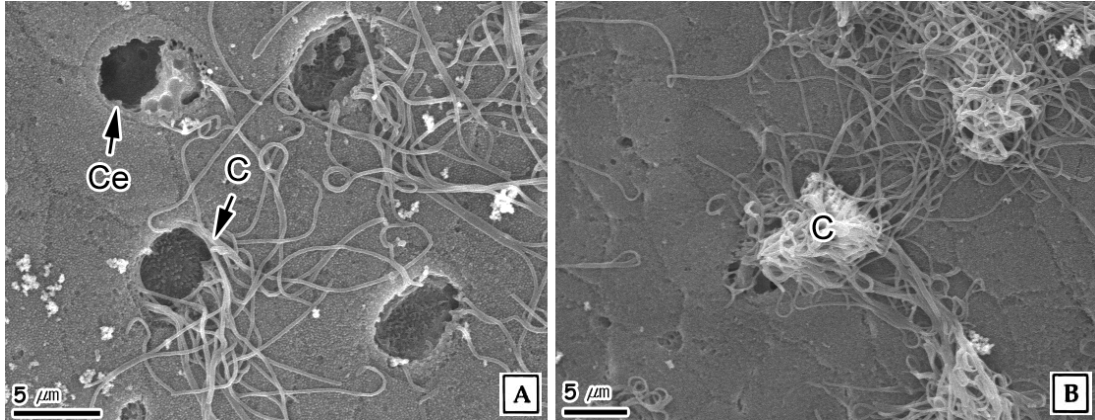


Fig. 6. Scanning electron microscope for histopathological changes of the epidermal layer of the visceral mass of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. **A and B:** Free surface of outer envelope exposed to $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 28 weeks, showing partially disappearance of cilia (C). Ce, ciliated epithelium.

소화선세관의 소화세포들은 소화선세관의 형태에 따라 길이 약 $25 \mu\text{m}$ 의 원주형에서부터 길이 약 $15 \mu\text{m}$, 너비 약 $25 \mu\text{m}$ 의 입방형세포까지 크기가 다양하였으며, 이들의 핵은 세포의 기저부에 존재하였으며, 세포질에는 잘 발달되고, 전자밀도가 낮은 다수의 액포와 미토콘드리아 그리고 다수의 분비과립들이 존재하고 있었다. 핵의 내부에는 진정염색질과 이형염색질이 관찰되었으며, 주변에는 조면소포체가 존재하였다 (Fig. 4A). 또한 상피세포의 세포질에는 전자밀도가 높은 지질과립과 글리코겐 과립들이 묻혀있는 지방갈색소가 관찰되었다 (Fig. 4B). 이들 세포의 자유면에는 길이 약 400 nm 의 미세융모가 존재하고 있었다 (Fig. 4C).

호염기성세포는 세포질 내에 잘 발달된 조면소포체가 관찰되었고, 핵은 세포의 중앙 또는 상부에 존재하며, 핵의 상부에는 말발굽 모양의 골지체가 관찰되었다. 이들 핵의 하단에는 전자밀도가 높은 분비과립들이 존재하고 있었다 (Figs. 4D-F).

2. 노출구

TBTCI 노출 4주 $0.4 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 혈림프동 내의 혈구와 소화선세관 주변에서 AB-PAS (pH 2.5) 반응 시 보라색 (7442c)으로 나타나는 점액물질들이 증가하였다. 0.6 와 $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구들에서는 외막 상피층의 점액세포가 감소하였으며, 소화선세관 상피세포의 변형과 내장낭의 결합조직 내에서 다수의 혈구가 관찰되었다.

노출 12주 $0.4 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 혈림프동의 확장 및 혈구의 증가가 관찰되었고 (Fig. 5A), 외막 상피층의 점액세포가 다소 감소하였다. $0.6 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 외막 상피층의 섬모가 탈락하고 선조연이 부분적으로 소실되었으며, 소화선세관들을 둘러싸고 있는 결합 조직층의 파괴가 나타났다. 같은 시기 가장 높은 노출구인 $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$

에서는 소화선세관과 secondary duct의 상피층이 부분적으로 파괴되었으며 (Fig. 5B), 소화선세관의 내강에서 다량의 소화물질들이 관찰되었다.

노출 20주에 $0.4 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 외막 상피층의 섬모가 부분적으로 탈락하였으며, primary duct를 둘러싸고 있는 결합 조직층에서 AB-PAS (pH 2.5) 반응시 보라색 (7442c)으로 나타나는 점액물질들이 증가하였다 (Fig. 5C). $0.6 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 교원섬유 다발과 근섬유 다발의 파괴로 인하여 결합 조직층이 붕괴되었고, $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 소화선세관 내강에서 관찰되는 소화효소의 양이 점차 증가하였으며, primary duct의 내강에 존재하는 액포가 감소하였다.

노출 28주에는 $0.6 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서 근육층이 파괴되었고 (Fig. 5D), $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 내장낭 외막 상피층의 섬모 (Fig. 6) 및 primary, secondary duct의 내강에 존재하는 섬모대가 부분적으로 소실되었다.

노출 36주에 $0.6 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 pretubular duct의 상피층이 파괴되었으며, 이들을 둘러싸고 있는 결합 조직층이 소실되었다. 가장 높은 노출구인 $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 에서는 소화선세관의 내강에 소화물질 (2635c, 529c)들로 가득 채워져 있었으며 (Fig. 5E), 내강이 비워진 소화선세관 세포가 입방형 또는 편평형으로 변하여 상피층의 두께가 얇아지며, 세포층이 부분적으로 파괴되었다 (Fig. 5F).

전자현미경으로 관찰한 결과 내장낭 상피층 하단의 교원섬유와 근섬유가 파괴되었고, 소화선세관사이의 결합조직에서 큰 공포들이 관찰되었다 (Fig. 7A). 또한 근육층의 근섬유들이 퇴화되면서 전자밀도가 낮아지고, 근섬유사이에는 다수의 글리코겐 과립들이 관찰되었다 (Fig. 7B). 내장낭 외막 상피세포들은 세포질내에 글리코겐 과립들이 증가하였으며, 세포

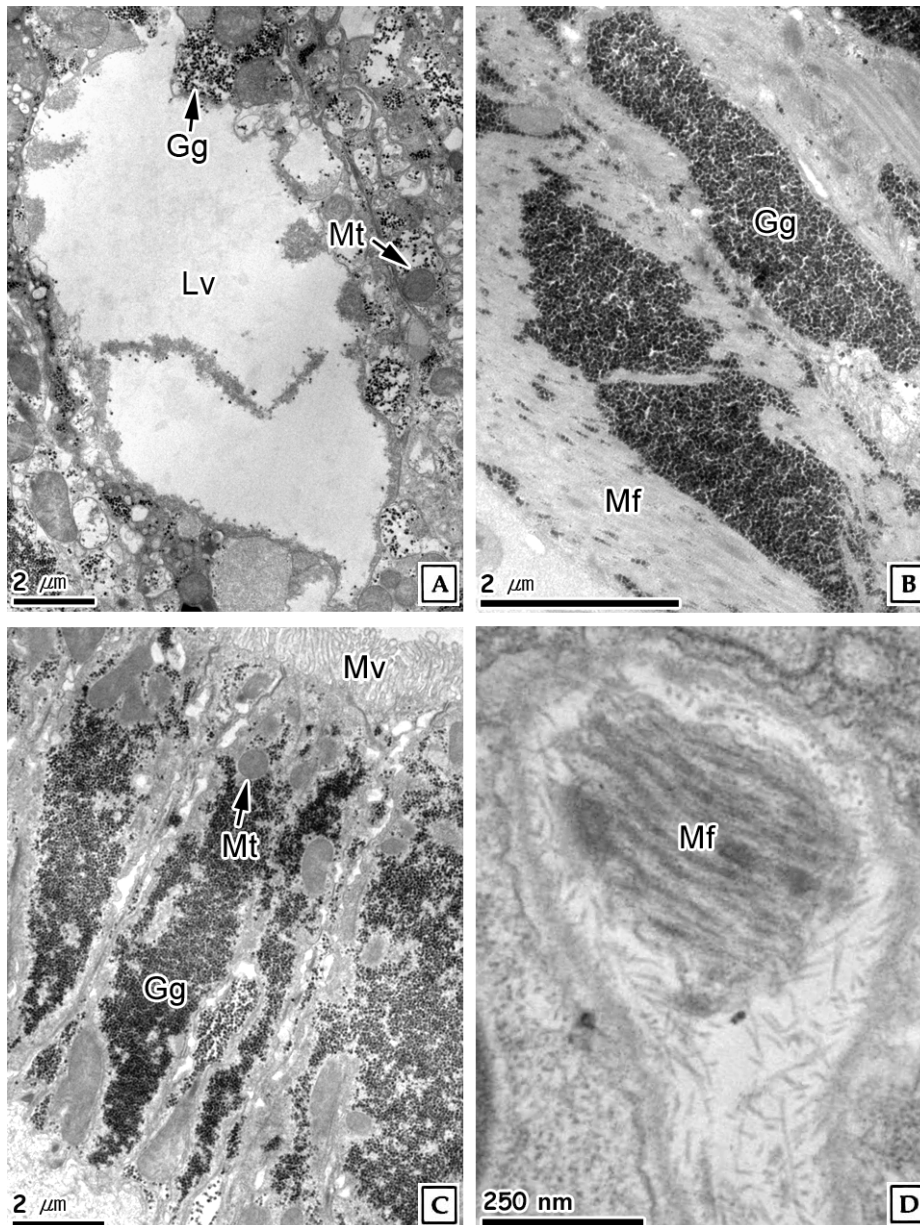


Fig. 7. Histopathological ultrastructure of the epidermal layer and digestive gland of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. **A:** Connective tissue, showing an enlarged lysosomal vacuole (Lv). **B:** Connective tissue, showing the numerous glycogen granules in the sarcolemma. **C:** Epidermal layer of visceral mass, showing the cytoplasm filled with glycogen granules (Gg) in epithelium. **D:** Muscular fiber bundle, note necrotic muscular fiber (Mf) in the sarcolemma. C, cilia; Mt, mitochondria; Mv, microvilli.

의 정단부에는 거대한 미토콘드리아들이 관찰되었고 (Fig. 7C), 상피층을 지지해주는 결합 조직층에서는 교원섬유와 일부 근섬유들이 퇴화되어 섬유사들의 분절이 관찰되었다 (Fig. 7D). 소화선세관 상피세포들은 미세융모의 소실과 함께 세포질의 물질들이 세포의 정단부로 방출되었다 (Figs. 8A and B). 특히 호흡기성 세포들의 세포질에 존재하는 조면소포체들

은 일부 파괴된 조직상이 관찰되었다 (Fig. 8C). Primary duct의 섬모세포들은 세포질 내에 섬모가 관찰되었으며, 핵막은 일부 파괴되었다 (Fig. 8D). 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구에서는 상피세포의 괴사와 함께 원형의 세포핵은 응축되어 비정형화 되고 (Fig. 9A), 세포질에는 글리코겐 과립의 증가와 함께 핵막이 파괴되는 조직상이 관찰되었다 (Fig. 9B). 또한 소

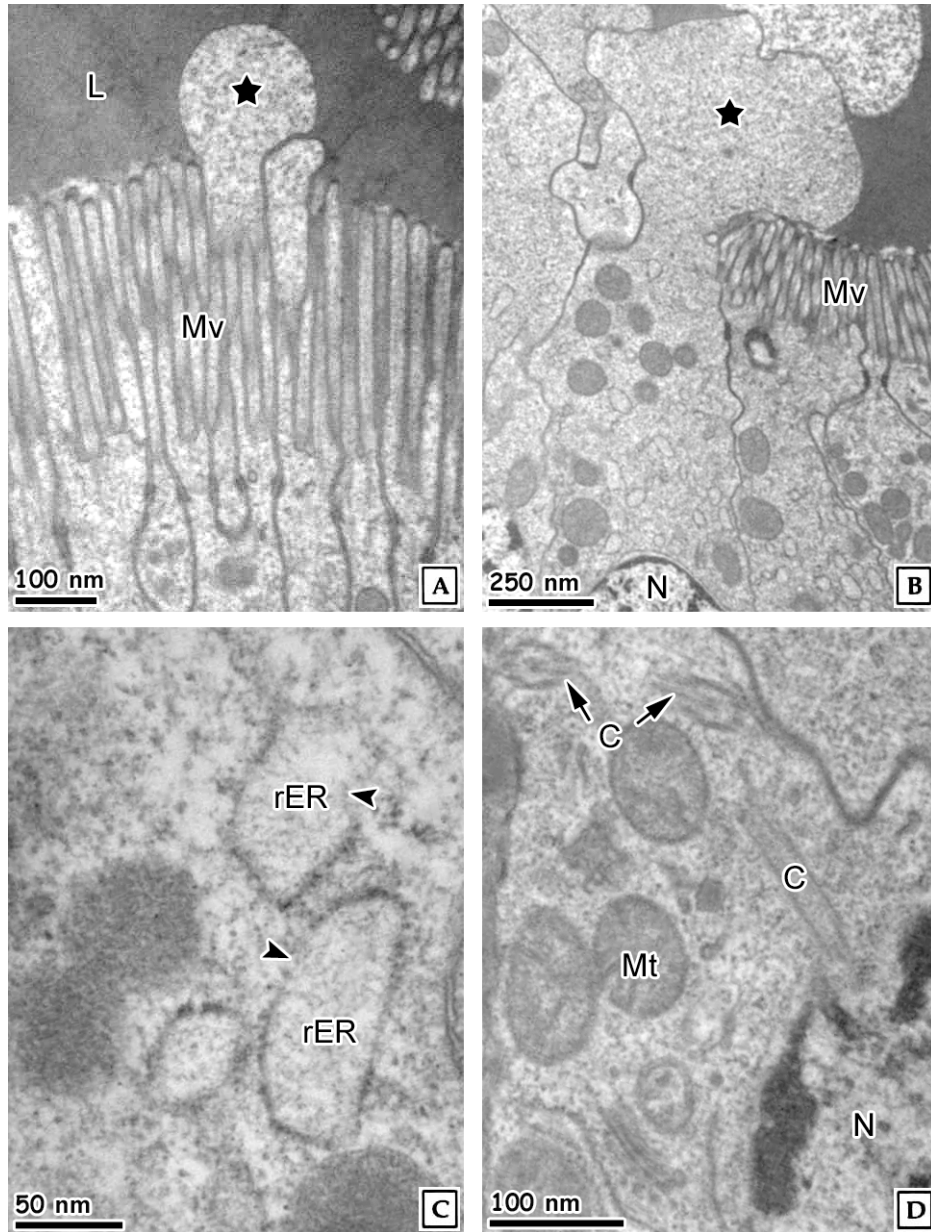


Fig. 8. Histopathological ultrastructure of the digestive gland of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCl. **A and B:** digestive cell, showing the release of cytoplasm (pentagram) from the disappearance of microvilli (Mv). **C:** Basophilic cell, note the destruction (arrowhead) of rough endoplasmic reticulum (rER). **D:** Ciliated cell in primary duct, showing the cilia (C) in cytoplasm. L, lumen; Mt, mitochondria.

화선세관 세포의 괴사가 진행되면 핵 안에 존재하는 이형염색질이 파괴되어 핵 내부의 균질화가 관찰되었다 (Fig. 9C).

TBTCl에 노출된 대복 소화선세관 상피층 두께의 변화는 실험기간 동안 대조구는 평균 $23.92 \mu\text{m}$ 였고, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g TBTCl L}^{-1}$ 농도구의 개체들은 각각 평균 $16.21 \mu\text{m}$, $14.36 \mu\text{m}$, $11.62 \mu\text{m}$ 로 분석되었다. 대조구의 경우에는 실

험기간 동안 세포층의 두께 변화가 없었지만, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g TBTCl L}^{-1}$ 농도구의 개체들은 노출기간이 길어질수록 세포층의 두께가 감소하여, 노출구 모두 12주 이후부터는 대조구와 유의적인 차이를 보였다 ($P < 0.05$) (Fig. 10).

소화선에서 지방갈색소의 분포비율을 알아보기 위해 Long Ziehl Neelsen 염색을 시행한 결과, 소화관의 세포에서 세포

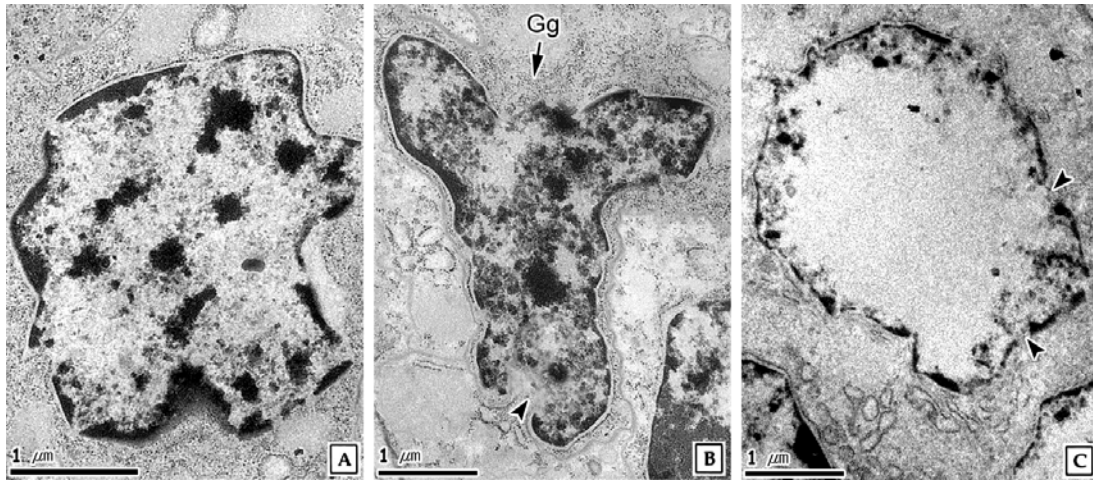


Fig. 9. Histopathological ultrastructure of cell in the digestive tubule of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to $0.8 \mu\text{g TBTCI L}^{-1}$. **A:** Degenerative cell, showing the irregular nucleus. **B:** Necrotic nucleus, note destruction of nucleus membrane (arrowhead) and condensation of the nucleus. **C:** Necrotic nucleus, showing the destruction of nucleus membrane (arrowhead) and disappearance of heterochromatin and nucleolus in nucleus. Gg, glycogen granule.

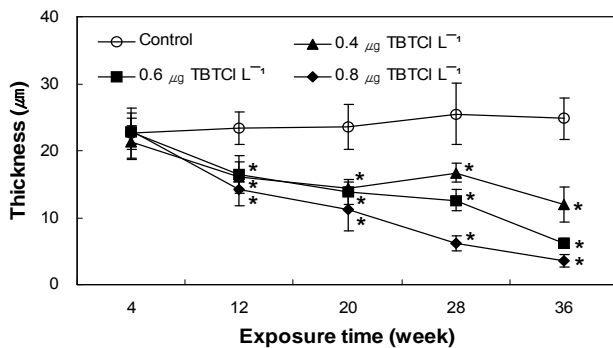


Fig. 10. Epidermal layer thickness of the digestive tubule of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. Vertical bar: SD. *: significantly different from control ($P < 0.05$).

질 내에 자주색 (249c)의 지방갈색소가 관찰되었다 (Fig. 11). 각 실험구들의 지방 갈색소 분포비율은 노출 4주째 대조구에서는 6.41%로 나타난 반면 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도구들에서는 각각 28.07%, 34.90%, 37.53%로 증가하여 대조구와 유의적인 차이를 보였다 ($P < 0.05$). 하지만 노출 20주에는 모든 노출구에서 지방갈색소의 분포비율이 급감하였으며 ($P < 0.05$), 노출 종료 시점인 36주에는 노출 36주에 0.6과 0.8 $\mu\text{g TBTCI } \mu\text{g L}^{-1}$ 농도구의 경우 소화선세포의 변형으로 지방갈색소의 분포비율이 28주 보다 각각 71.65%와 70.90%가 감소하여 대조구와 유의적인 차이를 보였다 ($P < 0.05$) (Fig. 11D).

고 찰

원새아강 (Protobranchia) 이미패류들은 점모가 없는 상피세포로 이루어진 primary duct와 점모를 가지는 상피세포로 이루어진 secondary duct를 가지며, 이들 상피세포들은 불규칙적으로 정렬되어진 관상구조 이지만, 판새아강 (Lamellibranchia) 이미패류들은 primary duct와 secondary duct 모두 점모를 가지는 규칙적으로 정렬된 상피세포로 구성되어있다 (Morse and Zardus, 1997).

소화선세포의 상피세포들은 소화세포와 호염기성세포로 나누어지는데, 소화세포는 세포내 소화로 특별하게 분화되어진 세포이며, 망상의 잘 발달되어진 세포질내 용해소체 생성기작으로 생성되고, 호염기성 세포는 분비세포가 소화세포 보다 풍부하다 (Eble, 2001; Dimitriadis *et al.*, 2004). *Mytilus galloprovincialis*의 소화선세포에 존재하는 호염기성세포는 잘 발달된 조면소포체와 골지체가 핵의 상부에 존재하고, 서로 융합된 공포들은 세포의 정단부에 존재하였다. 소화세포들의 세포질에는 세포내 음식물들의 소화를 담당하는 공포상의 용해소체와 전자밀도가 낮은 자가용해소체 그리고 덩어리 형태로 존재하는 잔여소체들이 존재하였다 (Dimitriadis *et al.*, 2003).

노르웨이의 구리 오염지역에서 채집한 진주담치, *Mytilus edulis*는 팽창된 소화선세포의 비율이 66.6%로 나타났다. 또한 오염의 정도가 심한 지역에서 채집한 개체일수록 호염기성 세포의 비율이 높아지고, 소화세포의 비율이 낮아졌다 (Zorita *et al.*, 2006). 그리스 Thermaikos만의 지중해담치, *Mytilus galloprovincialis*의 경우에는 소화선세포 상피세포에 존재하는 자가 용해소체와 잔여소체들은 오염지역으로 갈수록 크기

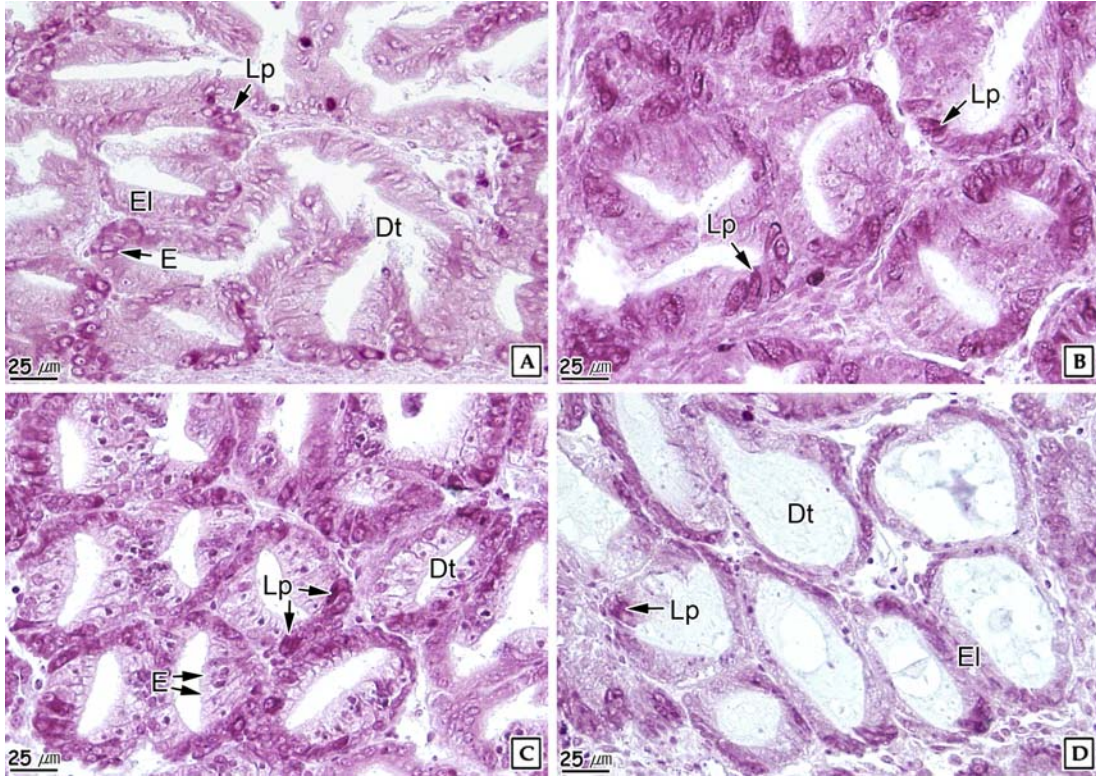


Fig. 11. Photomicrographs of lipofuscin in digestive gland of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. Long Ziehl Neelsen stain. **A:** Control, showing the few lipofuscin (Lp) in the normal digestive tubule (Dt). **B:** 0.4 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 12 weeks, note increase of the lipofuscin. **C:** 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 12 weeks, showing the numerous lipofuscin in the digestive tubule. **D:** 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ at 36 weeks, showing the few lipofuscin in the changed digestive tubule. E, epithelium; EI, epidermal layer; Dc, digestive cell.

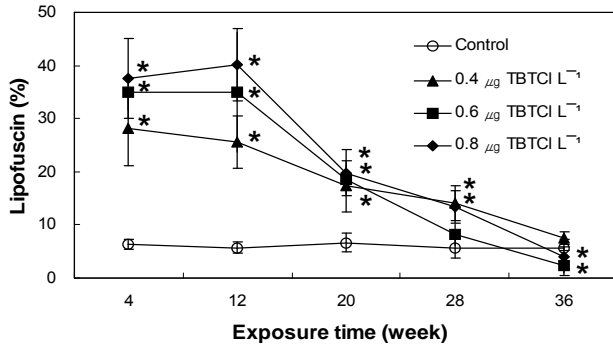


Fig. 12. Lipofuscin area in the digestive gland of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* exposed to TBTCI. Vertical bar: SD. *: significantly different from control ($P < 0.05$).

와 분포 정도가 높아졌으며, 중금속을 함유한 용해소체 또한 더 많이 관찰되었다 (Domouhtsidou and Dimitriadis, 2001).

또한 오염원의 인위노출 실험에서는 0.08 mg L^{-1} 농도의 구

리와 아연 그리고 카드뮴에 41일 동안 노출 시 *Mytilus galloprovincialis*의 digestive duct를 구성하는 상피세포들은 모두 섬모가 소실되었고 (Soto *et al.*, 1996), Nonlyphenol에 112일 동안 노출된 *Dreissena polymorpha*의 소화선세포는 내강 확장과 상피세포의 변형 및 호흡기성 파립의 감소가 관찰되었다 (Quinn *et al.*, 2004). Endosulfan에 노출된 *Planorbarius corneus*의 경우에도 소화선세포는 내강과 소화세포의 변형 및 피사와 소화선세포들 사이에 존재하는 혈림프동의 면적의 감소와 결합 조직층의 파괴 및 위축 등이 관찰되었다 (Otludil *et al.*, 2004).

본 연구에서 TBTCI 노출 20주에 0.8 $\mu\text{g TBTCI L}^{-1}$ 농도의 소화선에서는 근섬유사이에 다수의 글리코겐 파립들이 관찰되었는데 Pavelka and Roth (2005)는 이러한 글리코겐 파립들의 증가는 근섬유의 영양결핍이 원인으로서, 근형질막이 파괴되고, 그로 인하여 외부의 단백질들이 침투했기 때문에 나타나는 증상이라고 하였다. 또한 primary duct에 존재하는 섬모상피세포들의 세포질 내에서 섬모들이 관찰되었는데 이는 복제된 중심립이 기저체가 되기 위해 섬모세포의 정단면으로

이동되지 못하고 세포질 내에서 신장되어 섬모가 형성된 결과이다 (Hagiwara *et al.*, 2004).

이때패류의 조직은 용해소체가 풍부하기 때문에 용해소체의 병리학적 변화는 환경적 역효과의 지표로써 유용하다 (Moore, 1990). 용해소체는 세포내 소화의 주요 부위로서 작용하는 소화기관에서 발견되었는데 Owen (1972)은 소화기관은 생물체와 환경사이의 주요 접촉면이라고 하였다. 골지체에서 생성된 용해소체는 다양한 가수분해효소를 가지는 세포소기관으로서 이들은 해양 오염원과 같은 외부로부터 유입된 외인성 물질들을 가수분해효소에 의해 용해시켜서 타가용해소체 (heterophagosome) 로 전환되거나, 세포 내에서 기능이 상실된 세포소기관이나 불필요한 물질들을 용해시켜서 자가 용해소체 (autophagosome) 로 전환된다. 이때 용해가 진행되지 않고, 미분해 상태로 남아있는 고분자의 용해소체를 잔여소체 (residual body) 혹은 지방갈색소라고 한다. 지방 갈색소는 생물학적인 폐기물로서 세포내에서 구조의 변화로부터 생기고 폐물질을 처리하는 변형된 용해소체이다 (Ross *et al.*, 2003). 일반적으로 지방 갈색소는 세포의 기능에 간섭하지 않는 노화의 지표이지만, 많은 양의 지방 갈색소 축적은 섬유아 세포처럼 산화 스트레스 (oxidative stress) 에 민감하여 쉽게 자멸 (apoptosis) 하는 세포를 만들어내고, 노화를 촉진하여 여러 가지 질병에 쉽게 걸리게 된다 (Brunk and Terman, 2002). Lomovasky *et al.* (2002)은 이들 지방 갈색소는 육상척추동물에서와 마찬가지로 이때패류에서도 일반적으로 노화되면서 조직 내에서 농도가 증가하였다고 하였다.

이때패류에서 지방 갈색소는 구리, 아연, 철, 망간, 마그네슘과 같은 중금속 이온들을 포획가능한 제3의 용해소체로 여겨지기 때문에 중금속나 저산소증에 인한 스트레스의 영향을 지표로 이용되어 왔다 (Viarengo *et al.*, 1990; Krishnakumar *et al.*, 1997; Byrne and O'Halloran, 2001).

담치류인 *Mytilus sp.*를 중금속에 오염된 저질에 노출 시킨 결과, 용해소체의 구획에서 지방갈색소의 조성이 과도하게 일어났는데 이로 인해 지방 갈색소는 지단백질막에서 포식 작용으로 인한 과산화 반응의 산물임을 알 수 있었다. (Pearse, 1985). *Tapes semidecussatus*의 경우에도 고농도의 중금속 (Cu: 198.0 mg/kg Dw, Zn: 7834.0 mg/kg Dw, Hg: 15.4 mg/kg Dw, Pb: 2336 mg/kg Dw)에 오염된 저질에 노출시킨 후 오염되지 않은 대조구와 비교한 결과, 대조구의 소화선에서는 지방갈색소가 관찰되지 않았지만 중금속에 오염된 노출구에서는 지방갈색소가 다량으로 축적되었다고 보고하였다 (Byrne and O'Halloran, 1999). 또한 고농도의 중금속에 노출된 담치류의 경우에는 해독 기작의 저해로 인하여 지방갈색소가 증가하였다 (Da Ros *et al.*, 2000). Byrne and O'Halloran (2001)은 세포수준에서 독성평가를 하기 위해 지

방갈색소의 침적과 용해소체의 막 보존을 관찰하였는데 오염된 침전물에 노출된 *Tapes semidecussatus*의 소화선에서 지방갈색소가 검출되었고, 용해소체의 막에서 중성 레드 염료의 정체시간이 감소하였다고 보고하였다. Zorita *et al.* (2006)은 노르웨이 4곳의 구리 오염지역에서 진주담치, *Mytilus edulis*를 채집하였다. 모든 지역에서 서식하는 개체들의 소화관 내강에 구리 중금속을 가지는 용해소체와 지방갈색소가 관찰되었는데, 지역 3에서는 가장 높게 나타났으며, 오염이 가장 심한 지역 4에서는 가장 낮게 나타났다. 이렇게 오염이 가장 심한 지역에서 지방갈색소의 비율이 낮게 나타난 이유는 소화선 안으로 들어온 다량의 외인성 물질들이 해독화 과정의 결과로 용해소체에 의한 세포의 유출이 활발하게 진행됐기 때문이라고 하였다.

진주담치, *Mytilus edulis*를 15주 동안 0.8, 5, 20 mg L⁻¹ 농도의 구리에 노출 시킨 결과 고농도에서 용해소체의 확장과 지방갈색소의 축적이 증가하였고, PAHs, PCBs와 중금속에 오염된 지역에서 채집된 개체들도 소화선에서 지방과립이 증가하고 지방갈색소의 비율도 증가하였다 (Moore, 1988). 진주담치, *Mytilus edulis*를 PAHs에 30일 동안 노출시킨 결과에서도 노출구의 개체들은 대조구에 비해 지방갈색소의 농도가 증가하였고, PCBs에 6일 동안 노출시킨 결과도 이와 유사하였다 (Krishnakumar *et al.*, 1997). 0.1 mg L⁻¹ 농도의 수온에 30일과 60일 동안 노출된 지중해담치, *Mytilus galloprovincialis*의 소화선세관 소화 세포내에는 지방 갈색소가 증가하였으며, 지방갈색소의 축적은 노출 60일째 보다 30일째에 더 많이 관찰되었다 (Dimitriadis *et al.*, 2003). Lee and Park (2007)은 대복을 nonylphenol에 24주 동안 노출 시킨 결과 농도 의존적으로 소화선세관에서 지방갈색소의 분포가 높게 나타난 결과를 보고하였다.

본 연구에서도 앞선 연구에서와 마찬가지로 노출 초기 때부터 지방갈색소의 비율이 높아 대조구와 유의적인 차이를 보였다 (P < 0.05). 하지만 20주부터 노출구의 지방갈색소 축적 비율이 감소하였다. 노출 마지막 주에는 가장 낮은 노출구인 0.4 µg TBTCI L⁻¹에서만 유의적인 차이를 보였는데, 이는 지방갈색소가 주로 분포하게 되는 소화선세관의 상피세포가 변형 되면서 세포질이 위축되었고, 특히 0.8 µg TBTCI L⁻¹ 농도구의 경우 소화선 상피세포가 파괴되어 상피층의 두께가 얇아졌기 때문인 것으로 생각된다.

요 약

TBTCI에 36주 동안 노출된 대복, *Gomphina veneriformis* 소화선의 미세구조적 변화와 지방갈색소의 축적을 관찰한 결과 외막상피층의 경우 점액세포 감소, 섬모 탈락 및 선조연의 부분적인 소실이 관찰되었다. 소화선세관에서

는 저농도의 개체들에서 소화선세관 내강에 소화효소의 양이 증가하였지만 농도 의존적으로 소화선세관의 세포들이 입방형 또는 편평형으로 변하여 세포층의 두께가 얇아지며, 부분적으로 파괴가 관찰되었다. 이러한 광학현미경적 증상을 자현미경으로 관찰한 결과 내장낭 외막 상피세포와 소화선세관을 둘러싸고 있는 근섬유사이에는 다수의 글리코겐 과립들이 관찰되었고, 호흡기성 세포들에서는 조면소포체의 파괴와 세포의 괴사로 인하여 핵의 응축 및 핵막의 파괴가 관찰되었다. 이러한 소화선세관 세포들의 변화로 세포층은 고농도로 대조구와 유의적인 차이를 보이며, 두께가 감소하였다 ($P < 0.05$). Long Ziehl Neelsen 염 결과, 소화선세관의 세포에서 자주색으로 관찰되는 지방갈색소는 대조구와 유의적인 차이를 보이며 증가하였지만 ($P < 0.05$), 노출이 진행될수록 소화선세관 세포들이 파괴됨에 따라 그 축적도 감소하였다. 따라서 본 연구 결과 TBT는 대복 소화선세관 세포들의 미세구조를 파괴함에 따라서 이들 세포들이 가지는 소화기능을 억제하는 것으로 생각되어지며, 농도 의존적으로 지방갈색소의 축적이 높아지기 때문에 지방 갈색소는 TBT의 오염정도를 파악하기 위한 biomarker로서 충분히 이용 가능한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Adelman, D., Hinha, K.R., and Pilson, M.E.Q. (1990) Biogeochemistry of butyltins in an enclosed marine ecosystem. *Environ. Sci. Technol.*, **24**: 1027-1032.
- Alzieu, C., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., and Borel, M. (1986) Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.*, **17**: 494-498.
- Anonymous, N. (2001) International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. IMO. London
- Blaber, S.J.M. (1970) The occurrence of penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus*. *Proc. Malacol. Scotland.*, **39**: 231-233.
- Brick, M., and Bolte, M. (1994) Cytology of the outer penis epithelium of *Buccinum undatum* (L.) from the arctic region-an observation of the imposex phenomenon. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, **48**: 123-131.
- Brunk, U.T., and Terman, A. (2002) Lipofuscin; mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 611-619.
- Bubel, A. (1989) Microstructure and function of cells; Electron micrographs of cell ultrastructure pp. 95-98. Ellis Horwood Limited. Chichester.
- Byrne, P.A., and O'Halloran, J. (1999) Aspects of assaying sediment toxicity in Irish estuarine ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.*, **39**: 97-105.
- Byrne, P.A., and O'Halloran, J. (2001) The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. *Hydrobiologia*, **465**: 209-217.
- Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C., and Morabito, R. (2003) Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere*, **50**: 311-319.
- Da Ros, L., Nasci, C., Marigómez, I., and Soto, M. (2000) Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.*, **50**: 417-423.
- de Mora, S.J., King, N.G., and Miller, M.C. (1989) Tributyltin and total tin in marine sediments; profiles and apparent rate of TBT degradation. *Environ. Technol. Lett.*, **10**: 901-908.
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., and Cajaraville, M.P. (2004) Chtochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. *J. Mol. Histol.*, **35**: 501-509.
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., and Raftopoulou, E. (2003) Localization of Hg and Pb in the palps, the digestive gland and the gills in *Mytilus galloprovincialis* (L.) using autometallography and X-ray microanalysis. *Environ. Pollut.*, **125**: 345-353.
- Domouhtsidou, G.P., and Dimitriadis, V.K. (2001) Lysosomal and lipid laterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environ. Pollut.*, **115**: 123-137.
- Dubey, S.K., and Roy, U. (2003) Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *App. Organomet. Chem.*, **17**: 3-8.
- Eble, A.F. (2001) Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*. In: Kraeuter JN, Castagna M (eds) Biology of the hard clam. Elsevier, New York, pp 117-220
- EPA, U.S. (1997) Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis pp. 1-120, Washington, D.C
- Etzeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., and Marigómez, I. (1994) Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn in mussels collected from a zinc polluted site). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**: 338-345.
- Følsvik, N., Berge, J.A., Brevik, E.M., and Walday, M. (1999) Quantification of organotin compounds and determination of imposex in populations of dogwhelk (*Nucella lapillus*) from Norway. *Chemosphere*, **38**: 681-691.
- Følsvik, N., Brevik, E.M., Berge, J.A., and Dam, M. (1998) Organotin and imposex in the littoral zone in the Faroe Islands. *Frøðskaparrit*, **46**: 67-80.
- Gibbs, P.E., and Bryan, G.W. (1986) Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin

- from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **66**: 767-777.
- Gomez-Ariza, J.L., Giraldez, I., and Morales, E. (2000) Temporal fluctuations of tributyltin in the bivalve *Venerupis decussata* at five stations in southwest Spain. *Environ. Pollut.*, **108**: 279-290.
- Hagiwara, H., Ohwada, N., and Takata, K. (2004) Cell biology of normal and abnormal ciliogenesis in the ciliated epithelium. *Int'l. Rev. Cytolo.*, **234**: 101-141.
- Hinch, S.G., and Stephenson, L.A. (1987) Size- and age-specific patterns of trace metal concentrations on fresh water clams from an acid-sensitive and a circumneutral lake. *Can. J. Zool.*, **65**: 2436-2442.
- Hole, L.M., Moore, M.N., and Bellamy, D. (1992) Age-related differences in the recovery of lysosomes from stress-induced pathological reactions in marine mussels. *Mar. Environmental Research*, **34**: 75-80.
- Hole, L.M., Moore, M.N., and Bellamy, D. (1993) Age-related cellular reactions to copper in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, **94**: 175-179.
- Hole, L.M., Moore, M.N., and Bellamy, D. (1995) Age-related cellular and physiological reactions to hypoxia and hyperthermia in marine mussels. *Marine Ecology Progress Series*, **122**: 173-178.
- Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Yamazaki, S., and Morita, M. (1994) Imposix and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **74**: 651-669.
- Horiguchi, T., Takiguchi, N., Cho, H.S., Kojima, M., Kaya, M., Shiraishi, H., Morita, M., Hirose, H., and Shimizu, M. (2000) Ovo-testis and disturbed reproductive cycle in the giant abalone, *Haliotis madaka*: possible linkage with organotin contamination in a site of population decline. *Mar. Environ. Res.*, **50**: 223-229.
- Krishnakumar, P.K., Asokan, P.K., and Pillai, V.K. (1990) Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus). *Aquatic Toxicology*, **18**: 163-173.
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., and Varanasi, U. (1997) Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **118**: 11-18.
- Lee, J.S., and Park, J.J. (2007) Risk assessment of nonylphenol using the sex ratio, sexual maturation, intersex and lipofuscin accumulation of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *J. Kor. Fish. Soc.*, **40**: 16-23.
- Lomovasky, B.J., Morriconi, E., Brey, T., and Calvo, J. (2002) Individual age and connective tissue lipofuscin in the hard clam *Eurhomalea exalbida*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **276**: 83-94.
- Mathew, S., and Damodaran, R. (1997) Lipofuscin as physiological indicator of heavy metal stress in *Sunetta scripta* (yellow clam) and *Perna viridis* (green mussel). *Indian Journal of Marine Sciences*, **26**: 64-67.
- Moore, M.N. (1988) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **46**: 81-89.
- Moore, M.N. (1990) Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem.*, **22**: 279-287.
- Moore, M.N., Allen, J.I., and Somerfield, P.J. (2006) Autophagy: Role in surviving environmental stress. *Marine Environmental Research*, **62**: S420-S425.
- Morrison, C.M. (1993) Histology and cell ultrastructure of the mantle and mantle lobes of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin: A summary atlas. *Amer. Malac. Bull.*, **10**: 1-24.
- Morse, M.P., and Zardus, J.D. (1997) Bivalvia. *In*: Harrison F, Kohn A (eds) Microscopic anatomy of invertebrates, Vol. 6A, Mollusca II. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York, pp 7-118
- Morton, B.S. (1983) The biology and functional morphology of the weisted ark *Trisidos semitorta* (Bivalvia: Arcacea) with a discussion on shell "torsion" in the genus. *Malacologia*, **23**: 375-396.
- Otludil, B., Cengiz, E.I., Yildirim, M.Z., Ünver, Ö., and Ünlü, E. (2004) The effects of endosulfan on the great ramshorn snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. *Chemosphere*, **56**: 707-716.
- Owen, G. (1972) Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci. Prog. Oxf.*, **60**: 299-318.
- Pavelka, M., and Roth, J. (2005) Functional ultrastructure; An atlas of tissue biology and pathology pp. 326. Springer. New York
- Pearse, E.A.G. (1985) Pigments and pigment precursors. Histochemistry, theoretical and applied. Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York, pp 916
- Pekkarinen, M. (1996) Scanning electron microscopy, whole-mount histology, and histochemistry of two *Anodontine glochidia* (Bivalvia: Unionidae). *J. Zool.*, **74**: 1964-1973.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., and Mothersill, C. (2004) The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, **66**: 279-292.
- Rasmussen, L.P.D., Hage, E., and Karlog, O. (1983) Light and electron microscopic studies of the acute and chronic toxic effects of N-nitroso compounds on the marine mussel, *Mytilus edulis* (L). II. N-methyl-N-nitro-N-nitroduguanidine. *Aquat. Toxicol*, **3**: 301-311.
- Regoli, F. (1992) Lysosomal responses as sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **84**: 63-69.
- Regoli, F., and Orlando, E. (1994) Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb

- and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Mar. Pollut. Bull.*, **28**: 592-600.
- Ross, M.H., Kaye, G.I., and Pawlina, W. (2003) Histology; A text and atlas pp. 875, Philadelphia
- Santos, M.M., Ten Hallers-Tjabbes, C.C., Santos, A.M., and Vieira, N. (2002) Imposex in *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *Journal of Sea Research*, **48**: 217-223.
- Santos, M.M., Vieira, N., and Santos, A.M. (2000) Imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) along the Portuguese coast. *Mar. Pollut. Bull.*, **40**: 643-646.
- Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J.C., Pelletier, E., and Viglino, L. (2003) Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **135**: 145-156.
- Smith, B.S. (1971) Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus*. *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, **39**: 377-378.
- Solé, M., Morcillo, Y., and Porte, C. (1998) Imposex in the commercial snail *Bolinus brandaris* in the northwestern Mediterranean. *Environmental Pollution*, **99**: 241-246.
- Soto, M., Cajaraville, M.P., and Marigómez, I. (1996) Tissue and cell distribution of copper, zinc and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography. *Tissue and Cell*, **28**: 557-568.
- Stephenson, M. (1991) A field bioassay approach to determining tributyltin toxicity to oysters in California. *Marine Environmental Research*, **32**: 51-59.
- Sukhotin, A.A., Abele, D., and Pörtner, H.-O. (2002) Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis* L.: age and size effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **226**: 223-234.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., and Orunesu, M. (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **97**: 37-42.
- Viarengo, A., and Nott, J.A. (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **104**: 355-372.
- Waldock, M.J., and Thain, J.E. (1983) Shell thickening in *Crassostrea gigas*: Organotin antifouling or sediment induced? *Marine Pollution Bulletin*, **14**: 411-415.
- Yamada, H., and Takayanagi, K. (1992) Bioconcentration and elimination of bis(tributyltin)oxide (TBTO) and triphenyltin chloride (TPTC) in several marine fish species. *Water Research*, **26**: 1589-1595.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., and Cajaraville, M.P. (2006) Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology*, **78**: S109-S116.