Nowa metoda przyżyciowego pobierania hemolimfy wraz z ustaleniem norm fizjologicznych wybranych parametrów biochemicznych hemolimfy ślimaków *Cornu aspersum*

JERZY ZIĘTEK, LESZEK GUZ*, KINGA PANASIUK,
STANISŁAW WINIARCZYK, ŁUKASZ ADASZEK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

*Zakład Chorób Ryb, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

Otrzymano 15.11.2016

Zaakceptowano 20.03.2017

Ziętek J., Guz L., Panasiuk K., Winiarczyk S., Adaszek Ł.

New intravital method for hemolymph collection from *Cornu aspersum* snails and the establishment of standards for selected biochemical parameters of their hemolymph

Summary

The aim of the study was to develop an intravital method of collecting hemolymph and to establish standards for the biochemical parameters of the hemolymph of the *Cornu aspersum* snail species. The research material consisted of 80 *Cornu aspersum maxima* snails. Hemolymph was collected from the main vessel with a sterile syringe and needle after removing a fragment of the shell. Hemolymph was studied biochemically by the colorimetric method. The parameters evaluated were aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), amylase (AMYL), urea (UREA), and triglycerides (TG). An average of 0.54 ml hemolymph was collected from the animals tested. After 24 hours, a film formed in place of the removed shell fragment and it underwent mineralization within a few days. All animals included in the study survived, and from some of them it was possible to collect hemolymph several times at intervals of several days. The proposed method of hemolymph collection made it possible to obtain material to develop standards for the biochemical parameters of hemolymph and consequently to monitor the health status of these mollusks.

Keywords: hemolymph, snails, *Cornu aspersum*, AST, ALT, AMYL, UREA, TG

Cornu aspersum (*Helix aspersa*) *maxima* (ślimak afrykański, ślimak wielki szary) jest gatunkiem ślimaka często hodowanym w specjalistycznych gospodarstwach – helikulturach. Pochodzi z południowej części basenu Morza Śródziemnego i od tysiącleci wchodził w skład diety człowieka. W ostatnich latach gatunek ten został introdukowany prawie na całym świecie m.in. w południowej Afryce, Ameryce Północnej i Południowej, Nowej Zelandii, a także północnych i centralnych częściach Europy (5). Ślimak wielki szary, uprzednio umieszczony wśród gatunków rodzaju *Helix*, obecnie zaklasyfikowany jest do nowego rodzaju *Cornu* w obrębie rodziny *Helicidae*. Zmiany tej dokonano na podstawie porównawczych badań anatomicznych układu rozrodczego ślimaków (14). Ślimaki z gatunku *Cornu aspersum* są jednymi z gatunków ślimaków jadalnych, które są najlepiej przystosowane

do hodowli. Przemawiają za tym: niezwykła zdolność do adaptacji do różnych warunków klimatycznych i środowiskowych, wysoka reproduktywność oraz szybkie tempo wzrostu.

Jednym z aspektów monitoringu stanu zdrowia ślimaków jest ocena wybranych parametrów biochemicznych hemolimfy. Budowa anatomiczna i fizjologia ślimaków, w szczególności półotwarty układ krążenia i częściowo hydrauliczny narząd ruchu, umożliwiającą pobieranie stosunkowo dużych ilości hemolimfy. Metody pozyskiwania hemolimfy stosowane dotychczas charakteryzowały się wieloma wadami, m.in. kończyły się śmiercią badanego zwierzęcia, a pobrany materiał wykazywał znaczne zanieczyszczenie (1-3).

Celem badań było opracowanie jak najmniej inwazyjnej i przyżyciowej metody pobierania hemolimfy u ślimaków umożliwiającej w razie potrzeby powtó-

zenie tego zabiegu, a także ustalenie norm wybranych parametrów biochemicznych hemolimfy u ślimaka z gatunku *Cornu aspersum*.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 80 ślimakach *Cornu aspersum maxima* o masie 28-39 g (średnia masa 34 g) pochodzących z fermy ślimaków znajdującej się na Kujawach. Zwierzęta były aklimatyzowane przez okres miesiąca, żywione specjalistyczną karmą dla ślimaków jadalnych i utrzymywane w czystych plastikowych kuwetach w warunkach temperatury i wilgotności zbliżonych do panujących w fermie. W celu pobrania hemolimfy użyto metody opracowanej w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (patent P.410296).

Zwierzęta podczas pobierania materiału biologicznego były aktywne, wcześniej spożywały standardowy pokarm. Zabieg przeprowadzano w temperaturze pokojowej, w jakiej wcześniej znajdowały się opisane ślimaki. Hemolimfę pobierano z naczynia głównego. Miejsce dostępu do głównego naczynia znajdowało się na przecięciu dwóch linii: pierwszej wyznaczonej przez środek największego skrzytu

muszli i drugiej poprowadzonej na 2-3 mm w kierunku dołgowym od słabo zaznaczonego dołka osiowego (ryc. 1).

Po ostrożnym usunięciu fragmentu skorupy za pomocą ostrego narzędzia (metalowy rylec, wiertło) uwidaczniano główne naczynie (średnica od 1 do 1,5 mm). Naczynie nakłuwano za pomocą igły o średnicy 0,4-0,45 mm, do czego najlepiej nadawała się igła używana do tuberkulinizacji. Za pomocą dołączonej strzykawki wytwarzano podciśnienie, przez co hemolimfa zasysana była bezpośrednio z naczynia w sposób możliwie aseptyczny, bez kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym (ryc. 2-4). W chwili pobierania materiału zwierzęta były umieszczone w temperaturze pokojowej, aktywne i otrzymywały standardową karmę.

W celu ustalenia norm fizjologicznych wybranych parametrów biochemicznych hemolimfy pobrany od ślimaków materiał odwirowywano (1000 obrotów, 1 minuta) w temperaturze pokojowej. Następnie materiał kliniczny był badany przy użyciu aparatu do badań biochemicznych wykorzystującego metodę kolorymetryczną Mindray BS – 130. Parametrami oznaczanymi były: aktywność enzymów transaminazy asparaginowej (AST), transaminazy alaninowej (ALT), amylazy (AMYL) oraz stężenie mocznika (UREA), triglicerydów (TG).

Ryc. 1. Miejsce dostępu do głównego naczynia

Ryc. 2. Widok naczynia po usunięciu fragmentu skorupy

Ryc. 3. Iniekcja donaczyniowa – miejsce wkłucia

Ryc. 4. Aspiracja hemolimfy za pomocą strzykawki

Wyniki i omówienie

Przedstawiona metoda okazała się skutecznym sposobem przyżyciowego pobierania hemolimfy od ślimaków *C. aspersum maxima*. Od badanych zwierząt pobierano średnio 0,54 ml hemolimfy (minimalnie 0,4 ml, maksymalnie 0,8 ml hemolimfy). Cały zabieg był bezpieczny dla poddanego procedurze zwierzęcia, zaś ilość pobranego materiału nie wpływała zauważalnie na tempo powrotu do normalnej aktywności. W trakcie przeprowadzania badań nie zdarzył się ani jeden przypadek śmierci poddanego procedurze ślimaka. Po 0,5 do 2 godzin od pobrania hemolimfy zwierzęta powracały do żerowania i normalnej aktywności, pod warunkiem zapewnienia dużej wilgotności środowiska (80-90%). Po 24 godzinach w miejscu usunięcia fragmentu skorupy tworzyła się półprzeźroczysta, twarda błonka, która w ciągu kolejnych kilku dni ulegała całkowitej mineralizacji. U 40 losowo wybranych ślimaków z grupy badanej pobierano 0,4 ml hemolimfy po 5, 10 i 15 dniach od terminu pierwszej iniekcji, celem ustalenia, czy jest możliwe pobieranie opisywanego materiału klinicznego kilkakrotnie od tego samego osobnika. Także w tej grupie zwierząt w czasie trwania obserwacji nie stwierdzono przypadków śmierci ani zmian w zachowaniu.

Pobieranie hemolimfy ma istotne znaczenie przy pracach dotyczących biologii ślimaków. Dotychczas materiał ten pozyskiwano innymi metodami, m.in. poprzez punktowe nakłucie naczyń i zbieranie materiału badawczego za pomocą pipety (2, 8), lub częściowo poprzez aspirację za pomocą igły i zbieranie za pomocą pipety (3). Najpopularniejsze metody kolekcjonowania hemolimfy były inwazyjne i często kończyły się śmiercią mięczaków. Wiązały się z uszkodzeniem mięśnia sercowego, struktur płaszcza i muszli (2, 6, 10). Polegały na pobieraniu hemolimfy poprzez wkłucie igły w nogę ślimaka i ekstrakcję z hemocelu (11), z naczyń płuć lub bezpośrednio z serca (4). Techniki te nie są dokładnie opisane (2) lub dotyczą gatunków ślimaków o większych rozmiarach (3). Jako metodę bezinwazyjną stosowano stymulację zwierzęcia silnymi środkami wywołującymi odruch obronny, polegający na schowaniu nogi i głowy do muszli oraz wydalaniu hemolimfy przez pory hemalne (4, 13). W warunkach takiego pobierania otrzymuje się stosunkowo duże ilości materiału, jednakże jest on narażony na zanieczyszczenie, a także mieszanie ze śluzem produkowanym przez zwierzę. Opisywana

w doświadczeniu metoda pozwala uniknąć kontaktu materiału z powietrzem atmosferycznym, co zmniejsza możliwość jego kontaminacji. Dodatkowo, aspiracja do strzykawki umożliwia pobranie stosunkowo dużej ilości hemolimfy. Ma to związek z faktem dość szybkiego obkurczania się nakłutego naczynia, co powoduje zatrzymanie wypływu hemolimfy, a czemu przeciwdziałają mechaniczne jej wypompowywanie. Wykazano możliwość kilkakrotnego pobierania hemolimfy od tego samego osobnika przy użyciu wspomnianej metody, co jest istotne w celu monitoringu stanu zdrowia zwierzęcia.

W kolejnej części doświadczenia opracowano normy fizjologiczne wybranych parametrów biochemicznych pobranej hemolimfy ślimaka, które podano w tab. 1. Poziom aminotransferaz (AST, ALT) oraz amylazy wskazuje na aktywność trzustkowatrobę. Poziom mocznika z kolei wskazuje pośrednio na dynamikę metabolizmu białek oraz zdolność eliminacji produktów przemian białkowych przez organizm. Stężenie triglicerydów jest wskaźnikiem stanu odżywienia zwierzęcia. Wybrane parametry są więc istotne z uwagi na możliwość ich wykorzystania w ocenie stanu zdrowotnego hodowanych ślimaków. Wykazano duże rozbieżności w uzyskanych wynikach ślimaków zdrowych i znajdujących się w złej kondycji (dane niepublikowane). Uzyskane wyniki wstępnych badań z użyciem ślimaków znajdujących się w złej kondycji wskazują na możliwość wykorzystania metody oznaczeń wybranych parametrów biochemicznych do oceny stanu zdrowia ślimaków fermowych.

Istnieją badania dotyczące niektórych parametrów biochemicznych hemolimfy ślimaków (1, 2, 6, 10), również oznaczania aktywności AST, ALT, stężenia mocznika oraz triglicerydów w zależności od różnych czynników (4, 6, 7, 9), ale nie dotyczą one bezpośrednio prób oceny stanu zdrowia zwierząt w helikulturach w aspekcie *stricte* weterynaryjnym.

Podsumowując, proponowana przez autorów metoda jest dopracowana pod względem technicznym i może służyć jako instrukcja postępowania w kolejnych badaniach, w których konieczne jest przyżyciowe pobranie hemolimfy od ślimaków. Materiał pozyskany w opisany sposób jest surowcem wysokiej jakości, co jest ważne dla badań nad fizjologią i monitoringiem stanu zdrowia tych zwierząt. Ma to istotne znaczenie w aspekcie rosnącego zainteresowania ślimakami jako surowcem wykorzystywanym przez przemysł spożywczy i kosmetyczny.

Tab. 1. Normy badanych parametrów biochemicznych hemolimfy ślimaków *C. aspersum maxima*

Wartości	Parametry				
	AST (u/l)	ALT (u/l)	Mocznik (mg/dl)	TG mg/dl	AMYL u/l
Średnia arytmetyczna uzyskanych wyników	31,85	3,77	4,47	18,88	11,68
Średnie zakresy wartości wyników z uwzględnieniem odchylenia standardowego	26-38	0-11	3-6	16-20	9-16
Odsetek wyników zawartych pomiędzy wartościami liczbowymi określonymi przez odchylenie standardowe	96,5%	92%	98%	100%	100%

Piśmiennictwo

1. Bislimi K., Behuli A., Halili J., Mazreku I., Osmani F., Halili F.: Comparative Analysis of Some Biochemical Parameters in Hemolymph of Garden Snail (*Helix pomatia* L.) of The Kastriot and Ferizaj Regions, Kosovo. *Internat. J. Engin. App. Sci.* 2013, 4, 11-18.
2. Bislimi K. R., Bojniku H., Gashi A., Grapci L., Halili J., Mazreku I., Halili F.: Seasonal changes in the hemolymph biochemistry of the snail *Helix aspersa*. *FASEB Journal* 2012, 26, 735.
3. Biswas C., Sinha D., Mandal C.: Investigation on interaction of Achatinin, a 9-O-acetyl sialic acid-binding lectin, with lipopolysaccharide in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. *Mol. Immunol.* 2000, 37, 745-754.
4. Boisseaux P., Delignette-Muller M. L., Abbaci K., Thomas H., Garric J.: Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: Characterization and effects of repeated hemolymph collections. *Fish Shellfish Immunology* 2016, 57, 116-126.
5. Juříčková L., Kapouněk F.: *Helix* (Cornu) *aspersa* (O. F. Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) in the Czech Republic. *Malacologica Bohemoslovaca* 2009, 8, 53-55.
6. Mantanawy M. I.: Potential effect of *Alium cepa* and *Alium sativum* on hemolymph of *Biomphalaria alexandrina*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 2001, 31, 711-723.
7. Masola B., Chibi M., Naik Y. S., Kandare E., Zaranyika M. F.: Activities of glutamate dehydrogenase and aspartate and alanine aminotransferases in freshwater snails *Helisoma duryi* and *Lymnaea natalensis* exposed to copper. *Biomarkers* 2003, 8, 33-42.
8. Nicolai A., Filser J., Lenz R., Bertrand C., Charrier M.: Adjustment of metabolite composition in the haemolymph to seasonal variations in the land snail *Helix pomatia*. *J. Comp. Physiol. B.* 2011, 181, 457-466.
9. Nicolai A., Filser J., Lenz R., Bertrand C., Charrier M.: Quantitative assessment of hemolymph metabolites in two physiological states and two populations of the land snail *Helix pomatia*. *Physiol. Biochem. Zool.* 2012, 85, 274-284.
10. Nowakowska A., Caputa M., Rogalska J.: Seasonal changes in cryoprotectants in *Helix pomatia* snails. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006, 57, 93-105.
11. Saboor Yaraghi A. A., Farahnak A., Eshraghian M. R.: Haemolymph Components of Infected & None Infected *Lymnaea* snails with *Xiphidiocercariae*. *Iran J. Parasitol.* 2011, 6, 86-91.
12. Sakharov D. A., Rózsa K. S.: Defensive behaviour in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: the whole body withdrawal associated with exsanguination. *Acta Biol. Hung.* 1989, 40, 329-341.
13. Santos Bonfim T. C. dos, Maldonado A. Jr., Tunholi W. M., Tunholi-Alves V. M., Faro M. J., Mota E. M., Barros da Silva T. C., Pinheiro J., Silva Garcia J.: Biochemical and histopathological alterations in *Biomphalaria glabrata* due to co-infection by *Angiostrongylus cantonensis* and *Echinostoma paraensei*. *J. Invertebr. Pathol.* 2014, 115, 80-85.
14. Szkucik K., Ziomek M., Maćkowiak-Dryka M., Paszkiewicz W.: Ślimaki jadalne – użytkowość, wartość odżywcza i bezpieczeństwo dla zdrowia konsumenta. *Życie Wet.* 2011, 86, 631-635.
15. Tunholi-Alves V. M., Tunholi V. M., Amaral L. S., Mota E. M., Maldonado A. Jr., Pinheiro J., Garcia J.: Biochemical profile of *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) after infection by different parasitic loads of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda, Metastrongylidae). *J. Invertebr. Pathol.* 2015, 124, 1-5.

Adres autora: dr Jerzy Ziętek, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin; e-mail: achantina@op.pl