

КАРАКТЕРИСТИКЕ ХЕМОЛИМФЕ ВИНОГРАДСКОГ ПУЖА (*HELIX POMATIA*) ИЗ РАЗЛИЧИТИХ СТАНИШТА

Ивана Тешић, Јасна Фришчић, Радослав Декић

Природно-математички факултет, Универзитет у Бањој Луци, Младена Стојановића 2,
78000 Бања Лука, Република Српска, БиХ

Abstract

TEŠIĆ, Ivana, Jasna FRIŠČIĆ, R. DEKIĆ: CHARACTERIZATION OF ROMAN SNAIL (*Helix pomatia*) HEMOLYMPH FROM DIFFERENT HABITATS [Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, Mladena Stojanovića 2, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina]

Hemolymph represents main body fluid in snails. Its circulation is generated by rhythmic contractions of the heart and foot musculature (Sembrat, 1981). Hemolymph contains proteins, buffers, respiratory pigments and sustains homeostasis. Proteins, mainly albumins, provide colloid osmotic pressure in hemolymph. Respiratory pigments are also present and they have an important role in gas transport. Glucose content is species specific, but it also varies between individuals of the same species depending on the season and animal activity. Two types of cholinesterases are present in the hemolymph of roman snail *Helix pomatia*: soluble fraction (FS) which makes up to 90 % of the total enzyme activity, and another membrane-bound fraction soluble in detergents (DS). Hemocytes represent another characteristic of snail hemolymph. They are directly involved in the prevention of hemolymph loss during injury. Aim of this study is the comparison of several physiological parameters of hemolymph collected from snails inhabiting different habitats: mountain Ozren and Bosna riverside in Doboј municipality. These localities are portrayed by diverse abiotic and biotic factors, so our goal was to determine if differences in hemolymph parameters such as protein content, acetylcholinesterase (AChE) activity and hemocyte profile can be observed. Lower protein concentration and AChE activity was measured in hemolymph from snails collected in urban area of Doboј. Protein concentration depends on various external and internal factors which affect organisms, age, reproductive cycle animal activity etc. Observed hypoproteinemia may be the result of protein synthesis inhibition in hepatopancreas by environmental pollutants. AChE inhibition can also be attributed to the presence of anthropogenic pollution in urban area of Doboј. Due to the sensitivity of this enzyme to pesticides, it is commonly used as a reliable bioindicator of soil and water pollution. Although numerous studies have been done in this field, adequate system of classification and nomenclature of gastropod hemocytes has not been established yet. In hemolymph from both experimental groups two types of hemocytes were identified and measured.

Key words: Roman snail, acetylcholinesterase, glucose, hemocytes

Сажетак

Хемолимфа представља главну тјелесну течност пужева, чија је циркулација условљена ритмичким контракцијама срца и мишића стопала (Sembrat, 1981). Хемолимфа садржи протеине, пуферске системе и респираторни пигмент те обезбјеђује релативно сталан састав унутрашње средине организма. Протеини обезбјеђују колоидно-осмотски притисак. Главну улогу, међу протеинима, у одржавању колоидно-осмотског притиска имају албумини, док је улога глобулина

знатно мања. Посебну улогу у хемолимфи имају респираторни пигменти, који врше транспорт гасова. Концентрација глукозе у хемолимфи специфична је за сваку врсту, али је могуће варирање код једне исте јединке у зависности од њене физиолошке активности. Код пужа *Helix pomatia* откривена су два облика холинестераза: једна потпуно растворљива (FS) у хемолимфи и која чини 90% од укупне активности, и друга мембрански везана која је растворљива у детергентима (DS). Присуство хемоцита још је једна од карактеристика хемолимфе. Они директно учествују у спречавању истицања хемолимфе из организма на мјесту оштећења. Циљ рада је поређење карактеристика хемолимфе *Helix pomatia* из различитих станишта. Узорци виноградског пужа сакупљени су са два различита локалитета, од којих је један смјештен на планини Озрен, док се други налази у урбаном подручју Добоја. С обзиром на то да локалитете са којих су сакупљени узорци карактеришу различити комплекси абиотичких и биотичких услова, истраживања тјелесних течности као показатеља стања организма имају посебан значај јер истовремено служе и као биоиндикатори стања животне средине. Нижа вриједност концентрације протеина и активности ацетилхолинестеразе установљене су код јединки које су сакупљене на подручју града Добоја. Концентрација протеина зависи од многих спољашњих и унутрашњих фактора који утичу на организм, од старости организма, активности животиње, репродукције и сл. Претпостављамо да је хипопротеинија забиљежена код пужева сакупљених у урбаном подручју последица редукције синтезе протеина у хепатопанкреасу изазване повећаном концентрацијом полутаната. Активности ацетилхолинестеразе користе се као биомаркер који има широку примјену у мониторингу различитих загађења. Инактивација активности ацетилхолинестеразе код испитиване групе пужева сакупљених на подручју Добоја може се објаснити присуством антропогеног загађења. Мјесто настанка хемоцита, тип пролиферације и постојање матичних ћелија још увијек нису утврђени. Упркос сталном напретку у проучавању карактеристика хемоцита мекушаца, одговарајући систем њихове класификације и номенклатуре и даље не постоји. Ми смо на размазима хемолимфе идентификовали два типа хемоцита. Резултати нашег истраживања показују да постоје разлике у физиолошким параметрима код јединки које насељавају станишта са другачијим условима.

Кључне ријечи: *Helix pomatia*, виноградски пуж, ацетилхолинестераза, хемоцити

УВОД

Хемолимфа представља главну тјелесну течност пужева, чија је циркулација условљена ритмичким контракцијама срца и мишића стопала (Sembrat, 1981). Хемолимфа садржи бјеланчевине, пуферске системе, респираторни пигмент и обезбјеђује релативно стални састав унутрашње средине организма. Протеини обезбјеђују колоидно-осмотски притисак. Главну улогу међу протеинима у одржавању колоидно-осмотског притиска имају албумини, док је улога глобулина знатно мања. Концентрација протеина зависи од многих спољашњих и унутрашњих фактора који утичу на организм. Повећана концентрација протеина може да буде резултат одговора на присуство стресора који даље шаљу сигнал за повећање синтезе протеина у хепатопанкреасу (Troschinski и сар., 2014). Међутим, такође може да се јави и хипопротеинија као последица инхибиције синтезе протеина услед блокирања функционалних група аминокиселина због различитих полутаната. Многи радови показали су да присуство различитих ксенобиотика утиче на укупан садржај протеина код мекушаца. Једињења настала непотпуним сагоријевањем горива и честице чађи узрокују повећање садржаја укупних протеина у хемолимфи (Ismert и сар., 2002). С друге стране, изложеност загађивачима из домаћинства, резидуама

детерцента и хемијских средстава, доводи до смањења концентрације протеина у стопалу и дигестивној жлијезди пужева (Graca и сар., 2012), али и шкољки (Jagtap, 2011).

Посебну улогу у хемолимфи имају респираторни пигменти, који врше транспорт гасова тј. хемијски везују кисеоник на нивоу респираторних површина и транспортују га до ткива, гдје се отпушта и дифундује у ћелије. Респираторни пигменти могу бити локализовани екстрацелуларно, растворени у хемолимфи или у ћелијама. Хемоцијанин је респираторни пигмент растворен у тјелесним течностима многих бескичмењака, али најчешће у хемолимфи мекушаца и зглавкара. У свом молекулу, поред протеина, садржи и два јона бакра. Количина бакра у саставу хемолимфе варира и зависи од степена активности животиње. Већа је код активних облика (сипе, хоботнице), него код тромијих животиња (пужа). Иначе, овај је пигмент у оксигенисаном облику плаве боје, а у дезоксигенисаном облику је безбојан (Давидовић, 1998). Концентрација глукозе у хемолимфи специфична је за сваку врсту, али је могуће варирање код једне исте јединке у зависности од њене физиолошке активности. Максимална количина присутна је када је животиња активна (најчешће током прољећа), док се минимална концентрација биљежи у фази физиолошке пасивности. У тој фази сви физиолошки процеси сведени су на минимум, животиња се не храни активно већ користи депоноване хранљиве материје (гликоген депонован у ћелијама хепатопанкреаса код пужа). Глукоза која није потребна за производњу енергије складишти се у форми гликогена који представља потенцијални извор енергије. Највећи дио гликогена спремљен је у хепатопанкреасу и ћелијама мишића. Када се ове или друге ћелије засите гликогеном, вишак глукозе трансформише се у липиде и складишти у виду масног ткива. Холинестеразе (ChE) представљају класу серинских хидролаза које катализују цијепање естара холина. Ови ензими класификују се као ацетил- (AChE), пропионил- (PChE) и бутирил-холинестераза (BChE). Код кичмењака су то мембрански везани ензими за које се сматра да имају улогу у терминацији трансмисије импулса на холинергичким синапсама. Проучавање холинестераза код бескичмењака показало је присуство веома солубилних облика. Ови ензими често испољавају низак ниво специфичности према супстрату и широк спектар варијабилности кинетичких особина (Principato и сар., 1984). Присуство ових ензима утврђено је како код копнених и слатководних, тако и код морских мекушаца. Код пужа *Helix pomatia*, откривена су два облика холинестараза: једна потпуно растворљива (FS) у хемолимфи и која чини 90% од укупне активности, и друга мембрански везана која је растворљива у детерцентима (DS). Солубилна форма је постојан комплекс који формира крупну честицу са коефицијентом седиментације 32 S. Форма растворљива у детерцентима је амфибилни протеин са хидрофобним својствима молекулске масе 129 000. На основу вриједности V_{max}/K_m , ови ензими су ацетилхолинестараза (FS) и бутирил-холинестараза (DS), иако у највећој мјери хидролизују пропионил тиохолин (Talesa и сар., 1995). Представнике класе *Gastropoda* одликује изузетно адаптивна радијација која им је омогућила насељавање различитих еколошких ниша и типова станишта. Проучавање активности ових ензима код мекушаца од великог је значаја, првенствено због њихове потенцијалне употребе као биондикатора. Они могу да буду инхибирани директним везивањем за активни центар ензима, или индиректно као посљедица токсичног дејства пестицида и других ксенобиотика (Bukowska, 2006).

Присуство хемоцита још је једна од карактеристика хемолимфе. Они директно учествују у спречавању истицања хемолимфе из организма на мјесту оштећења тј. лезије. На мјесту повреде или лезије сакупља се већи број хемоцита, који се после неког времена међусобно сљепљују (подсећа на аглутинацију тромбоцита) и граде тзв. плазмодијални чеп који затвара разорени тјелесни зид. Ова појава представља примитиван облик заштите хемостазе оштећеног организма, као што код кичмењака обезбјеђује коагулација крви (Андрић, 2006). Упркос досадашњим сазнањима у области цитоморфометрије хемолимфе, и даље постоје проблеми у типологији хемоцита. Њихова класификација ослања се на различите критеријуме, од морфолошких до функционалних. Најчешће се хемоцити пужева диференцирају као агранулоцити (хијалиноцити) и гранулоцити са израженом способношћу фагоцитирања страног материјала. Одређивање типова и функције хемоцита мекушаца у природном окружењу од великог је значаја за проучавање основних ћелијских одговора на три основне варијабле: промјене у животној средини, употребу и утицај паразита (Martin и сар., 2007).

Узорци виноградског пужа сакупљени су са два различита локалитета, од којих је један смјештен на планини Озрен, док се други налази на обали ријеке Босне (урбано подручје града Добоја). Планина Озрен није изложена антропогеном загађењу. Локалитет на ком су сакупљене јединке може се сматрати примјером чистог, очуваног животног окружења, обраслог густом црногоричном шумом. С друге стране, подручје града Добоја под утицајем је различитих загађивача и антропогених притисака који карактеришу урбане средине: неадекватно збрињавање отпада, непостојање канализационе мреже на цијелом подручју општине, као ни постројења за сакупљање и обраду отпадних вода. Велики проблем представљају и резуде загађивача заостале у земљишту након поплава које су задесиле град Добој 2014. године. Хемолимфа пужева подложна је различитим биотичким и абиотичким утицајима из животне средине, а њихове ефекте могуће је сагледати кроз поједине физиолошке параметре. Циљ рада је поређење карактеристика хемолимфе пужева са различитих станишта. Истраживање физиолошких параметара јединки исте врсте са различитих станишта која се одликују различитим условима, од посебног је значаја јер ови параметри представљају индиректне показатеље стања животне средине. Пужеви се сврставају међу најбоље тест организме у екотоксиколошким студијама и процјени утицаја загађивача у копненим и акватичним срединама. У узорцима хемолимфе пужа урађена је карактеризација хемоцита, а утицај полутаната из животне средине сагледан је са аспекта утицаја на синтезу протеина и активност ацетилхолинестеразе.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Узорковање материјала обављено је у априлу 2016. године, на подручју града Добоја и планине Озрен. На подручју града Добоја, на обалама ријеке Босне, сакупљено је 26 јединки, док је на Озрену сакупљено укупно 16 јединки. Пужеви су стављени у тераријум, у ком су свакодневно храњени свјежом, влажном травом. Изолација и анализа хемолимфе извршена је након аклимационог периода од 14 дана. Узорци хемолимфе сакупљени су из плућне вене пужа *Helix pomatia*. Концентрација протеина у узорцима одређена је методом по Lowry-у (1951). Одређивање активности ацетилхолинестеразе вршено је колориметријском методом по Елману (Ellman и сар., 1961). Узорци хемолимфе

су центрифугирани на 5000 обртаја/мин, на температури од 4 степена. Уклоњен је супернатант, а фракција са исталоженим хемоцитима сакупљена је пипетом и од ње су направљени танки размази. Након бојења размаза комбинованом методом по Рарпенхеиму, хемоцити су посматрани под имерзионим објективом. Фотографије хемоцита направљене су помоћу камере Leica EC3. На размазима хемолимфе диференцирани су различити типови хемоцита. Димензије дуже и краће осе хемоцита одређене су помоћу софтвера Leica Application Suite 3.0.0.

РЕЗУЛТАТИ

На локалитету Добоја, концентрација протеина у узорцима хемолимфе кретала се у интервалу од 5.45 mg/ml до 9.13 mg/ml. Код јединки сакупљених на локалитету планине Озрен забиљежена је нешто виша концентрација протеина (Табела 1), која није показивала сигнификантну разлику ($p=0,432$). Вриједности активности ацетилхолинестеразе изражене су у виду јединица промјене апсорбанце (U) по маси протеина у узорку. Код пужева сакупљених на урбаном подручју града Добоја, најнижа вриједност активности АChE износила је 1400 U/mg, док је највиша забиљежена износила 2430 U/mg. Нешто више вриједности ензимске активности измјерене су у хемолимфи пужева сакупљених на планини Озрен. Код њих је минимална измјерена вриједност износила 1530 U/mg, а максимална 2910 U/mg (Табела 1).

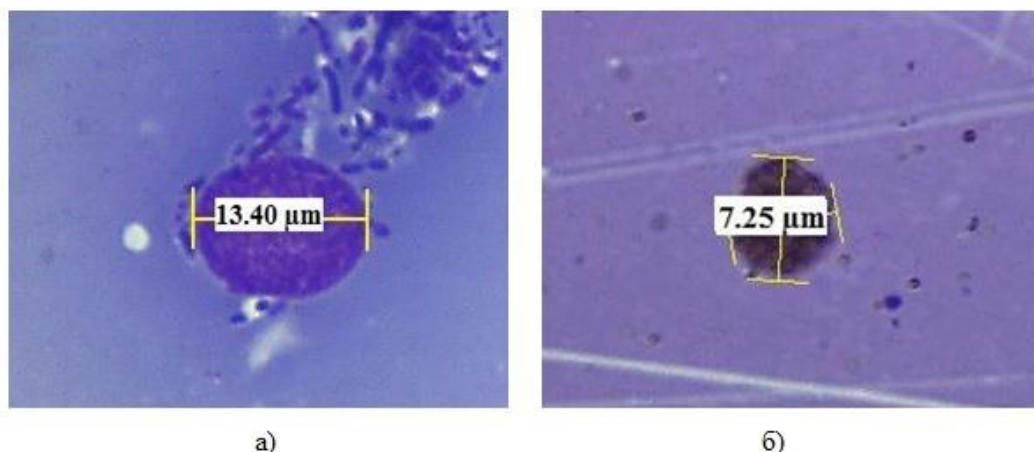
Табела 1. Вриједности концентрације укупних протеина и активности ацетилхолинестеразе у хемолимфи пужева са различитих локалитета (n – број јединки)

	Добој, обала ријеке Босне (n=10)		Планина Озрен (n=10)	
	Концентрација протеина (mg/ml)	Активност АChE (U/mg)	Концентрација протеина (mg/ml)	Активност АChE (U/mg)
Средња вриједност	7.09	1774	7.44	2174
Стандардна девијација	1.05	392.6	0.71	512.86

На танким размазима хемолимфе идентификована су два типа хемоцита. Средње вриједности димензија хемоцита приказане су у табели 2. Први тип обухвата крупније ћелије које имају способност да формирају псеудоподије на периферији. Показују висок афинитет ка киселим бојама па је цитоплазма интензивно обојена ружичастом бојом. Други тип обухвата ситније округле хемоците. Они су бројно знатно заступљенији у односу на претходни тип хемоцита. Једро је обојено плавољубичасто, а цитоплазма показује афинитет према базним бојама (Слика 1).

Табела 2. Средње вриједности димензија хемоцита идентификованих на размазима хемолимфе пужа *Helix pomatia* (n – број јединки)

Хемоцити	Дужа оса хемоцита(μm) Средња вриједност ± SD (n=10)	Краћа оса хемоцита (μm) Средња вриједност ± SD (n=10)
Тип 1	12.47±2.3	10.9±2.33
Тип 2	7.91±0.36	7.57±0.33



Слика 1. Хемоцити идентификовани на размазима хемолимфе пужа *Helix pomatia*, а – Тип 1; б – Тип 2

ДИСКУСИЈА

Резултати истраживања виноградског пужа на подручју Добоја и планине Озрен, указују на постојање разлике у концентрацији протеина хемолимфе између јединки са ова два локалитета. Концентрација протеина виша је код јединки сакупљених на планини Озрен у односу на другу испитивану групу. Nielsen и сарадници (1983) покушали су да изврше карактеризацију протеина хемолимфе виноградског пужа *Helix pomatia* имуноелектрофоретским и хроматографским техникама. Најбројнији су били протеини који транспортују кисеоник, α и β хемоцијанин, а такође су забиљежена и најмање три нереспираторна пигмента. У веома ниским концентрацијама пронађен је и хемаглутинаин. Хемолимфа пужева не садржи протеин фибриноген тако да код њих нема процеса коагулације какав постоји код кичмењака. Резултати студија Adamovicz и Bolaczek (2003) указују на то да концентрација протеина зависи од многих спољашњих и унутрашњих фактора који утичу на организам. Повећана концентрација протеина посматрана је као одговор на стрес факторе који су сигнал за повећање синтезе протеина у хепатопанкреасу. Међутим, хипопротеинемичка често се јавља као последица смањене синтезе протеина услед инхибиторног дејства различитих полутаната. Радионуклиди у чађи и издувним гасовима изазивају деградацију протеина и блокирају процес њихове синтезе на нивоу рибозома (CIESM, 2002). Bislimi и сарадници (2013) показали су двоструко нижу вриједност укупних протеина у хемолимфи пужева изложених индустријском загађењу.

Испитивања која су извели Srivatsan и сарадници 1992. године указују на то да до повећања концентрације протеина код пужева може доћи услед повећане продукције гамета. У њиховом раду најнижи ниво протеина нађен је у групи млађих јединки, док су највеће концентрације протеина установљене у хемолимфи најстаријих јединки.

Упоредивањем резултата истраживања виноградског пужа сакупљених на подручју града Добоја и планине Озрен, уочили смо постојање разлика у активности ацетилхолинестераза. На подручју планине Озрен активност АChE је за 23% виша него на другом локалитету. Иако је констатовано присуство одређених разлика, није утврђена статистички значајна разлика ($p=0,420$) у поређењу узорака из наведених локалитета. Ђорђевић и сарадници 2014. године испитивали су утицај органофосфатних једињења на

активност ацетилхолинестеразе. Органофосфатна једињења представљају иреверзибилне инхибиторе АСhЕ и имају широку примјену у пољопривреди. Степен инхибиције ензима био је углавном већи код организама код којих су доказане више концентрације органофосфатних једињења.

Употреба биомаркера у евалуацији биолошких ефеката различитих хемијских полутаната значајно је дијагностичко средство у мониторингу загађења. Активности ацетилхолинестеразе представља биомаркер који има широку примјену у мониторингу загађења различитим неуротоксичним супстанцама, тешким металима, органофосфатним и карбаматним пестицидима, полиароматичним угљоводоницима итд.

Инактивација активности ацетилхолинестеразе код испитиване групе пужева сакупљених на подручју Добоја, може се повезати са високом концентрацијом пестицида као и присуством антропогеног загађења. Ацетилхолинестераза је параметер од изузетног значаја за потврду присуства или одсуства пестицида, те се као таква користи за поуздан индикатор загађења. Она може да буде инхибирана директним везивањем за активни центар ензима, или индиректно као посљедица токсичног дејства пестицида и других ксенобиотика (Bukowska, 2006).

Степен инхибиције АСhЕ зависи од концентрације пестицида којој су организми изложени. У раду Иванца и сарадника (2009), чак и ниске концентрације тербуфоса (0.133 mg/L) који се сврстава у органофосфатне пестициде, изазива инхибицију ацетилхолинестеразе еритроцита бабушке (*Carassius gibelio*).

Ацетилхолинестераза примјењује се као специфичан биомаркер за процјену изложености организма пестицидима, нарочито код мекушаца. Пужеви су веома важни чланови како копнених, тако и водених екосистема, те су као такви изложени бројним негативним утицајима. Због њиховог широког распрострањења, начина исхране, као и промјене понашања често се користе као циљни организми за процјену загађења животне средине. Многе антропогене активности такође негативно дјелују на популације пужева.

На танким размазима хемолимфе идентификовали смо два различита типа хемоцита. Хемоцити мекушаца веома су разноврсни, а њихова бројност и изглед мијењају се у зависности од услова животне средине и физиолошког стања животиње. Број и изглед хемоцита такође је подложен промјенама изазваним старењем животиње, температуром, инфекцијама, нападима паразита, повредама, количином воде у ткивима и општим стањем организма. Старије јединке могу имати двоструко већи број хемоцита у поређењу са млађим животињама (Adamovicz и Wolaczek, 2003). Претпоставља се да су укључена три механизма пролиферације: митоза, амитоза и фрагментација цитоплазме (Sminia, 1981). Хемоцити Gastropoda имају важну одбрамбену улогу у организму, као што је нпр. фагоцитоза, инкапсулација, нодулација, одбрана од паразита, коагулација и зарастање рана (Drozdowski и Zbikowska, 1994).

Мјесто настанка хемоцита, тип пролиферације и постојање матичних ћелија још увијек нису утврђени. Многе студије указују на то да су извори хемоцита код врсте *Helix aspersa* епител плашта и везивно ткиво, зидови проводних судова код *Biomphalaria glabrata* (Sminia, 1981), а код врста рода *Doto* везивно ткиво рено-кардијалног комплекса (Kress, 1968). Упркос сталном напретку у проучавању карактеристика хемоцита мекушаца, одговарајући систем њихове класификације и номенклатуре и даље не постоји. Према неким ауторима, постоје два различита типа хемоцита (Sminia, 1981), док је

мишљење других аутора да су то само различити развојни стадијуми једног типа ћелије (Adamovicz и Bolaczek, 2003).

ЗАКЉУЧАК

У овом раду поређене су карактеристике хемолимфе врсте *Helix pomatia* који насељавају различита станишта. Узорци виноградског пужа сакупљени су са два различита локалитета, од којих је један смјештен на планини Озрен, док се други налази на обали ријеке Босне, на подручју града Добоја. Ова два проучавана локалитета карактеришу се различитим комплексима абиотичких и биотичких услова станишта. Планина Озрен није изложена антропогеном загађењу. Локалитет на ком су сакупљене јединке може се сматрати примјером чистог, очуваног животног окружења, обраслог густом црногоричном шумом. С друге стране, подручје града Добоја под утицајем је различитих загађивача и антропогених притисака који карактеришу урбане средине: неадекватно збрињавање отпада, непостојање канализационе мреже на цијелом подручју општине као ни постројења за сакупљање и обраду отпадних вода. Велики проблем представљају и резуде загађивача заостале у земљишту након поплава које су задесиле град Добој 2014. године. Резултати нашег истраживања показују да постоји разлика у физиолошким параметрима код јединки које насељавају станишта са другачијим условима. Инактивација активности ацетилхолинестеразе код испитиване групе пужева сакупљених на подручју Добоја, може се повезати са присуством антропогеног загађења. Ацетилхолинестераза је параметер од изузетног значаја за потврду присуства или одсуства пестицида, те се као таква користи за поуздан индикатор загађења.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adamowicz, A., Bolaczek, M.: Blood cells morphology of the snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae). *Zoologica Poloniae*, 48: 93–101, 2003.
2. Андрић, С.: **Упоредна физиологија животиња**. Нови Сад, Природно-математички факултет, 2006.
3. Bislimi, K., Behluli, 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. *International Journal of Engineering*, 4 (6): 11–18, 2013.
4. Bukowska, B., Hutnika, K.: 2,4-D and MCPA and their derivatives: Effect on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro). *Pesticides biochemistry and physiology*, 85, 174–180, 2006.
5. CIESM: Metal and radionuclides bioaccumulation in marine organisms. CIESM workshop monographs n°19, 128 pages, 2002.
6. Давидовић, В.: *Упоредна физиологија 1*. Завод за уџбенике и наставна средства, Београд, 1998.
7. Drozdowski, A., Zbikowska, E.: Wpływ pasozytniczych larw przywr na aktywnosc immunologiczna limaków. *Prz. Zool.* 38: (1–2): 19–23, 1994.
8. Ellman, L.G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacol.*, 7, 88–95, 1961.

9. Grara, N., Atailia, A., Boucenna, M., Khaldi, F., Berrebbah, H., Djebbar, M.R.: Effects of heavy metals on snails *Helix aspersa* bioindicators of the environment pollution for human health. International Conference on applied life sciences, Turkey, 2012.
10. Ismert, M., Oster, T., Bagrel, D.: Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolizing enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere*, 46 (2): 273–280, 2002.
11. Ivanc, A., Dekić, R., Bošković, J., Könyves, T., Miscevic, B., Vukosav, M.: Hematological indicators of aquatic environment toxicity. Proceedings of “Agriculture and countryside in our changing world”, International Scientific Conference „Hódmezővásárhely, Hungary, 2009.
12. Jagtap, J.T., Shejule, K. B., Ubarhande, S. B.: Acute effect of TBTCCL on protein alteration in freshwater bivalve, *Lamellidens marginalis*. *International Multidisciplinary Research Journal*, (8): 13–16, 2011.
13. Kress, A.: Untersuchungen zur Histologie, Autotomie und Regeneration dreier Dotoarten *Doto coronata*, *Doto pinnatifida*, *Doto fragilis* (Gastropoda, Opisthobranchiata). *Rev. de Suisse Zool.* 75: 235–303, 1968.
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275, 1951.
15. Martin, G., Oakes, C., Tousignant, H. R., Crabtree, H., Yamakawa, R.: Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *Journal of Molluscan Studies*, 73 (4): 355–365, 2007.
16. Nielsen, H.E., Koch, C., Drachmann, O.: Non-respiratory haemolymph proteins in the vineyard snail *Helix pomatia*. Changes after phagocytosis in vivo. *Developmental & Comparative Immunology* 7 (3): 413–422, 1983.
17. Principato, G., Tosi, G., Bocchini, V., Giovaninni, E.: Propionylcholinesterase from *Helix pomatia* and acetylcholinesterase from *Asterias bispinosa*: A kinetic comparative study. *Comparative biochemistry and physiology B.*, 77(1): 211–219, 1984.
18. Sembrat, K.: **Histologia porownaweza zwierzat.** PWN Warszawa, 1981.
19. Srivatsan, M., Peretz, B., Hallahan, B., Talwalker, R.: Effect of age on ecatylcholinesterase and other hemolymph protein in *Aplysia*. *Journal of comparative physiology B*, 162:29–37, 1992.
20. Sminia, T.: Gastropods. In: **Invertebrate Blood Cells.** Ratcliffe N.A. and Rowley, A.F. (eds.) *Academic Press, London–New York*, Vol. 2: 191–232, 1981.
21. Talesa, V., Grauso, M., Principato, G., Giovaninni, E., Rossi, G.: Cholinesterase in *Helix pomatia* (Gastropoda: Stylommatophora): presence of a soluble (hemolymph) and a membrane-bound form. *Comparative biochemistry and physiology B.*, 110 (3): 649–656, 1995.
22. Troschinski, S., Dieterich, A., Kraus, S., Triebkorn, R., Köhler, H. R.: Antioxidant defence and stress protein induction following heat stress in the Mediterranean snail *Xeropicta derbentina*. *Journal of Experimental Biology*, 217: 4399–4405, 2014.

Примљено: 06.02.2017.

Одобрено: 20.04.2017.