

***Helix lucorum*'un Tükrük Bezinin Histokimyasal Yapısı**

Seçil ZORLU^{1*}, Kenan ÇINAR¹, M. Zeki YILDIRIM²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Isparta, TÜRKİYE.

(*Sorumlu yazar e-mail: secilzorlu@windowlive.com)

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Burdur, TÜRKİYE.

Özet

Bu çalışma aktif dönem ve kış uykusu periyotlarındaki Helix lucorum'un tükrük bezinin histolojik ve histokimyasal yapısının belirlenmesi amacıyla yapıldı. Her iki periyottaki salyangozların tükrük bezinde farklı büyüklük, sayı ve morfolojik özelliklere sahip beş hücre tipi belirlendi ve bunlar Tip 1, 2, 3, 4, 5 olarak adlandırıldı. Histokimyasal uygulamalar sonucunda kış uykusu periyodundaki tükrük bezinde bulunan hücrelerin aktif dönem periyodundaki hücrelere göre daha kuvvetli reaksiyon verdiği saptandı. Tip 1 olarak adlandırılan hücrenin vakuollerinde tüm histokimyasal reaksiyonlara karşı reaksiyon gözlenmedi. Aktif dönem periyodunda hücre tiplerinin her birinde nötral glikokonjugat varlığına rastlanırken kış uykusu periyodunda Tip 2, 3, 4 ve 5 olarak adlandırılan hücrelerde nötral glikokonjugatlar gözlenmedi. Tip 1 ve 2 hücrelerinde ise diğer hücrelerin aksine sülfatlı asidik glikokonjugatın kış uykusu periyodunda azaldığı saptandı. Ayrıca kış uykusu periyodunda hücrelerin büyüklüklerinin küçüldüğü ve sayılarının arttığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Helix lucorum, tükrük bezi, histokimya, mukus.*

The histochemical structure of salivary gland of *Helix lucorum*

Abstract: *Five cell types had different size, number and morphological features were identified in salivary glands of Helix lucorum in the both periods and they were called as Type 1, 2, 3, 4 and 5. As a result of the histochemical applications, it was detected that the cells of salivary glands in the hibernation period showed stronger reaction than in the active period. Against not all histochemical stainings in the vakuoles of the cell called Type 1, reaction was not observed. While the neutral glycoconjugate were found in all cell types in active period, they were observed only in the cell type 1 in hibernation period. It was detected that unlike other cells the sulphated acidic glycoconjugate was decreased in type 1 and 2 in hibernation period. Also it was determined that size of the cells was decreased and number of the cells was increased in hibernation period.*

Key words: *Helix lucorum, salivary gland, histochemistry, mucus.*

Giriş

Salyangozlarda birincil karbonhidrat üretim aktivitesi bağırsaklar ile tükrük bezlerinde görülür. Bu nedenle tükrük bezleri salyangozun karbonhidrat metabolizmasına yardımcı olur (Dimitriadis, 2008). Gastropodlarda tükrük bezi morfolojik olarak şerit ya da kurdele şeklindedir (Lobo-da-Cunha ve diğ., 2008; Ferreira ve diğ., 2009). Tükrük bezleri gastropodlarda postözofagusun her iki yanında lokalize olup, bu kısım boyunca uzanırlar. Posterior kısımdaki tükrük bezi tükrük kanalına açılırken, anteriordaki yanak boşluğu ile bağlantılıdır. Tükrük bezlerinden salgılanan mukus maddesi tükrük kanalı ve yanak boşluğu vasıtasıyla ağıza iletilir (House, 1980; Serrano ve diğ., 1996; Dimitriadis, 2008). Tükrük bezleri salgıladıkları mukus sayesinde besinleri yağlama, bir araya toplama görevlerinin yanında sindirime yardımcı olma görevi de yaparlar (Serrano vd., 1996). Mukus vücutta birçok kısımda koruyucu görev yapan, jel formunda bir maddedir (Suganuma ve diğ., 1985; Katsuyama ve diğ., 1991). Mukus yapısında musin denilen glikoprotein karakterinde bir madde içerir. Musin mukusun ana bileşeni olup yüksek miktarda şeker içerir (Ota, 1991; Bransil, 1995; Allen ve diğ., 2005). Musinler sülfat ya da siyalik asitler gibi asidik grupların içeriğine bağlı olarak nötral ve asidik musinler olarak sınıflandırılırlar (Ushida ve diğ., 2007).

Salyangozun tükrük bezinin histolojik ve histokimyasal yapısının belirlenmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Fakat yapılan literatür taraması sonucunda farklı periyotlardaki (kış uykusu periyodu ve aktif dönem) tükrük bezinin histokimyasal olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada aktif dönem ve kış uykusu periyotlarında “Türk salyangozu” olarak da adlandırılan *Helix lucorum*'un tükrük bezinin histolojik ve histokimyasal yapısının belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada 6 adet aktif dönemde ve 6 adet kış uykusu periyodunda olmak üzere toplam 12 adet *Helix lucorum*'a ait tükrük bezleri materyal olarak kullanıldı. Bouin çözeltisinde 18 saat tespit edilen (Walker, 1970) dokular rutin histolojik doku takibi aşamasından sonra parafinde bloklandı. Bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitlere Tablo 1'de verilen boyama

yöntemleri uygulandı. İncelenen kesitlerin ilgili bölgelerinden Olympus CX 41 tipi ışık mikroskobu ile fotoğraf çekimi yapıldı.

Tablo 1. Uygulanan boyama yöntemleri ve yöntemlerin amaçları

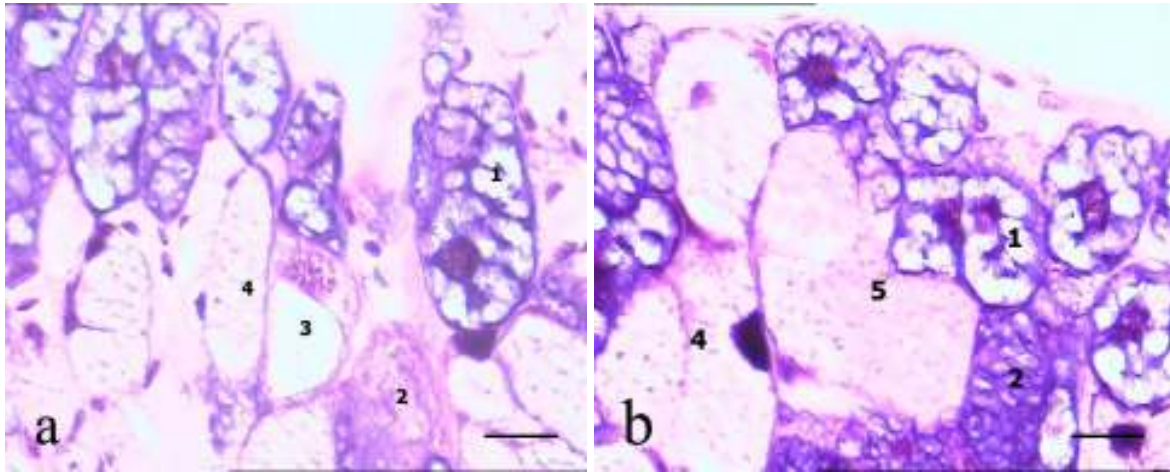
UYGULANAN YÖNTEM	UYGULANAN YÖNTEMİN AMACI
Hematoksilen-Eozin (Culling ve diğ., 1976)	Genel histolojik yapının belirlenmesi
AB pH 2.5 (Lev ve Specier, 1964)	Asidik glikokonjugatların belirlenmesi
AB pH 1.0 (Lev ve Specier, 1964)	O-sülfat esterli glikokonjugatların belirlenmesi
AB pH 0.5 (Lev ve Specier, 1964)	Güçlü sülfatlı glikokonjugatların belirlenmesi
AF (Gomari, 1952)	Sülfatlı asidik glikokonjugatların belirlenmesi
AF/AB pH 2.5 (Specier ve Mayer, 1960)	Sülfatlı ve asidik glikokonjugat kompozisyonunun karşılaştırılması
PAS/AB pH 2.5 (Mowry, 1956)	Nötral ve asidik glikokonjugat kompozisyonunun karşılaştırılması
PAS (Mc Manus, 1948)	Nötral glikokonjugatların belirlenmesi

Bulgular

Histolojik Bulgular

Yapılan histolojik incelemeler sonucunda her iki periyottaki salyangozların tükrük bezlerinde farklı büyüklük, sayı ve morfolojik özelliklere sahip beş hücre tipi belirlendi. Bu hücreler Tip 1, 2, 3, 4, 5 olarak isimlendirildi (Şekil 1). Tip 1 olarak adlandırılan hücre tipinde sitoplazmada hemen hemen eşit büyüklükte ve birbirine yakın konumlu iri vakuollere rastlandı. Bu vakuollerin sitoplazmada düzenli bir dağılım gösterdikleri saptandı. Tip 2 olarak

adlandırılan hücre tipinde sitoplazmada farklı büyüklüklerde çok sayıda vakuole rastlandı. Her iki hücre tipinde de sitoplazmada tüm histokimyasal boyama yöntemleri ile eozinofilik boyanma karakteri ve nükleusta heterokromatik özellik gözlemlendi. Tip 3 olarak isimlendirilen hücre tipinde sitoplazmada vakuole rastlanmadı. Bu hücre tipi bazale itilmiş, oldukça iri ve yoğun heterokromatik görünümlü nükleusuyla karakterize edildi. Genellikle akıtıcı kanallar etrafında bulunan hücreler ise Tip 4 olarak isimlendirildi. Bu hücre tipinde tüm sitoplazmayı kaplayan yaklaşık olarak eşit büyüklükte ve küçük vakuollere rastlandı. Tip 5 olarak adlandırılan hücre tipi ise diğer hücre tiplerinden sitoplazmasının köpüğümsü görüntüsü ve birbirine eşit büyüklükteki, yuvarlak şekilli vakuolleri ile ayırt edildi. Hücre büyüklüklerini belirlemek amacı ile her iki periyottaki salyangozlara ait tükrük bezinde her hücre tipinin ortalama büyüklükleri belirlendi (Tablo 2).



Şekil 1. Aktif dönem. *Helix lucorum* tükrük bezinde farklı hücre tiplerinin görünümü. a) Tip 1, 2, 3 ve 4 hücrelerinin görünümü. b) Tip 1, 2, 4 ve 5 hücrelerinin görünümü. Bar: 20 µm

Aktif dönem ve kış uykusu periyotlarında hücrelerin sayısı ve büyüklüklerinde ve histokimyasal reaksiyon kuvvetlerinde farklılıklar gözlemlendi. Kış uykusu periyodundaki salyangozlara ait tükrük bezlerinde aktif dönem periyoduna göre hücrelerin çaplarının küçüldüğü görüldü. Her iki periyottaki salyangozlara ait tükrük bezlerinde en çok rastlanan hücre tipinin Tip 1, en az rastlanan hücre tipinin ise Tip 5 olarak isimlendirilen hücreler olduğu belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. 1125 mm² birim alandaki hücrelerin yoğunlukları ve ortalama büyüklükleri

		TİP 1	TİP 2	TİP 3	TİP 4	TİP 5
AKTİF	SAYI	67	43	14	63	10
DÖNEM	BÜYÜKLÜK	50, 50 µm	43, 50 µm	36,50 µm	44, 50 µm	39, 0 µm
KIŞ	SAYI	105	30	19	41	7
UYKUSU	BÜYÜKLÜK	38, 10 µm	26, 50 µm	21,50 µm	28, 25 µm	21, 0 µm

Histokimyasal Bulgular

Uygulanan histokimyasal boyama yöntemlerine karşı her iki periyottaki salyangozlara ait tükrük bezlerindeki hücrelerin verdikleri reaksiyonlar Tablo 3'te belirtildi.

Aktif Dönem

Tip 1

Bu hücre tipinin vakuollerinde histokimyasal boyama yöntemlerinin hiçbirine karşı reaksiyon gözlenmedi. Sitoplazmada ise AB pH 2.5 boyama yöntemine karşı kuvvetli reaksiyon görüldü. AB pH 0.5 ve pH 1.0 uygulamalarında orta şiddete pozitif (+) reaksiyon görülürken, PAS uygulamasında zayıf olduğu belirlendi. PAS/AB Ph 2.5 kombine boyama yönteminde AB pH 2.5 (+) baskın hücrelere rastlandı. AF ve AF/AB pH 2.5 boyama yöntemlerinde bu hücrenin iki farklı formu tespit edildi. AF boyama yöntemine karşı bazı hücrelerin kuvvetli, bazı hücrelerin ise zayıf reaksiyon verdiği gözlemlendi. AF/AB pH 2.5 kombine boyama yönteminde ise bazı hücrelerin AF baskın, bazılarının da eş baskın karakter gösterdiği saptanmıştır.

Tip 2

Bu hücre tipinde hem sitoplazmada hem de vakuollerde tüm histokimyasal boyama yöntemlerine karşı pozitif (+) reaksiyon gözlemlendi. AB uygulamalarında sitoplazmada kuvvetli reaksiyon görülürken vakuollerde zayıf reaksiyon saptandı. PAS boyama yöntemine karşı hem sitoplazmada hem de vakuollerde orta şiddette reaksiyon belirlenirken, AF boyama yönteminde ise bu reaksiyonun kuvvetli olduğu saptandı. AF/AB pH 2.5 kombine boyama

yöntemi ile hücrelerdeki sülfatlı asidik ve asidik glikokonjugatların eşit miktarda oldukları tespit edildi (Şekil 2). PAS/AB pH 2.5 kombine boyama yöntemi sonucunda PAS (+) ve AB pH 2.5 (+) materyalin sitoplazma ve vakuollerde eş baskın reaksiyon gösterdiği saptandı.

Tip 3

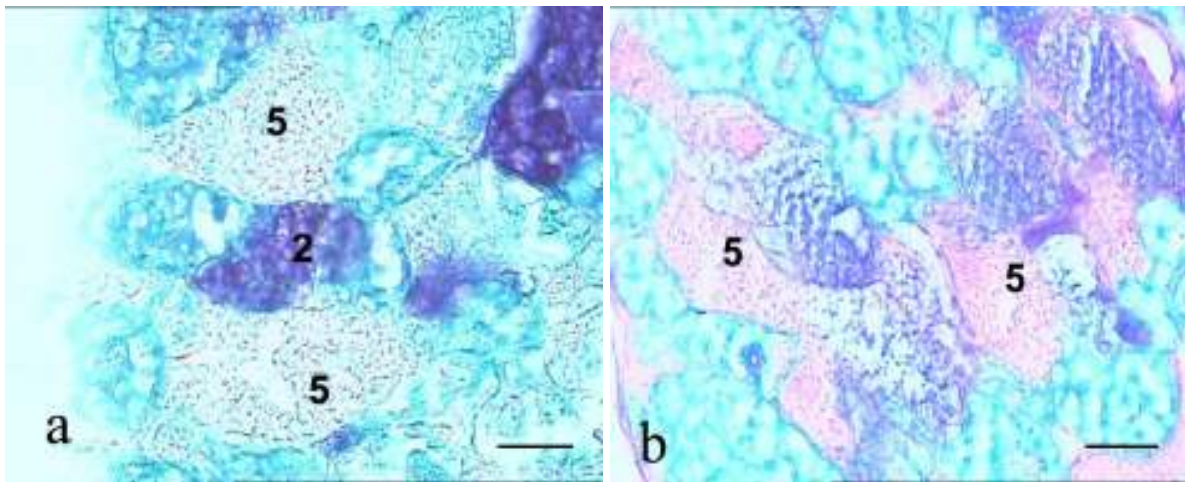
Bu hücre tipinin sitoplazmasında AB pH 2.5 uygulaması ile çok zayıf reaksiyon gözlenirken, AB pH 0.5 ve pH 1.0, AF ve PAS uygulamalarına karşı (+) reaksiyona rastlanmadı. AF/AB pH 2.5 ve PAS/AB pH 2.5 kombine boyama yöntemlerinde hücrelerin sitoplazmasının AB pH 2.5 (+) baskın karakterde olduğu gözlemlendi.

Tip 4

Bu hücre tipinde sitoplazma ve vakuollerde AB pH 1.0, pH 2.5 ve PAS boyama yöntemlerine karşı orta şiddette reaksiyon görülürken, AB pH 0.5 ve AF boyama yöntemlerinde reaksiyonun çok zayıf olduğu belirlendi. AF/AB pH 2.5 kombine boyama yönteminde AB pH 2.5 (+) baskın, PAS/AB pH 2.5 kombine boyama yönteminde ise eş baskın karakterdeki hücreler gözlemlendi.

Tip 5

Sitoplazma ve vakuollerin sadece nötral glikonjugat içerdiği saptandı (Şekil 2). Diğer histokimyasal boyama yöntemlerine karşı reaksiyon gözlenmedi (Şekil 2).



Şekil 2. Aktif dönem. *Helix lucorum* tükrük bezinde AF/ AB pH 2.5 (a) ve PAS/ AB pH 2.5 (b) uygulamalarına karşı hücre tiplerinin verdiği reaksiyonlar. a) AF/ AB pH 2.5 uygulaması, Tip 2 eş baskın (+), Tip 5 negatif (-). b) PAS/ AB pH 2.5 uygulaması, Tip 5 PAS (+). Bar: 20 µm

Kış Uykusu Periyodu

Tip 1

Bu hücre tipinde vakuollerde reaksiyon gözlenmedi. AB pH 0.5, pH 1.0, pH 2.5 boyama yöntemlerine karşı çok kuvvetli reaksiyona rastlanırken, AF boyama yöntemine karşı orta şiddetli reaksiyon saptandı. Ayrıca nötral glikokonjugat içeriğinin yoğun olmadığı tespit edildi. Kombine boyama yöntemlerinde AB pH 2.5(+) mukosubstansa rastlandı (Şekil 3).

Tip 2

Bu hücre tipinin sitoplazma ve vakuollerinde çok kuvvetli güçlü sülfatlı ve O-sülfat esterli glikokonjugata rastlandı. Asidik glikokonjugat yoğunluğunun az, sülfatlı asidik glikokonjugat yoğunluğunun ise daha az olduğu saptandı. Nötral glikokonjugat varlığına rastlanmadı. AF/AB pH 2.5 ve PAS/AB pH 2.5 kombine boyama yöntemlerinde ise AB pH 2.5 (+) karakterli hücreler gözlemlendi.

Tip 3

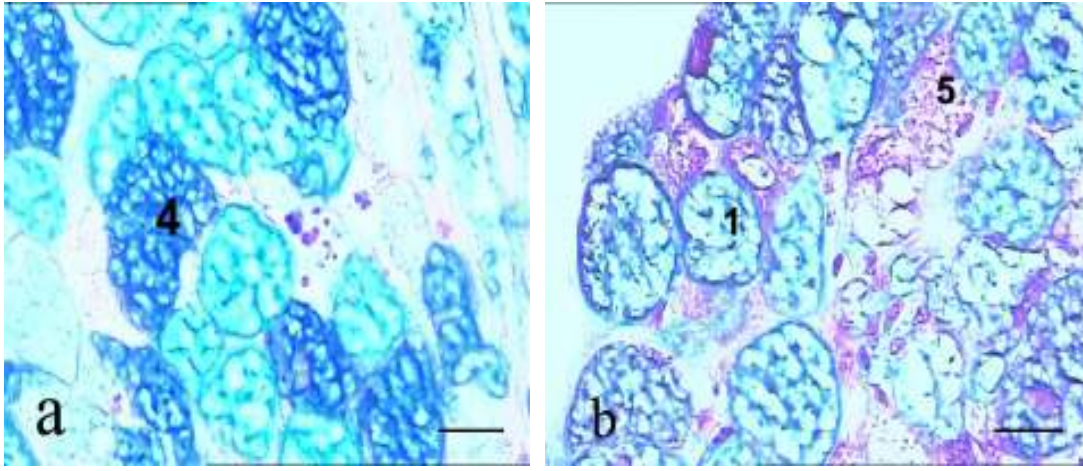
Uygulanan AB pH 0.5, pH 1.0 ve AF boyama yöntemlerine karşı zayıf, AB pH 2.5 boyama yöntemine karşı çok zayıf reaksiyon saptandı. PAS boyama yöntemine karşı reaksiyon gözlenmedi. PAS/AB pH 2.5 kombine boyama yönteminde hücrelerde sadece AB pH 2.5 (+) materyalin bulunduğu, AF/AB pH 2.5 kombine boyama yönteminde ise AF (+) materyalin baskın olduğu belirlendi.

Tip 4

Bu hücre tipinin vakuol ve sitoplazmasında AB pH 1.0 ve pH 2.5 boyama yöntemlerine karşı orta dereceli reaksiyon görülürken; AB pH 0.5 boyama yöntemine karşı zayıf, AF boyama yöntemine karşı ise kuvvetli reaksiyon tespit edildi. PAS boyama yöntemine karşı reaksiyona rastlanmadı. AF/AB pH 2.5 boyama yönteminde AF (+) baskın, PAS/AB pH 2.5 boyama yönteminde ise sadece AB pH 2.5 (+) karakterli hücreler gözlemlendi (Şekil 3).

Tip 5

Bu hücre tipinde asidik glikokonjugat yoğunluğunun az; O-sülfat esterli, sülfatlı asidik ve güçlü sülfatlı glikokonjugatların orta yoğunlukta oldukları belirlenirken, nötral glikokonjugat yoğunluğunun çok az olduğu belirlendi. AF/AB pH 2.5 boyama yönteminde AF (+) baskın (Şekil 3), PAS/AB pH 2.5 boyama yönteminde ise AB pH 2.5 (+) karakterli hücrelere rastlandı.



Şekil 3. Kış uykusu periyodu. *Helix lucorum* tükrük bezinde PAS/AB pH 2.5 (a) ve AF/AB pH 2.5 (b) uygulamalarına karşı hücre tiplerinin verdiği reaksiyonlar. a) Tip 4 AB pH 2.5 (+). b) Tip 1 AB pH 2.5 (+), Tip 5 AF (+). Bar: 20 µm

Tablo 3. Her iki periyottaki *Helix lucorum* tükürük bezi hücre tiplerinin histokimyasal boyama yöntemlerine karşı verdiği reaksiyonlar

	Tip 1		Tip 2		Tip 3		Tip 4		Tip 5	
	Sitoplazma	Vakuol	Sitoplazma	Vakuol	Sitoplazma	Sitoplazma	Vakuol	Sitoplazma	Vakuol	Vakuol
AB pH 2.5	++++	-	++++	++	+	+++	+++	-	-	-
Kış Uykusu	++++	-	++	++	+	+++	+++	++	++	++
AB pH 0.5	+++	-	++++	++	-	+	+	++	++	++
Kış Uykusu	++++	-	++++	+++	++	++	++	-	-	-
AB pH 1.0	+++	-	++++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Kış Uykusu	++++	-	++++	+++	++	+++	+++	-	-	-
AF	++++	-	++++	++++	-	++	++	-	-	-
Kış Uykusu	+++	-	+	+	++	++++	++++	+++	+++	+++
PAS	++	-	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	++
Kış Uykusu	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AF/AB pH 2.5	AF	-	AF/AB pH 2.5	AF/AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	-
Kış Uykusu	AB pH 2.5	-	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AF	AF	AF	AF	AF	AF



PAS/ AB pH 2.5	Aktif Dönem	AB pH 2.5	-	PAS	PAS/AB pH 2.5	AB pH 2.5	PAS/ AB pH 2.5	PAS/ AB pH 2.5	PAS	PAS
	Kış Uykusu	AB pH 2.5	-	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH 2.5	AB pH2.5

-: reaksiyon yok, + : çok zayıf, ++ : zayıf, +++ : orta, ++++ : kuvvetli, +++++ : çok kuvvetli,

Tartışma ve Sonuç

Farklı salyangoz ve sümüklü böceklerin tükrük bezlerine yönelik çalışmalarda Lobo-da-Cunha ve diğ., (2008)'nin *Bulla striata*'nın tükrük bezinde iki, *Limax maximus* (Beltz ve diğ., 1979)'ta dört, *Aplysia depilans* (Lobo-da-Cunha, 2001), *Philinopsis depicta* (Lobo-da-Cunha ve diğ., 2009)'da üç ve *Agriolimax reticulatus* (Walker, 1970) türünün tükrük bezinde on tip hücreye rastlandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada ise beş farklı hücre tipi belirlendi.

Serrano ve diğ. (1996) tarafından *Elona quimperiana*, *Trissexodon constrictus*, *Hygromia limbata*, *Cernuella aginnica*, *Helix aspersa*, *Capaea nemoralis* türlerinin tükrük bezinde beş farklı hücre tipine rastlandı. Bu çalışmada da araştırmacıların (Serrano ve diğ., 1996) bulgularına paralel olarak beş hücre tipi saptandı.

Moreno (1982) *Helix aspersa*'nın tükrük bezinde mukosit II olarak adlandırdığı hücrenin sitoplazmasında düzenli, iri ve çok sayıda salgı vakuollerine rastlandığını bildirmiştir. Bu çalışmada Tip 1 olarak adlandırılan hücre sitoplazmasında bulunan vakuollerin düzenli, iri ve yoğun olmasıyla morfolojik olarak mukosit II hücresi ile benzer olduğu gözlemlendi. Aynı araştırmacı Mukosit II hücresinin Alcian Blue boyama yöntemlerinin üç farklı pH değerine ve PAS yöntemine pozitif reaksiyon verdiği ve salgı vakuollerinin de yoğun reaksiyon verdiği belirtmiştir (Moreno, 1982). Benzer biçimde çalışmamızda da Tip 1 hücresinin sitoplazmasında farklı pH'lardaki AB ve PAS uygulamalarına karşı pozitif reaksiyon göstermiştir. Ancak Tip 1 hücresinin vakuollerinde uygulanan histokimyasal boyama yöntemlerine karşı pozitif reaksiyon göstermemesiyle mukosit II hücresinden farklı olduğu saptandı.

Walker (1970) *Agriolimax reticulatus*'un tükrük bezinde mukosit II olarak isimlendirilen hücrelerin asidik glikokonjugat içerdiklerini belirtmiştir. Bu çalışmada Tip 2 hücresinin aktif dönem periyodunda AB pH 2.5 uygulamasına karşı sitoplazmada kuvvetli, vakuollerde ise zayıf reaksiyon göstermesi ile mukosit II hücresine histokimyasal olarak benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Beltz ve diğ. (1979) tarafından *Limax maximus* türünün tükrük bezinde Tip 3 olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasında çapları eşit büyüklükte, homojen ve birbirine yakın konumlu olarak sitoplazmayı kaplayan vakuollere rastlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada Tip

1 olarak adlandırılan hücre vakuollerin yoğun, birbirine yakın durumlu ve homojen dağılımlı olmaları nedeniyle Tip 3 hücresi ile benzerlik göstermiştir.

Farklı periyotlardaki salyangoz türlerinin tükrük bezlerinin histokimyasal karakterlerini belirlemeye yönelik yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışma ile *Helix lucorum* tükrük bezindeki hücre tiplerinin sayılarının, büyüklüklerinin, morfolojik özelliklerinin ve histokimyasal yapılarının aktivasyona bağlı olarak değişiklik gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Allen, A. & Flemstrom, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: Protection against acid and pepsin. *Journal Physiology Cell Physiology*. 288, C1-19.
- Beltz, B. & Gelperin, A. (1979). An ultrastructural analysis of the salivary system of the terrestrial mollusc *Limax maximus*. *Tissue and Cell*. 11 (1), 31-50.
- Bransil, R., Stanley E. & Tsukahara, M. (1995). Mucin biophysics. *Annual Review Physiology*. 57, 635–657.
- Culling, C. F. A., Reid, P. E. & Dunn, W. L. (1976). A new histochemical method for the identification and visualization of both side chain acylated and non-acylated sialic acids. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 24, 1225-1230.
- Dimitriadis, V.K., (2008). Structure and function of the digestive system in stylommophora. In, Barker GM (Ed): *The biology of terrestrial mollusc*, CAB Inter, North America, 238-244,.
- Fretter, V. & Hian, K. B. (1979). The spelization of the Aplysiid gut. *Malacologia*, 18, 7-11.
- House, C. R., (1980). Phsiology of invertebrate salivary glands. *Biol Rev*, 55, 417-473.
- Gomari, G., (1952). Gomari's Aldehyde Fuchsin Stain. In: Cellular Pathology Technique. Culling, C. F. A., Allison R. T. & Barr, W. T. (Eds.) pp. 238, Butterworths, London.
- Katsuyama, T., Ota, H., Ishii, K., Nakayama, J., Kanai, M., Akamatsu, T. & Sugiyama, A. (1991). Histochemical characterization of gastric mucin-secreting cells and the

- surface mucous gel layer. In: Gastrointestinal Function: Regulation and Disturbances. Kasuya, T., Tsuchiya, M., Nagao, F., Matsuo, Y. (Eds.). *Excerpta Medica*.145-165., Amsterdam.
- Lev, R. & Spicer, S. S. (1964). Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 12, 309-309.
- Lobo-da-Cunha, A. (2001). Ultrastructural and histochemical study of the salivary glands of *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia). *Acta Zoologica*. 82, 201-212.
- Lobo-da-Cunha, A.& Calado, G. (2008). Histology and ultrastructure of the salivary glands in *Bulla striata* (Mollusca, Opisthobranchia). *Invertebrate biology*. 127 (1), 33-44.
- Lobo-da-Cunha, A., Ferreira, I., Coelho, R. & Calado, G. (2009). Light and electron microscopy study of the salivary glands of the carnivorous opisthobranch *Philinopsis depicta* (Mollusca, Gastropoda). *Tissue and cell*. 41, 367-375.
- Mc Manus, J. F. A. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*. 23, 99-108.
- Moreno, F. J., Pintero, J., Hidalgo, J., Navas, P. & Aijon, J. (1982). Histochemical and ultrastructural studies on the salivary glands of *Helix aspersa* (Mollusca). *Journal of Zoology*. 196, 343-354.
- Mowry, R. W. (1956). Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 4, 407-408.
- Ota, H., Katsuyama, K., Ishii, K., Nakayama, J., Shiozawa, T. & Tsukahara, Y. (1991). A dual-staining method for identifying mucins of different gastric epithelial mucus cells. *Journal of Histochemistry*. 23,22-28.
- Serrano, T., Gomez, B. J. & Angulo, E. (1996). Light and electron microscopy study of the salivary gland cells of Helicioidea (Gastropoda, Stylommatophora). *Tissue and Cell*. 28 (2), 237-251.
- Spicer, S. S. & Mayer D. R. (1960). Aldehyde Fuchsin/ Alcian Blue. In: Cellular Pathology Technique. Culling, C. F. A., Allison, R. T. & Barr W. T. (Eds.). pp. 233. Butterworths, London.



- Suganuma, T., Katsuyama, T., Tsukahara, M., Tatematsu, M., Sakakura, & Y. Murata, F. (1985). Comparative histochemical study of alimentary tracts with special reference to the mucous neck cells of the stomach. *Journal Anatomy*. 161, 219-238.
- Ushida, Y., Shimokawa, Y., Toida, T., Matsui, H. & Takase, M. (2007). Bovine α -Lactalbumin stimulates mucus metabolism in gastric Mucosa. *Journal Dairy Science*. 90, 541-546.
- Walker, G. (1970). Light and electron microscope investigations on the salivary glands of slug, *Agrolimax reticulatus* (Müller). *Protoplazma*. 71, 111-12.