

***Helix lucorum*' un Tükürük Bezindeki Glikokonjugatların Lektin Histokimyası ile Belirlenmesi**

Seçil ZORLU*, Emel DEMİRBAĞ, Kenan ÇINAR
Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ISPARTA
Alınış Tarihi:09.12.2010, Kabul Tarihi:15.03.2011

Özet: Bu çalışmada *Helix lucorum*' un tükürük bezinde büyüklük ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak beş hücre tipi tespit edildi. Bu hücreler Tip 1, 2, 3, 4 ve 5 olarak isimlendirildi. Yapılan sayımlar sonucunda tükürük bezinde en fazla Tip 1, en az Tip 3 hücrelerinin bulunduğu belirlendi. Hücrelerin çaplarının ölçülmesi sonucu en büyük hücrenin Tip 1, en küçük hücrenin Tip 3 olduğu saptandı. Tip 1 ve 2 hücrelerinin uygulanan *Dolichos biflorus* (DBA), *Ulex europaeus* (UEA-1), *Arachis hypogaea* (PNA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Bandeiraea simplicifolia* (BSA I-B₄), *Triticum vulgare* (WGA) lektinlerinin hepsine karşı reaksiyon verdiği belirlendi. Bu iki hücre tipinin BSA I-B₄ ile zayıf reaksiyon verdiği gözlenirken, PNA ve DBA ile kuvvetli reaksiyon verdiği saptandı. Tip 3, 4 ve 5 hücrelerinin ise uygulanan hiçbir lektine karşı reaksiyon göstermediği belirlendi.

Anahtar sözcükler: *Helix lucorum*, Tükürük Bezi, Glikokonjugat, Lektin Histokimyası.

Determination of Glycoconjugates in *Helix lucorum*'s Salivary Gland by Lectin Histochemistry

Abstract: In this study taking into account the size and morphological features, the five types of cells were determined in salivary glands of *Helix lucorum*. These cells were called as type 1, 2, 3, 4 and 5. As a result of the counts it was identified that type 1 cell was the highest number and type 3 cell was the lowest number. As a result of the measuring the diameters of the cells it was detected that the largest cell was type 1 and the smallest cell was type 3. Type 1 and 2 cells showed the positive reaction against the all of the applied lectins that *Dolichos biflorus* (DBA), *Ulex europaeus* (UEA-1), *Arachis hypogaea* (PNA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Bandeiraea simplicifolia* (BSA I-B₄), *Triticum vulgare* (WGA). While it was observed that these two types cells were given the weak reaction against the BSA I-B₄, the strong reaction against PNA and DBA. Type 3, 4 ve 5 cells did not showed reaction against the any of the applied lectins.

Keywords: *Helix lucorum*, Salivary Gland, Glycoconjugate, Lectin Histochemistry.

Giriş

Tükürük bezleri gastropodların genelinde olduğu gibi salyangozların da sindirim sisteminde önemli bir yer tutar (Lobo-da-Cunha ve Calado 2008). Tükürük bezleri gastropodlarda postözofagusun her iki yanında lokalize olup, bu kısım boyunca uzanırlar. Posterior kısımdaki tükürük bezi, tükürük kanalına açılırken anteriordaki yanak boşluğu ile bağlantılıdır. Tükürük bezlerinden salgılanan mukus maddesi tükürük kanalı ve yanak boşluğu vasıtasıyla ağıza iletilir (House, 1980; Serrano vd., 1996; Dimitriadis, 2008). Salyangozlarda birincil karbohidrat üretim aktivitesi bağırsaklar ile tükürük bezlerinde görülür. Bu nedenle tükürük bezleri salyangozun karbohidrat metabolizmasına yardımcı olur (Dimitriadis, 2008). Tükürük bezleri salgıladıkları mukus sayesinde besinleri yağlama, bir araya toplama görevlerinin yanında sindirime yardımcı olma görevi de yaparlar (Serrano vd., 1996). Mukus; epitelyal yüzeylerden salgılanan ya da tükürük gibi sıvılarda bulunan bir madde olup, inorganik tuzlar ve müssinden oluşur (http). Müsinlerin histokimyasal yapılarını belirlemek için klasik histokimyasal yöntemlerin dışında lektinler de kullanılmaktadır (Nicolson ve Singer, 1971). Lektinler bitki ve hayvanlardan izole

edilebilen, hücredeki karbohidrat kalıntılarına tersinir olarak yüksek özgüllük gösteren protein ya da glikoproteinlerdir. Bu özellikleri ile lektinler hücre ve dokulardaki glikokonjugatları belirlemek için yapılan histokimyasal çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Goldstein vd., 1977; Barondes, 1981; Unlenbruck, 1981; Sato ve Spicer 1982; Drickamer, 1988; Haseenabeevi vd., 1991; Kiernan, 2010). Yapılan literatür taramasında omurgasızlarda sindirim bezleri (Robledo vd., 1997), kuşlarda (Samar vd., 1999; Samar vd., 2002) ve memelilerde (Pedini vd., 1994; Pedini vd., 1997; Suprasert vd., 2001; Mohamed vd., 2008) tükürük bezlerinin lektin histokimyasal karakterini belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmasına karşın, salyangozlarda bu konu üzerine yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada *Helix lucorum*' un tükürük bezinde Con A, PNA, UEA-1, DBA, BSA I-B₄, WGA lektinlerinin kullanılmasıyla glikokonjugatların belirlenmesi amaçlanmıştır.

*secilzorlu@windowlive.com

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 12 adet *Helix lucorum*'a ait tükürük bezleri materyal olarak kullanıldı. Bouin çözeltisinde 18 saat tespit edilen dokular rutin histolojik doku takibi aşamalarından geçirildikten sonra parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitlere lektin histokimya yöntemi uygulandı. Bu yöntemle göre kesitler 10 dakika %0,3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi ve daha sonra distile su ile çalkalandı. Ardından kesitler %1'lik Bovine Serum Albumine (BSA) içeren 0,1 M ve pH 7,2'lik PBS (phosphate buffer saline) ile yıkandı ve PBS içinde çözölmüş Çizelge 1' de belirtilen

Horseradish Peroksidaz (HRP) bağlı lektinlerle bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler PBS ile yıkandı. HRP lektinlerle bağlantı içeren bölgelerin tespit edilmesi için kesitler DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)'da 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskobu ile incelendi ve ilgili kısımlardan fotoğraf çekimi yapıldı. Ayrıca hücre tiplerinin yoğunluklarının belirlenebilmesi için 2500 mm²'lik seçilen 4 farklı alanda sayım yapıldı. Hücre çaplarının belirlenebilmesi için de her bir hücre tipinden 10'ar tanesi ölçülerek ortalama hücre büyüklükleri hesaplandı (Çizelge 2).

Çizelge 1. Kullanılan lektinlerin izole edildiği türler ve karbohidrat özgünlükleri

Lektin Adı	Tür Adı	Karbohidrat özgünlüğü
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α-D-Man, α-D-Glc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β-D-Gal1, β-D-GalNAc
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	α-L-Fuc
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	α-D-GalNAc
BSA I-B ₄	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	α-D-Gal
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	α-D-[GlcNAc] _n ve sialik asit

Bulgular

1. Histolojik Yapı

Yapılan histolojik incelemeler sonucunda salyangozların tükürük bezlerinde farklı büyüklük ve morfolojik özelliklere sahip beş hücre tipi belirlendi. Bu hücreler Tip 1, 2, 3, 4, 5 olarak isimlendirildi. Tip 1 olarak adlandırılan hücre tipinin iri ve yaklaşık olarak eşit büyüklükte vakuollere sahip olduğu belirlendi. Tip 2 hücrelerinde sitoplazmada dağınık halde ve birbirinden farklı büyüklükte vakuoller gözlemlendi. Tip 3 hücreleri bazale itilmiş, oldukça iri ve yoğun heterokromatik görünümü nükleuslarıyla karakterize edildi. Tip 4 hücrelerinin yaklaşık olarak eşit büyüklükte ve küçük vakuollere sahip oldukları ve genellikle akıtıcı kanallar etrafında buldukları

belirlendi. Tip 5 hücrelerinin ise sahip oldukları eşit büyüklükteki vakuollerin sitoplazmada köpüğümsü bir görüntü oluşturduğu saptandı. Mikrometrik ölçümler sonucunda beş hücre tipine ait sayı ve büyüklükler Çizelge 2.'de verildi.

2. Lektin Histokimyası

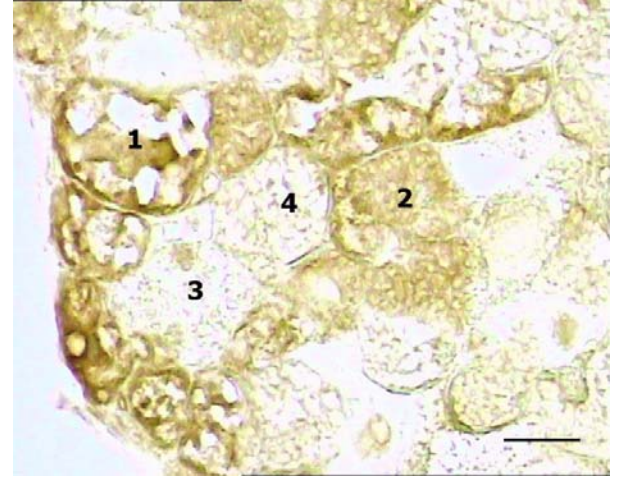
Lektin histokimyasal uygulamalar sonucu elde edilen işaretlenme yoğunlukları Çizelge 3'te verildi. Tip 3, 4 ve 5 hücrelerinin uygulanan lektinlere karşı reaksiyon göstermediği, Tip 1 ve 2 hücrelerinin tüm lektinlere karşı farklı şiddette reaksiyon verdiği belirlendi (Şekil 1, 2, 3, 4).

Çizelge 2. 2500 mm² alandaki ortalama hücre yoğunlukları ve ortalama büyüklükleri

	1	2	3	4	5
SAYI	31	19	3	27	4
BÜYÜKLÜK	55,2 µm	44,2 µm	32,5 µm	46,59 µm	38,6 µm



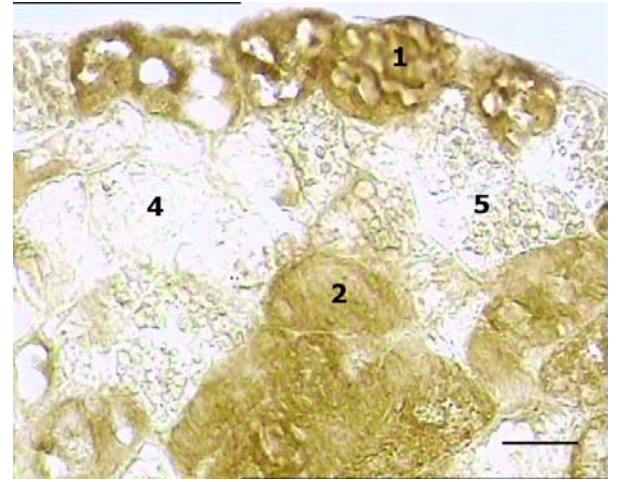
Şekil 1. *H. lucorum*' un tükürük bezinde WGA'ya karşı orta şiddette reaksiyon gösteren Tip 1 (1) ve Tip 2 (2) hücreler ile WGA-negatif Tip 3 (3) ve Tip 5 (5) hücreler. Bar: 20 μ m



Şekil 3. *H. lucorum*' un tükürük bezinde BSA I-B₄'e karşı zayıf şiddette reaksiyon gösteren Tip 1 (1) ve Tip 2 (2) hücreler ile BSA I-B₄-negatif Tip 3 (3) ve Tip 4 (4) hücreler. Bar: 20 μ m



Şekil 2. *H. lucorum*' un tükürük bezinde PNA'ya karşı kuvvetli reaksiyon gösteren Tip 1 (1) ve Tip 2 (2) hücreler ile PNA-negatif Tip 3 (3) ve Tip 5 (5) hücreler. Bar: 20 μ m



Şekil 4. *H. lucorum*' un tükürük bezinde Con A'ya karşı kuvvetli reaksiyon gösteren Tip 1 (1) ve Tip 2 (2) hücreler ile Con A-negatif Tip 4 (4) ve Tip 5 (5) hücreler. Bar: 20 μ m

Çizelge 3. *H. lucorum* tükürük bezi hücrelerindeki glikokonjugatların lektinlere karşı verdiği reaksiyonlar

LEKTİNLER	HÜCRE TİPLERİ				
	1	2	3	4	5
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> (BSA I-B ₄)	+	+	-	-	-
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	++	++	-	-	-
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	+++	+++	-	-	-
<i>Ulex europaeus</i> (UEA-1)	+++	+++	-	-	-
<i>Canavalia ensiformis</i> (Con A)	+++	+++	-	-	-
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	++	++	-	-	-

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

Tartışma

Sığırlarda (Pedini vd., 1997) ebner bezlerinin salgı ve kanal hücrelerinde, *Bubalus bubalis* (Mohamed vd., 2008) nazolabial bezi epidermis hücreleri ve korpus glandula hücrelerinde, *Mytilus galloprovincialis* (Robledo vd., 1997) sindirim bez, tübülleri ve kanal hücrelerinde yapılan lektin histokimyasal çalışmalar sonucunda α -L-Fukoz uçlu glikokonjugatların bulunmadığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmada da araştırmacıların (Pedini vd., 1997; Robledo, 1997; Mohamed vd., 2008) bulgularıyla uyumlu olarak Tip 3, 4 ve 5 hücrelerinde UEA-I lektini ile reaksiyon gözlenmedi. Tip 1 ve 2 olarak adlandırılan hücrelerde fazla miktarda α -L-Fukoz içeren glikokonjugat saptandı.

Suncus murinus (Suprasert vd., 2001) submandibular bezlerindeki seröz ve müköz karakterli hücrelerde, sığırlarda (Pedini vd., 1997) ebner bezlerindeki salgı ve kanal hücrelerinde, *Spheniscus magellanicus* (Samar vd., 1999) minör tükürük bezi hücrelerinde, tavuk (Samar vd., 2002) damak tükürük bezi hücrelerinde PNA, WGA ve DBA lektinlerine ait pozitif materyal saptanmıştır. Bu çalışmada da benzer olarak Tip 1 ve 2 hücrelerinde bu lektinlere karşı pozitif reaksiyon gözlendi. Diğer hücre tiplerinin ise bu lektinlere reaksiyon vermediği saptandı.

Köpekte (Pedini vd., 1997) parotid bezi korpus glandula ve kanal hücrelerinde ve *Mytilus galloprovincialis* (Robledo vd., 1997) sindirim bezi tübülleri ve kanal hücrelerinde az miktarda, *Bubalus bubalis* (Mohamed vd., 2008) nazolabial bezi epidermis hücreleri ve korpus glandula hücrelerinde oldukça yoğun α -D-Mannoz ve α -D-Glikoz uçlu glikokonjugat varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada da Tip 1 ve 2 hücrelerinde α -D-Mannoz ve α -D-Glikoz uçlu glikokonjugatlara yoğun olarak rastlandı.

Köpek (Pedini vd., 1994) parotid bezi hücrelerinde ve sığır (Pedini vd., 1997) ebner bezi hücrelerinde DBA ve WGA lektinlerinin apikal sitoplazmada yerleşim gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Tip 1 ve 2 hücrelerinde bu lektinlerin sitoplazmadaki vakuollerin arasında homojen bir dağılım gösterdikleri saptandı.

Kaynaklar

- Barondes, S.H. 1981. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. Annual Review Biochemistry, 50, 207-231.
- Dimitriadis, V.K. 2008. Structure and Function of the digestive system in stylommophora. In, Barker, G.M. (Editor): The biology of terrestrial mollusc, CAB Inter, North America, 238-244.
- Drickamer, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. Journal of Biological Chemistry, 263 (20), 9557-9560.
- Goldstein, I.R., Murphy, L.A., Ebisu, S. 1977. Lectins as carbohydrate-binding proteins. Pure and Applied Chemistry, 49, 1095-1103.
- Haseenabeevi, V., Remani, P., Anil, S., Vijayakumar, T. 1991. Plant lectins histochemical and cytochemical applications in oncology. Indian Journal of Dental Research, 2(3-4), 45-53.

- House, C.R. 1980. Physiology of invertebrate salivary glands. *Biology Reviews*, 55, 417-473.
- Kiernan, J.A. 2010. Carbohydrate histochemistry. In, Kumar GL, Kiernan JA (Editors): *Special stains and H&E*. 2th ed, 75-92, Dako North America, California.
- Lobo-da-Cunha, A., Calado, G. 2008. Histology and ultrastructure of the salivary glands in *Bulla striata* (Mollusca, Opisthobranchia). *Invertebrate Biology*, 127, 33-44.
- Mohamed, K., Ahmed, A., Amin, H., Tokuma, Y. 2008. Histochemical analysis of glycoconjugates in the muzzle skin of Egyptian water buffalos (*Bubalus bubalis*) with special reference to the glandular structure. *Journal of Veterinary Anatomy*, 1, 73-80.
- Mucins. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/molecules/mucins.html>. (Erişim tarihi: 01. 11. 2010).
- Nicolson, G.L., Singer, S.J. 1971. Ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy, application to saccharides bound cell membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68, 942-945.
- Pedini, V., Ceccarelli, P., Gargiulo, A.M. 1994. Localization of glycoconjugates in dog parotid gland by lectin histochemistry. *Veterinary Research Communications*, 18, 269-279.
- Pedini, V., Gargiulo, A.M., Ceccarelli, P. 1997. Basic and lectin histochemical characterization of bovine gustatory (von Ebner's) glands. *Anatomy Histology Embryology*, 26, 223-226.
- Robledo, Y., Madrid, J.F., Leis, O., Cajaraville, M.P. 1997. Analysis of the distribution of glycoconjugates in the digestive gland of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* by conventional and lectin histochemistry. *Cell and Tissue Research*, 288, 591-602.
- Samar, M.E., Avilla, R.E., De Fabro, S.P., Porfirio, V., Esteban, F.J., Pedrosa, J.A., Peinado, M.A. 1999. Histochemical study of magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) minor salivary glands during postnatal growth. *The Anatomical Record*, 254, 298-306.
- Samar, M.E., Ávila, R.E., Esteban, J.F., Olmedo, L., Dettin, L., Massone, A., Pedrosa, J.A., Peinado, M.A. 2002. Histochemical and ultrastructural study of the chicken salivary palatine glands. *Acta Histochemica*, 104 (2), 199-207.
- Sato, A., Spicer, S.S. 1982. Ultrastructural visualization of galactose in glycoprotein of gastric surface cells with a peanut lectin conjugate. *Histochemical Journal*, 14, 125-138.
- 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.
- Suprasert, A., Juntaravimol, S., Ruensupapichat, P., Srisai, D., Koonjaenak, S. 2001. Lectin histochemical studies in submandibular salivary gland of the house musk shrew, *Suncus murinus*. *Natural Sciences*, 35, 304-310.
- Unlenbruck, G. 1981. Lektine, toxine and immunotoxine. *Naturwissen*, 68, 606-612.