Original Article

Study of Expression Type IV Collagen During Mouse Kidney ubulogenesis in Balb/c Mouse

Moeen A.A., Ph.D., Jalali M., Ph.D., , Nikravesh M.R., Ph.D.*, Karimfar M.H. Rafighdoost H., Ph.D. Saeedi Nejat Sh., M.D.

** Deprtment of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.*

Abstract

Purpose: In this study specific antibody have been used for tracing type IV collagen basement membrane during renal tubules morphogenesis in mouse fetuses.

Materials and Methods: 20 female Balb/C mice were selected randomly and were kept under normal condition, finding vaginal plug was assumed as day zero of pregnancy. 12 pregnant mice were sacrified by cervical dislocation in one of gestational days 13-18 and their fetuses were fixed, serially sectioned and immunohistochemistry study for tracing of collagen type IV in BMG was carried out. The same processes were used for kidneys preparation on 5, 10,15 and 20 postnatal days newborns of 2 mothers for each day.

Results: Based on our data, Collagen IV showed weak reaction on day 14 of gestation in tubular BM. The amount of collagen increased continuously until next days of fetal life and primary of 5 days postnatal in BM. After this period, collagen IV reaction was not showed significant change in newborns.

Conclusion: These results indicate that developmental changes in various nephron segments from most immature stages to most differentiated structures are dependent to the type IV collagen expression.

Key words: Collagen IV, Tubulogenesis, Kidney, Mouse.

مقاله تحقیقی

مطالعه بیان کلاژن نوع IV طی شکل‌گیری توبول‌های کلیوی موش balb/c

عباسعلی معین .Ph.D*، مهدی جلالی .Ph.D **، محمد رضا نیکروش.Ph.D **، محمد حسن کریمفر .Ph.D *
هوشنگ رفیقدوست .Ph.D *، شهین سعیدی نجات .M.D ****

*گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران
**گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
***گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

تاریخ وصول: خردادماه ۸۷، تاریخ پذیرش: مردادماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی برای ردیابی کلاژن نوع IV و تغییرات آن در شکل‌گیری توبول‌های کلیوی جنین موش
مواد و روش‌ها: این مطالعه به‌روش تجربی انجام شد. برای این منظور ۲۰ موش ماده نژاد Balb/C به‌طور تصادفی انتخاب شده و پس از مراقبت در شرایط استاندارد و جفت‌گیری، وجود پلاگ واژن در هر یک از آنان به منزله روز صفر بارداری تلقی شد. آنگاه در هر یک از روزهای ۱۳ تا ۱۸ بارداری یک موش قطع نخاع شده و جنین‌های حاصل تثبیت و آماده‌سازی بافتی شدند تا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و ردیابی کلاژن نوع IV در غشای پایه، مورفوژنز توبول‌های کلیوی در دوران جنینی موش مورد ارزیابی قرار گیرد. مشابه این عمل در مورد کلیه مربوط به نوزادان متعلق به ۲ مادر نیز در هر یک از روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پس از تولد انجام شد.
یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ظهور کلاژن در غشای پایه توبول‌های کلیوی از روز چهاردهم جنینی با واکنش ضعیف ظاهر شده و در روزهای بعد افزایش یافته و شدت آن تا روز پنجم پس از تولد ادامه می‌یابد اما پس از آن تغییری پیدا نمی‌کند.
نتیجه‌گیری: الگوی نحوه توزیع کلاژن IV نشان‌دهنده این موضوع است که تنظیم فعالیت‌ها و پیشروی شاخه‌های جوانه حالبی به درون مزانشیم در گروی تغییرات اولیه ماده خارج سلولی در زمان شکل‌گیری توبول‌هاست. نتایج حاصل بر این موضوع دلالت دارد که شکل‌گیری بخش‌های مختلف نفرون‌ها و تبدیل ساختار نابالغ آن به نفرون‌های بالغ به ظهور کلاژن نوع IV وابسته است.

کلیدواژه‌ها: کلاژن نوع IV، شکل‌گیری توبولی، کلیه، موش.

مقدمه

یافته‌های مختلف تا کنون انواع مختلفی از کلاژن را در بافت‌های موجودات زنده نشان داده و مشخص شده است که تنوع آن‌ها به‌دلیل تفاوت در ماهیت پلی‌پپتیدهای تشکیل

آدرس مکاتبه: ایران، مشهد، میدان آزادی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
E mail:Nikravesh@hotmail.com

دهنده آن‌هاست [۱]. از کنار هم قرار گرفتن مولکول‌های مارپیچ کلاژن، رشته‌های کلاژن به‌وجود می‌آیند [۲]. نحوه قرار گرفتن مارپیچ‌ها طوری است که انتهای مولکول‌های مجاور روی هم قرار می‌گیرند. این نحوه قرارگیری باعث می‌شود که رشته‌های کلاژن قابلیت کشش زیادی داشته باشند و استحکام لازم را به ساختمان‌های موجود زنده به‌دنبال داشته باشند [۳]. برخلاف سایر کلاژن‌ها که ساختار رشته‌ای (فیبریل) یا رتیکولر دارند، کلاژن نوع IV دارای ساختمان غیرپلیمری است و جزء ساختار اصلی غشاهای پایه محسوب می‌شود [٤]. اگرچه پروتئین‌های دیگری از قبیل لامینین و فیبرونکتین نیز در تشکیل غشای پایه نقشی سازنده ایفا می‌نمایند اما کلاژن نوع IV به‌عنوان فراوانترین ترکیب غشای پایه اپیتلیالی یا اندوتلیالی از اهمیت به‌سزایی بر خوردار است زیرا این ماده می تواند داربستی را به‌وجود آورد که بقیه اجزای غشای پایه روی آن ساخته می‌شوند [۵]. برای شکل‌گیری توبول‌های کلیوی لازم است که انشعابات جوانه حالبی به داخل پارانشیم متانفریک نفوذ نموده و پس از انشعابات پی در پی به تشکیل لوله‌های جمع‌کننده ادراری منجر شود [٦]. در این مرحله که در حدود روز یازدهم جنینی موش و معادل هفته پنجم جنینی انسان محسوب می‌شود [۷]. مطالعات جنین‌شناسی نشان می‌دهد که بخش انتهایی لوله‌های جمع‌کننده باعث القای سلول‌های مزانشیمی متانفریک شده و در روز سیزدهم جنینی موش به لوله‌های متانفریک تبدیل می‌شوند [۸]. در این مرحله به موازات اینکه بخش دیستال توبول‌های کلیوی در حال شکل‌گیری و کامل شدن هستند انتهای پروگزیمال آنها توسط گلومرول‌های تمایز یافته انواژینه می‌شود. با اتصال بخش دیستال و پروگزیمال است که تکامل بخش‌های متعدد یک نفرون شامل کورپوسکول‌های کلیوی، لوله‌های در هم پیچیده پروگزیمال، قوس هنله و لوله‌های در هم پیچیده دیستال شکل گرفته و ارتباط خود را به لوله‌های جمع‌کننده ادراری پیدا می‌کنند [۹]. مطالعات نشان داده است که فیبروبلاست‌ها مسئول سازنده اسیدهای‌آمینه‌ای هستند که منجر به تشکیل مولکول‌های پیش‌ساز کلاژن (Procollagen) می‌شوند. این مولکول‌ها تحت اثر آنزیم پروکلاژن پپتیداز به تروپوکلاژن تبدیل می‌شوند وتروپوکلاژن پلیمریزه شده کلاژن را می‌سازد و به کمک اسید هیالورونیک که از انواع ماده زمینه بی‌شکل است از پراکنده شدن الیاف آن جلوگیری می‌کند تا در غشای پایه رسوب داده شود [۱۰]. از آنجا که در زمان شکل‌گیری توبول‌های کلیوی ماده خارج سلولی و به تبع آن غشای پایه توبولی در شکل‌گیری بخش‌های مختلف نفرون‌ها بی تاثیر نیست، در این مطالعه سعی شده است تا طی روند شکل‌گیری نفرون‌ها و تبدیل ساختار آنها به نفرون‌های بالغ نحوه ظهور کلاژن نوع IV در غشای پایه این بخش از ساختار کلیه مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

با انتخاب تصادفی ۲۰ موش باکره نژاد Balb/c و تعیین روز صفر بارداری در آنان در هریک از روزهای ۱۳ تا ۱۸ بارداری، روزانه ۲ موش با استفاده از کلروفرم مورد بیهوشی قرار گرفته و پس از قطع نخاع و سزارین، جنین‌های مربوط به آنان جمع‌آوری و مطابق روش‌های معمول بافت‌شناسی تثبیت و آماده‌سازی بافتی انجام شد. مشابه این عمل برای نوازدان موش‌های باقیمانده در هر یک از روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پس از تولد به انجام رسید. بدین‌ترتیب که در هر یک از روزهای یاد شده کلیه‌های نوزادن متعلق به ۲ موش مطابق روش‌های یاد شده آماده سازی شدند.

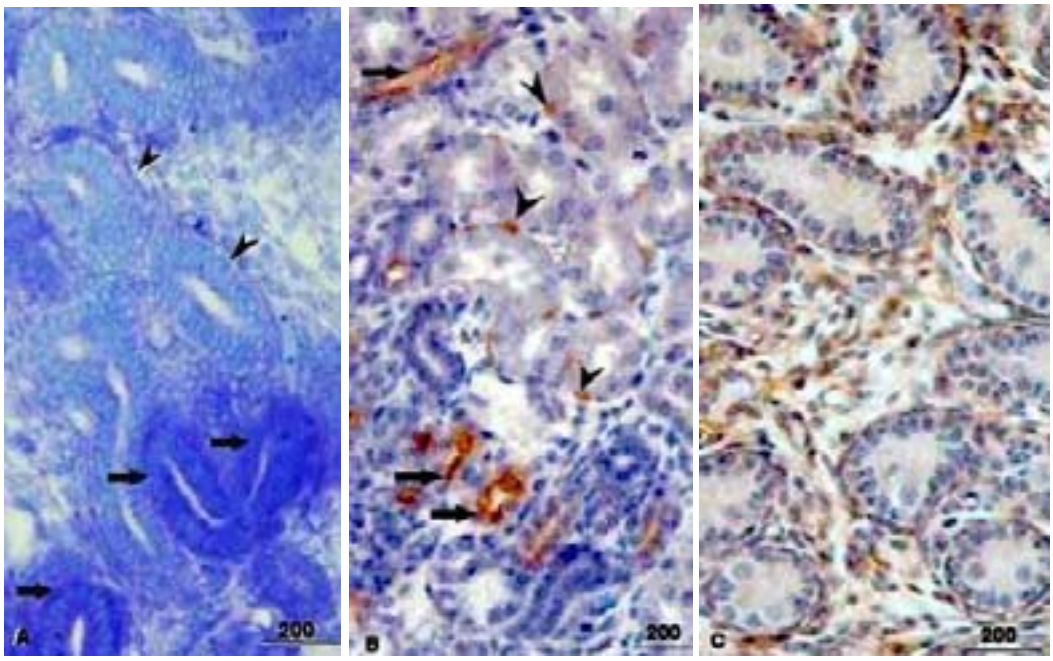
سرانجام از همه نمونه‌های جنینی و نوزادی بلوک‌های پارافینی و برش‌هایی با ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی و آبدهی برش‌هایی که از ناحیه کلیه‌ها در جنین‌ها و نوزادان به‌دست آمده به میزان دو بار و هر بار به

مدت ۵ دقیقه در بافر تریس (حاوی ۱/۵٪ کلرور سدیم در pH =۷/٤) شستشو داده شد. برای بلوک کردن آنتی ژن‌های غیراختصاصی، ابتدا برای مدت ۳ ساعت، برش‌ها در مجاورت تریتون X100 ۳ /۰درصد در بافر تریس و goat serum و پس از آن برای مهار فعالیت آندوژناز پراکسیداز به مدت ۱ ساعت در محلول ۳ درصد آب اکسیژنه در متانول قرار گرفت و پس از آن برای مدت ٢٤ ساعت با آنتی‌بادی کلاژن IV (کانژوگه شده با Horse radish peroxidase) با رقت ۱ به ۵۰ مجاورت یافته و سپس مجدداً در محلول تریس بافر حاوی تریتون ۳ درصد و سرم ۲ درصد قرار گرفت و آنگاه ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس شستشو داده شد. پس از این مرحله، برش‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در معرض دی- آمینوبنزدین (Di-aminobenzidine) حاوی ۰/۰۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شده و در آخرین مرحله پس از شستشوی نمونه‌ها برای ایجاد رنگ زمینه از هماتوکسیلین استفاده شد. برش‌هایی که بدین ترتیب آماده مطالعه شدند با استفاده از ژل گلیسرول تثبیت شدند. با این روش رنگ آمیزی، کلاژن مورد نظر براساس میزان پیدایش، به آنتی‌کلاژن واکنش مثبت نشان داده و برحسب میزان کلاژن از قهوه‌ای روشن تا تیره ظهور یافت.

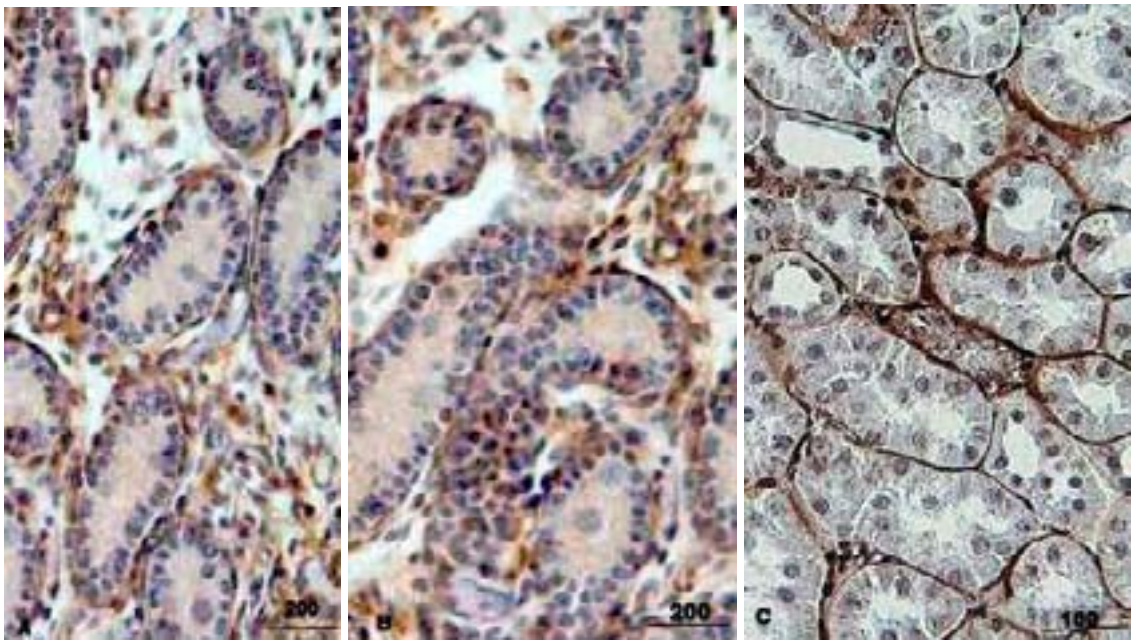
به اعتبار اینکه واکنش به رنگ‌پذیری کلاژن نوع IV که با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال شاخص مناسبی در تعیین تراکم این نوع کلاژن محسوب می‌شود، درجهٔ رنگ‌پذیری براساس روش درجه‌بندی Firth [۱۵] به عنوان معیار تراکم کلاژن مد نظر قرار گرفت. در خاتمه، نتایج مبتنی بر مطالعات میکروسکوپیک مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار Olympus از مناطق مورد نظر عکس‌های دیجیتال تهیه و فایل مربوط به آن ذخیره شد. پس از مطالعه عکس‌ها در نواحی کلافه های گلومرولی و ارزیابی غشای پایه در این نواحی شدت رنگ‌پذیری با روشی که توضیح داده شد به‌صورت دو نفره و جدای از یکدیگر درجه‌بندی شد.

یافته‌ها

بررسی‌های به‌عمل آمده نشان داد که در روز سیزدهم جنینی، سلول‌های مزانشیمی سازنده کلیه اطراف جوانه حالب ساز را گرفته و شکل ساده‌ای از توبول‌های اولیه با رنگ زمینه مشخص شده است اما از کلاژن غشای پایه مربوط به آن‌ها براساس واکنش آنتی‌کلاژن اثری دیده نمی‌شود (شکل ۱A). در روز چهاردهم جنینی اولین واکنش‌ها در کلاژن غشای پایه بخش دیستال توبول‌های کلیوی و مقاطع عروقی پارانشیم کلیه بروز نموده اما هنوز از واکنش کلاژن در غشای پایه کلافه های گلومرولی اثری دیده نمی‌شود (شکل 1B). در روز پانزدهم جنینی شدت واکنش‌ها افزایش یافته و علاوه بر غشای پایه نواحی دیستال، واکنش‌های ضعیفی در غشای پایه نواحی پروگزیمال توبول‌ها و همچنین نواحی قشری گلومرول‌ها به‌صورت پراکنده بروز نمود و علائم ظهور کلاژن در این نواحی به مقدار اندک به ثبت رسید (شکل 1C). در روز شانزدهم بر مقدار این واکنش‌ها افزوده شد به‌طوری‌که غشای پایه بخش‌های مختلف توبول‌ها با رنگ‌پذیری کلاژن متمایز شد (شکل ۲A). مطالعات مربوط به روزهای بعد نیز نشان داد که بر شدت واکنش‌ها تا روز هجدهم افزوده شده و رنگ‌پذیری غشای پایه سلول‌های اپیتلیالی نه تنها نسبت به روزهای قبل افزایش یافته بلکه در اپیتلیوم عروقی داخل کلافه‌ها نیز این افزایش به‌خوبی ظهور پیدا نموده است (شکل ۲B). بررسی‌های مربوط به دوران پس از تولد نشان می‌دهد که واکنش غشای پایه توبول‌ها تا روز پنجم نسبت به دوران جنینی شدت بیشتری یافته (شکل ۲C) اما در روزهای بعد از آن از نظر شدت واکنش کلاژن نوع IV در غشای پایه توبولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.



شکل ۱. نماهای A، B و C به‌ترتیب مقاطعی از توبول‌های کلیوی را در روزهای سیزدهم تا پانزدهم جنینی نشان می‌دهد. در شکل A هیچ‌گونه واکنشی نسبت به رنگ‌پذیری کلاژن دیده نمی‌شود (در این تصویر پیکان‌های دوشاخه بخش‌های دیستال توبول‌های کلیوی را نشان می‌دهد و پیکان‌های دنباله‌دار به لوله‌های جمع کننده اشاره دارد). در شکل B اولین واکنش‌های غشای پایه بخش‌های دیستال توبول‌های کلیوی (پیکان‌های دوشاخه) و به‌صورت شدیدتر در مقاطع عروقی (پیکان‌های دنباله‌دار) در روز چهاردهم به چشم می‌خورد. در شکل C واکنش به‌صورت همگن درآمده و علاوه بر مناطق غشای پایه این رنگ‌پذیری در ماده خارج سلولی نیز قابل ردیابی است.



شکل ۲. نماهای A، B و C به‌ترتیب مقاطعی از توبول‌های کلیوی را در روزهای شانزدهم و هجدهم جنینی و روز پنجم پس از تولد نشان می دهد. همان‌گونه که در تصاویر A و B نشان داده شده است، به موازات تکامل توبول‌های کلیوی بر واکنش غشای پایه نیز افزوده شده و در شکل C این واکنش از قهوه‌ای روشن به قهوه‌ای تیره تغییر یافته و به بالاترین حد خود رسیده است.

بحث

پیدایش کلاژن نوع IV در زمان شکل‌گیری توبول‌های کلیوی و افزایش تراکم آن در غشای پایه تا مراحل نهایی تکامل توبول‌ها بیانگر این موضوع است که آرایش سلولی مربوط به این بخش از ساختار کلیه در گروی بیان مولکول‌های خاصی است که کلاژن نوع IV در این میان از اهمیت به‌سزایی برخوردار است [۱۴-۱۱]. غشای پایه نواحی تخصص یافته‌ای از مادهٔ خارج سلولی (Extra cellular matrix) است که حاوی ترکیبات مختلفی از قبیل پروتئین‌ها و قندها هستند. این ماده معمولاً از ترکیباتی از قبیل انواع رشته‌های کلاژن شامل کلاژن نوع IV، V، لامینین، فیبرونکتین و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته و غیرسولفاته تشکیل می‌شود [۱۷-۱۵]. ر بین ترکیبات غشای پایه، کلاژن جزء فراوان‌ترین ترکیبات موجود است و از این میان کلاژن نوع IV ساختار اصلی این بخش را ایجاد می‌نماید.

تغییر در ساختار ماتریکس خارج سلولی به سهم خود به میانکنش‌هایی می‌انجامد که در وهلهٔ اول به سنتز پروتئوگلیکان‌هایی منجر می‌شود که زمینهٔ تولید انواع کلاژن را فراهم می‌آورد [۱۸و۱۹]. براساس مطالعات انجام شده، هر چند که انواع کلاژن در نقاط مختلف بدن دارای پراکندگی وسیعی هستند اما کلاژن نوع IV را فقط می‌توان در نواحی خاصی از قبیل غشای پایهٔ مربوط به جدار عروق، لولهٔ گوارش، توبول‌های کلیوی و بافت مزانژیال کلافه‌های گلومرولی جستجو کرد [۲۰]. از سوی دیگر اگرچه تفکیک و تمایز کلاژن نوع IV از بقیهٔ اجزای غشای پایه در مطالعات معمول بافت‌شناسی وجود ندارد اما با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی که در این پژوهش صورت گرفت، واکنش کلاژن نسبت به رنگ‌پذیری در غشای پایه توبول‌های کلیوی از زمانی آغاز می‌شود که ساختار نفرون‌ها شکل می‌گیرد. این موضوع تأیید کننده این واقعیت است که میانکنش‌های سلولی تشکیل‌دهنده ساختار توبولی در کلیه به القای سلول‌ها در راستای سنتز کلاژن کمک می‌نماید تا بستر مناسبی برای غشای پایه اپیتلیالی در آن‌ها پدیدار شود [۲۱]. ظهور کلاژن نوع IV در غشای پایه بخش دیستال و سپس در بخش پروگزیمال و کلافه‌های گلومرولی بر این موضوع نیز دلالت دارد که این نوع پروتئین خاص علاوه بر آنکه نقش داربست ساختمان غشای پایه توبول‌ها را بر عهده می‌گیرد، وظایف دیگری نیز بر عهده خواهد گرفت. در این رابطه می‌توان به تکامل توبول‌های کلیوی و عملکرد آنها در امر فیلتراسیون گلومرولی اشاره کرد که غشای پایهٔ توبول‌ها و کلافه‌های گلومرولی نقش مهمی در تبادل مواد بازی می‌کنند و این امر در گروی ساختار خاص غشای پایه است [۲۲]. حضور الیاف کلاژن به عنوان اصلی‌ترین شبکه ساختاری بخش میانی غشای پایه که تحت عنوان تیغه متراکم (Lamina densa) نامیده می‌شود سبب می‌شود که عملکرد کلیه در فیلتراسیون و تبادل مواد بین توبول‌ها و مویرگ‌های مجاور، تضمین شود [۲۳]. سلامت غشای پایه و شکل‌پذیری طبیعی آن به نفرون‌ها این اجازه را خواهد داد که در جذب انتخابی مولکول‌ها مانند یک صافی دقیق عمل نمایند [۲۴]. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که چنانچه کلاژن نوع IV به‌عنوان یکی از مهمترین عناصر ساختاری غشای پایه توبول‌های کلیوی دستخوش تغییر شود، نقص عمده‌ای در ساختان و عمل کلیه‌ها پدیدار خواهد شد که می‌تواند سلامت موجود زنده را به‌صورت جدی تهدید نماید. این تصور از آنجا ناشی می‌شود که در بعضی از بیماری‌ها تغییرات کلاژن به ضخیم شدن غشای پایه انجامیده و به کلیه‌ها آسیب جدی وارد می‌شود [۲۵و۲۶]. موضوع دیگر اینکه با شکل‌گیری و تکامل نهایی توبول‌ها میزان کلاژن غشای پایه موجود در آنها نیز باید در یک حد اپتیموم محدود شود و از آن تجاوز نکند. بررسی های مربوط به این پژوهش نشان داد که از روز پنجم پس از تولد تغییری در تراکم کلاژن

غشای پایه پدید نمی‌آید. این موضوع شاید به این معنی است که تراکم بیش از حد کلاژن می‌تواند به ضخیم شدن غشاء و کاهش عملکرد توبول‌ها و در نتیجه به کم‌کاری کلیه‌ها منجر شود [۲۷]. به‌عنوان مثال تغییرات بافتی مربوط به افزایش سن یا پدید آمدن محیط هایپرگلیسمیک در بیماری دیابت که به واکنش غشای پایه و افزایش ضخامت آن می‌انجامد به اعتبار افزایش تراکم کلاژن نوع IV و سایر عناصر غشای پایه عملکرد کلیه را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۸]. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که آرایش اپیتلیوم سازنده توبول‌های کلیوی در مرحله اول و عملکرد صحیح نفرون‌ها در وهله دوم در گروی شکل‌گیری بستر مناسبی است که در ارتباط با پیدایش غشای پایه آنها سنتز شده‌اند.

در این میان کلاژن نوع IV به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ساختارهای غشای پایه تحت تاثیر مکانیسم‌های القایی شروع به سنتز نموده و در محدوده ساختمان‌های پیش‌ساز توبول‌های اولیه ذخیره می‌شود. اولین علائم ظهور کلاژن غشای پایه توبولی در روز چهاردهم جنینی و افزایش آن در خلال روزهای پس از آن بر این موضوع دلالت دارد که شکل‌گیری و روند تکامل ساختمان و عمل توبول‌ها منوط به شکل‌گیری بستر مناسبی است که اجزای سازنده غشای پایه و از جمله کلاژن نوع IV تضمین کننده آن است. براساس این واقعیت شاید بتوان گفت زمانی که پس از تولد، نفرون‌ها به تکامل نهایی خود رسید تراکم کلاژن نوع IV که طی روند شکل‌گیری گلومرول‌های کلیوی بسیار حائز اهمیت است، از این مرحله به بعد ثابت باقی می‌ماند و در روزهای بعد تغییری نمی کند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب یک طرح پژوهشی بین دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی زابل صورت گرفته و هزینه‌های آن توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل تأمین شده است. بنابراین بدینوسیله از مساعدت‌های به‌عمل آمده در این زمینه از هر دو معاونت این دانشگاه‌ها تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از خدمات تکنیکی سرکارخانم متجدد در آزمایشگاه هیستوتکنیک دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می‌شود.

References

1. **Bergijk EC, Van Alderwegen IE, Baelde HJ, de Heer E, Funabiki K, Miyai H, et al**. Differential expression of collagen IV isoforms in experimental glomerulosclerosis. J Pathol 1998; 184(3): 307-15.
2. **Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, et al**. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. Developmen 2004; 131: 1619-28.
3. **Lauer-Fields JL, Minond D, Brew K, Fields GB**. Application of topologically constrained mini-proteins as ligands, substrates, and inhibitors. Method Mol Biol 2007; 386: 125-66.
4. **Hasegawa H, Naito I, Nakano K, Momota R, Nishida K, Taguchi T, et al**. The distributions of type IV collagen alpha chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. Arch Histol Cytol 2007; 70(4): 255-65.
5. **Sund M, Maeshima Y, Kalluri R**. Bifunctional promoter of type IV collagen COL4A5 and COL4A6 genes regulates the expression of alpha5 and alpha6 chains in a distinct cell-specific fashion.Biochem J 2005; 387(3): 755-61.
6. **Bernstein J, Cheng F, Roszka J**. Glomerular differentiation in metanephric culture. Lab Invest 1981; 45(2): 183-90.

7. **Hill MA**. Mouse development stages. UNSW embryology. 2008; ISBN: 978-0-7334-2609-4.
8. **Masayo Y, Akihito, Toshimi M, Masahiro N, Keiichi O**. Hydroxylases Involved in Vitamin D Metabolism Are Differentially Expressed in Murine Embryonic Kidney: Application of Whole Mount in Situ Hybridization. Endocrinology 2001; 142(7): 3223-30.
9. **Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, Yoshida K, Erdjument-Bromage H,et al**. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. 1999; Cell 99: 377–86.
10. **Favor J, Gloeckner CJ, Janik D, Klempt M, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, et al**. Type IV Procollagen Missense Mutations Associated With Defects of the Eye, Vascular Stability, the Brain, Kidney Function and Embryonic or Postnatal Viability in the Mouse, Mus musculus: An Extension of the Col4a1 Allelic Series and the Identification of the First Two Col4a2 Mutant Alleles. Genetics 2007; 175(2): 725–36.
11. **LinksGubler MC**.Inherited diseases of the glomerular basement membrane. Nat Clin Pract Nephrol 2008, 4(1): 24-37.
12. **LinksBerkholtz CB, Lai BE, Woodruff TK, Shea LD**. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. Histochem Cell Biol 2006; 126(5): 583-92.
13. **Links Wu ZZ, Li P, Huang QP, Qin J, Xiao GH, Cai SX**. Inhibition of adhesion of hepatocellular carcinoma cells to basement membrane components by receptor competition with RGD- or YIGSR-containing synthetic peptides. Biorheology 2003, 40(4): 489-502.
14. **LinksGuinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M**. "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin.Biol Chem Hoppe Seyler 1993; 374(12): 1135-46.
15. **LinksDavid L, Nesland JM, Holm R, Sobrinho-Simões M**. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. Cancer 1994; 73(3): 518-27.
16. **LinksDe Rosa G, Barra E, Guarino M, Staibano S, Donofrio V, Boscaino A**. Fibronectin, laminin, type IV collagen distribution, and myofibroblastic stromal reaction in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma. Am J Dermatopathol 1994;16(3): 258-67.
17. **Nakano K, Naito I, Momota R, Sado Y, Hasegawa H, Ninomiya Y, et al**. The distribution of type IV collagen alpha chains in the mouse ovary and its correlation with follicular development. Arch Histol Cytol 2007; 70(4): 243-53.
18. **Merjava S, Liskova P, Jirsova K**. Immunohistochemical characterization of collagen IV in control corneas and in corneas obtained from patients suffering from posterior polymorphous corneal dystrophy. Oftalmology 2008; 64(3): 115-19.
19. Sato H, Naito I, Momota R, Naomoto Y, Yamatsuji T, Sado Y, et al. The differential distribution of type IV collagen alpha chains in the subepithelial basement membrane of the human alimentary canal. Arch Histol Cytol. 2007; 70(5): 313-23.
20. **Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV**. Microsc Res Tech 2008; 71(5): 357-70.
21. **Hartman HA, Lai HL, Patterson LT**. Cessation of renal morphogenesis in mice. Dev Biol 2007; 310(2): 379-87.
22. **LinksCarone FA, Butkowski RJ, Nakamura S, Polenakovic M, Kanwar YS**. Tubular basement membrane changes during induction and regression of drug-induced polycystic kidney disease. Kidney Int 1994; 46(5): 1368-74.
23. **Monaghan P , Warburton MJ, N Perusinghe, Rudland PS.** Topographical rrangement of

basement membrane proteins in lactating rat mammary gland: comparison of the distribution of type IV collagen, laminin, fibronectin, and Thy-1 at the ultrastructural level. PNAS. 1983; 80 (11): 3344 - 8.

24. **LinksSasaki H, Kishiye T, Fujioka A, Shinoda K, Nagano M**. Effects of extracellular matrix macromolecules on the differentiation of plasma membrane structure in cultured astrocytes. Cell Struct Funct 1996, 21(2): 133-41.
25. **Miner JH, Sanes JR**.Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome.J Cell Biol 1996; 135(5): 1403-13.
26. **Carlson EC, Audette JL, Veitenheimer NJ, Risan JA, laturnus DI, Epstein PN**: Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. Anat Rec 2003; 271(2): 332-41.
27. **Schäfer K, Bader M, Gretz N, Oberbäumer I, Bachmann S**. Focal overexpression of collagen IV characterizes the initiation of epithelial changes in polycystic kidney disease. Exp Nephrol 1994, 2(3): 190-5.
28. **Abrass CK, Spicer D, Raugi GJ**. Induction of nodular sclerosis by insulin in rat mesangial cells in vitro: studies of collagen.Kidney Int 1995, 47(1): 25-37.
29. **Zent R, Yan X, Su Y, Hudson BG, Borza DB, Moeckel GW, et al**.Glomerular injury is exacerbated in diabetic integrin alpha1-null mice. Kidney Int 2006, 70(3): 460-70.
30. **Nicoloff G, Baydanoff S, Petrova Ch, Christova P**. Serum antibodies to collagen type IV and development of diabetic vascular complications in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. A longitudinal study.Vascul Pharmacol 2002, 38(3):143-7.