Original Article

Maternal Nexposure on Collagen Type IV Pulmonary Changes in Mouse Offspring's

Jalali M., Ph.D., Nikravesh M.R. *, Ph.D., Moeen A.A., Ph.D., Mohammadi Sh., M.Sc., Karimfar M.H.,M.Sc.

** Anatomy and Cell Biology Department, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

Abstract

Purpose: In this study we evaluated the effect of maternal nicotine administration during pre and postnatal period on collagen IV changes in lung of mouse newborns.

Materials and Methods: Female Balb/C mice were mated and finding vaginal plug was assumed as day zero of pregnancy. Pregnant mice, were divided into 2 experimental and 2 control groups. Experimental group 1, received 3 mg/kg nicotine intrapritoneally from day 5 of gestation to last day of pregnancy. Experimental group 2 received the same amount of nicotine during the same gestational days as well as the first two week after birth (lactation). The control groups received the same volume of normal saline during the same periods. At the end of exposure time, all of newborns (experimental and control) were anesthetized and their lungs were removed and immunohistochemical study for tracing collagen were carried out.

Results: Our finding indicated that collagen reaction in the bronchial basement membrane (BBM) and extra cellular matrix (ECM) of lung parenchyma in experimental increased significantly in comparison to control groups. Cell necrosis definition in lung parenchyma of experimental group 2 were the other finding that our investigation achieved.

Conclusion: These data indicate that maternal nicotine exposure may induce a noticeable increasing collagen reasonable in BBM and ECM of respiratory system of next generation. The lungs of these animals which were exposed to nicotine via the placenta and mother's milk, are more susceptible to damages such as abnormal collagen synthesis and cell necrosis.

Key words: Respiratory system, Nicotine, Collagen IV, Mouse.

مقاله تحقیقی

مطالعه اثر تجویز نیکوتین مادری بر تغییر ات کلاژن نوع IV ریوی نوزادان در موش

مهدی جلالی .Ph.D *، محمد رضا نیکروش .Ph.D *، عباسعلی معین .Ph.D **، شبنم محمدی .M.Sc *، محمد حسن کریمفر .Ph.D **

* گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

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

تاریخ وصول: تیرماه ۸۹، تاریخ پذیرش: مهرماه ۸۹

چکیده

هدف: مطالعه و ارزیابی اثر تجویز نیکوتین مادری بر تغییرات کلاژن ریه نوزادان موش

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۲٤ موش ماده نژاد balb/c استفاده شد که با تعیین روز صفر بارداری به دو گروه تجربی و دو گروه کنترل تقسیم شدند. به گروه تجربی ۱ از روز پنجم تا پایان دوره بارداری روزانه ۳mg/ kg نیکوتین به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد و در گروه تجربی ۲ این عمل تا دوهفته پس از زایمان ادامه یافت. گروه‌های کنترل نیز حجم مشابهی از نرمال سالین در زمان‌های مشابه دریافت نمودند. در پایان دوره همه نوزادان تجربی و کنترل پس از بیهوشی عمیق قطع نخاع شده و ریه‌های آنان به منظور مطالعات ایمونوهیستوشیمی تثبیت و آماده‌سازی شد.

یافته‌ها: یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که واکنش کلاژن در غشای پایه برونشیال و ماده خارج سلولی پارانشیم ریوی نوزادان گروه‌های تجربی نسبت به کنترل به شکل معنی‌داری افزایش یافته است. علاوه بر این در سلول‌های پارانشیم ریوی گروه تجربی ۲ نشانه‌های بارزی از مرگ سلولی دیده شد که در سایر گروه‌ها مشهود نبود.

نتیجه‌گیری: شواهد حاصل از این مطالعه بر این موضوع دلالت دارد که چنانچه مادران باردار در معرض نیکوتین مستمر قرار گیرند افزایش کلاژن غیر قابل انکاری در غشای پایه آلوئلی و ماده خارج سلولی ریوی فرزندان آنها پدید می‌آید. سیستم تنفسی اینگونه موجودات که نیکوتین را از طریق جفت و علاوه بر این از طریق شیر مادر نیز دریافت کرده‌اند به نوعی مستعد آسیب‌های ریوی می‌شود که به سنتز غیر متعارف کلاژن و حتی مرگ سلولی در پارانشیم ریوی آنان منجر می‌شود.

کلید واژه‌ها: سیستم تنفسی، نیکوتین، کلاژن نوع IV، موش

مقدمه

در مقایسه با سایر سیستم‌های بدن، تکامل ریه به دلیل اینکه به یک دستگاه تبادل گاز تبدیل می‌شود، اهمیت دارد. ریه باید **طی دوران قبل از تولد** تکامل یابد و بلافاصله در زمان تولد آماده فعالیت باشد اما مراحل نهایی تکامل آن در موش همانند سایر پستانداران پس از تولد به انجام می‌رسد. تکامل ریه طی دوران جنینی به چندین مرحله تقسیم می‌شود. روند طبیعی تکامل و گذر از این مراحل به خاطر اینکه ریه در آینده عضو تبادل گازهای تنفسی است، اهمیت فراوان دارد. اختلال در این مراحل بر بلوغ و نیز مقاومت ریه در برابر بیماری‌ها در زندگی آینده می‌تواند تأثیر بگذارد [٤-١]. در این دستگاه نیز مثل بسیاری از ارگان‌های دیگر، سلول‌های مزانشیمی به‌وسیله فاکتورهای رشد و تمایز (که توسط

آدرس مکاتبه: ایران، مشهد، میدان آزادی، دانشکده پزشکی، علوم تشریحی و بیولوژی سلولی
Email: Nikravesh@hotmail.com

هورمون‌ها تنظیم می‌شوند) باعث جهت دهی به اسکلت سلولی و رشد بافت می‌شود [۵]. در این راستا بعضی از محققین، رابطه مستقیمی بین غشای آلوئلی (Blood-Gas Barrier) و کشش مکانیکی ایجاد شده توسط حرکات تنفسی جنین یافتند [٦]. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد که کشش مکانیکی از تکثیر فیبروبلاست‌ها جلوگیری می‌کند و (زمانی که به‌طور طبیعی ضخامت مزانشیم کاهش یافت) باعث تحریک آپوپتوز در مرحله کانالیکولار ریوی می‌شود [٦]. این موضوع نشان می‌دهد که به طور طبیعی آپوپتوز در زمان تکامل سیستم تنفسی نیز اتفاق می‌افتد و چنانچه عاملی بر این روند تأثیر بگذارد به نقایص تکاملی ریه‌ها خواهد انجامید. از سوی دیگر ماتریکس خارج سلولی جزء مهمی از پارانشیم ریه است که در تکامل داربست بافت همبند ریه و حفظ ساختار و عملکرد آن اهمیت فوق العاده‌ای دارد [۷]. بنابراین هر گونه تغییر در ماده خارج سلولی یا غشای پایه سلول‌های ریوی ممکن است حتی بر تمایز سلولی آن نیز اثر بگذارد [۱۰-۸]. ماتریکس خارج سلولی به‌طور عمده از رشته‌های کلاژن، الاستیک، رشته‌های رتیکولر، گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکوز آمینوگلیکان‌ها تشکیل شده است که در این میان الیاف کلاژن و به‌ویژه کلاژن نوع IV نقش تعیین کننده‌ای در ساختمان آن ایفا می‌نماید. بنابراین با توجه اینکه نیکوتین طی دوران جنینی با عبور از سد جفتی و پس از تولد از طریق شیر مادر به جنین‌ها و نوزادان منتقل شده و بر بافت همبند تأثیر مخرب می‌گذارد، ضروری به نظر می‌رسد که نتیجه این تأثیر گذاری بر ریه نوزادان از طریق تغییرات عناصر تشکیل دهنده بافت همبندی آن از جمله کلاژن نوع IV ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

تجویز نیکوتین و تهیه بافت

در این مطالعه از ٢٤ موش balb/c استفاده شد که پس از جفت‌گیری و تعیین روز صفر بارداری به ۲ گروه تجربی و ۲ گروه کنترل تقسیم شدند. شرایط نگهداری حیوانات دمای ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نور و تاریکی ۱۲ ساعت با آب و غذای کافی در نظر گرفته شد. به گروه تجربی ۱ از روز پنجم تا پایان دوره بارداری روزانه ۳ mg/kg نیکوتین محلول در نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد [۱۱] و در گروه تجربی ۲ این عمل تا دوهفته پس از زایمان ادامه یافت. گروه‌های کنترل نیز حجم مشابهی از نرمال سالین در زمان‌های مشابه دریافت نمودند. در پایان دوره همه نوزادان تجربی و کنترل پس از بیهوشی عمیق قطع نخاع شده و ریه‌های آنان به مدت ٢٤ ساعت در فرمالدهید ۱۰ درصد تثبیت شد و به منظور مطالعات ایمونوهیستوشیمی مورد آماده‌سازی بافتی قرار گرفت.

روش‌های ایمونوهیستوشیمی

روش به کار رفته در این تحقیق تکنیک آویدین- بیوتین پراکسیداز بود. برش هایی که از ریه نوزادن به‌دست آمده بود به میزان دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در PBS (حاوی ۱/۵ درصد کلرور سدیم در pH =٧/٤) شستشو داده شد. برای بلوک کردن آنتی ژن‌های غیر اختصاصی، ابتدا برای مدت ۳ ساعت، برش‌ها در مجاورت تریتون ۰/۳ درصد X100 در PBS 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 در ادامه با آنتی بادی کلاژن IV (کانژوگه شده با Horse radish peroxidase) با رقت ۱ به ۵۰ به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شد و سپس مجدداً در محلول PBS 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- آمینو بنزیدین (Di-aminobenzidine) حاوی ۰/۰۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شد و در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها برای ایجاد رنگ زمینه از هماتوکسیلین استفاده شد. برش‌ها با ژل گلیسرول تثبیت شد و با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

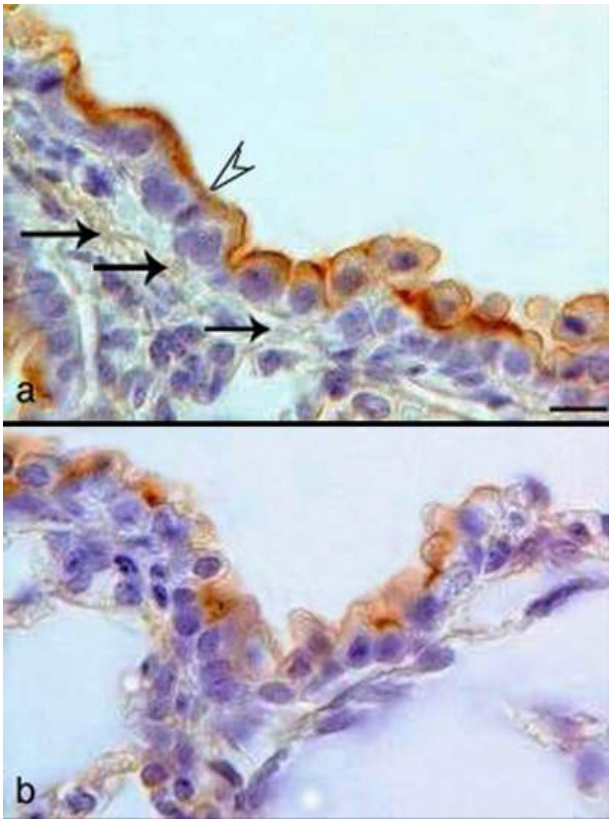
به اعتبار اینکه واکنش به رنگ‌پذیری کلاژن نوعIV که با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال صورت می‌گیرد شاخص مناسبی در تعیین تراکم این نوع کلاژن محسوب می‌شود، درجه رنگ‌پذیری بر اساس روش درجه‌بندی فرت (Firth) و همکاران [۱۲] به‌عنوان معیار تغییرات کلاژن مد نظر قرار گرفت. در این روش واکنش بافت به آنتی‌بادی به‌کار رفته از صفر تا ٤ (واکنش منفی، خفیف، ملایم و شدید) به‌صورت دونفره و جدای از یکدیگر درجه‌بندی می‌شود و از حالت کیفی به کمی تبدیل می‌شود. در پایان نتایج مبتنی بر مطالعات میکروسکوپیک ارزیابی شد و با استفاده از میکروسکوپ دوربین دارOlympus. B57 از مناطق مورد نظر اقدام به تهیه عکس‌های دیجیتال شده و فایل مربوط به آن ذخیره شد. پس از مطالعه عکس‌ها ارزشیابی کلاژن در نواحی غشای پایه آلوئولی و پارانشیم ریوی، بر اساس شدت واکنش، به‌صورت دو نفره و جدای از یکدیگر درجه‌بندی شد.

آنالیز آماری

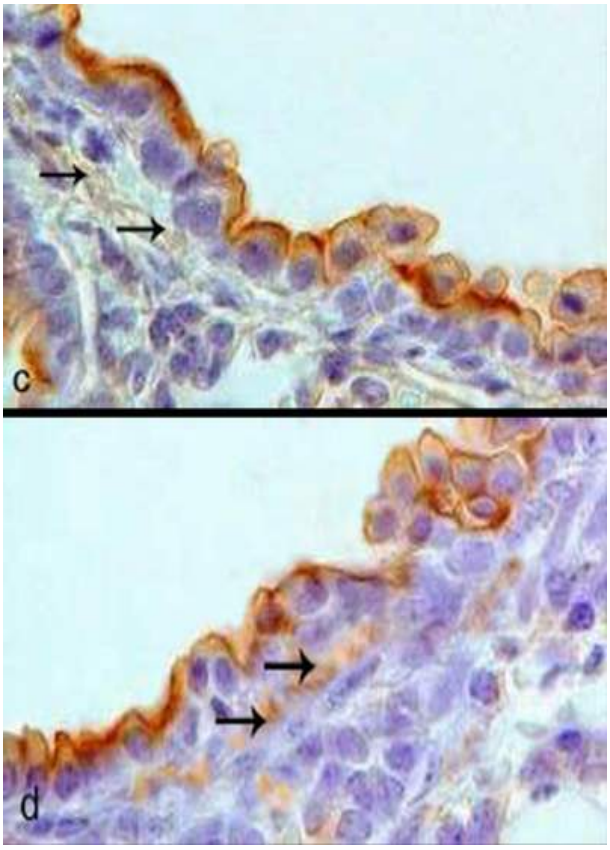
داده‌ها با استفاده از نرم افزارSPSS نسخه و آزمون کروسکال والیس و من- ویتنی تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داربودن برای یافته‌های این مطالعه P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

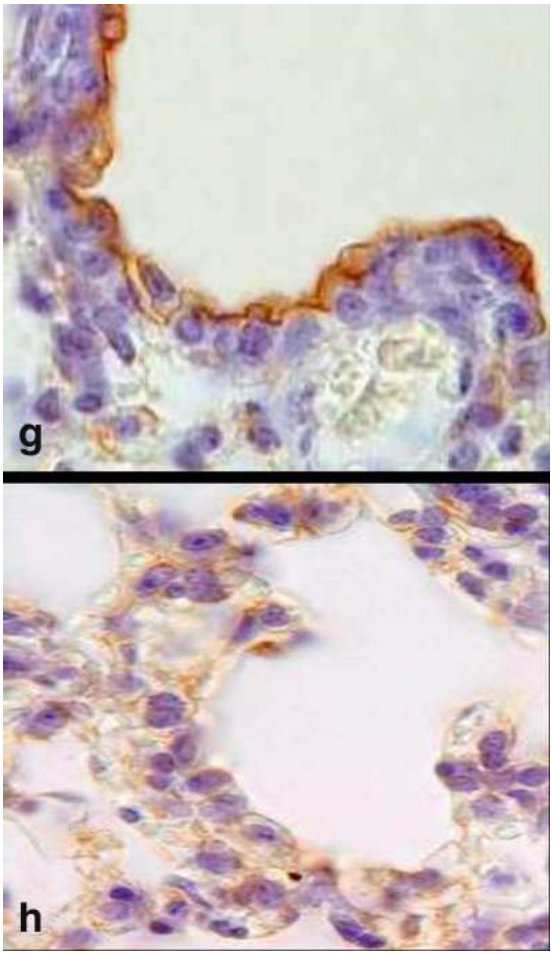
ردیابی کلاژن در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان داد که غشای سلولی اپیتلیوم مجاری تنفسی در همه نمونه‌ها تقریبا واکنش مشابهی نشان داده است (شکل‌های ۳-۱). علاوه بر این؛ واکنش ملایمی در غشای پایه اپیتلیوم آلوئل‌های ریوی مربوط به گروه تجربی ۱ (شکل ۱a) دیده شد که چنین عکس العملی در گروه کنترل مشابه (تشکل ۱b) وجود ندارد. غشای پایه اپیتلیوم تنفسی گروه تجربی ۲ (شکل ۲d) به شکل چشمگیری واکنش نشان داد که این عکس العمل اگر چه در گروه کنترل مشابه (شکل ۲c) نیز دیده شد اما بسیار ضعیف‌تر از نمونه‌های تجربی بود. چنین تغییری در غشای پایه گروه کنترل مثبت نیز به شکل خفیف ارزیابی شد (شکل ٤g). تغییرات غشای پایه آندوتلیوم عروقی گروه‌های تجربی نیز در مقایسه با گروه‌های کنترل به شکل معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵) اما در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به همدیگر تغییر چشمگیری ملاحظه نشد (شکل ٤). در ارزیابی ماده خارج سلولی گروه‌های تجربی، بیان کلاژن به رنگ طلایی روشن دیده شد (شکل‌های 3e و 3f). که نسبت به همدیگر معنی‌دار نبود. این رنگ‌پذیری اگرچه در خصوص سایر گروه‌ها با این شدت دیده نشد اما در نمونه‌های کنترل مثبت (شکل ٤h) تقریبا معادل با گروه‌های تجربی واکنش نشان داد.



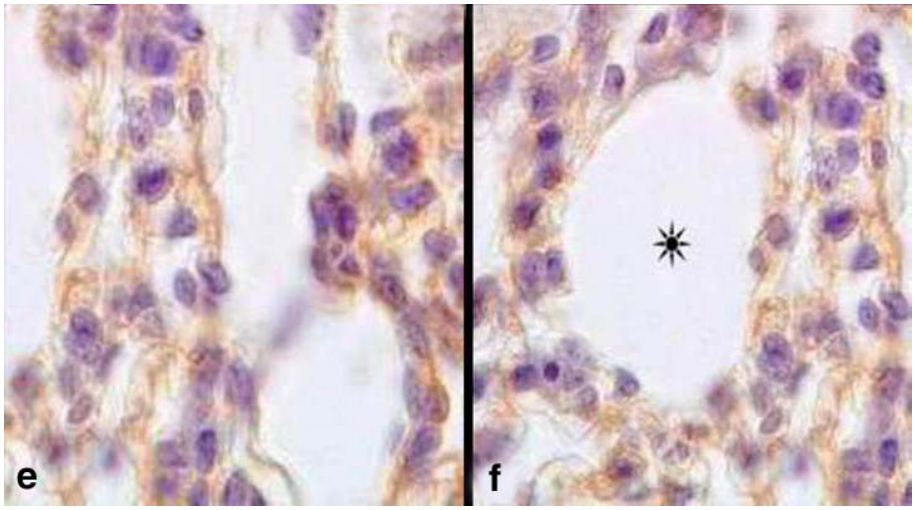
شکل ۱. مقاطع مربوط به اپیتلیوم برونشیال نوزادان ١٤ روزه موش در گروه تجربی ۱ (a)، کنترل۱ (b)، که در نمونه تجربی غشای سلولی اپیتلیوم مجاری تنفسی (پیکان دو شاخه) به خوبی واکنش نشان داده و این واکنش در غشای پایه سلولی به رنگ قهوه‌ای روشن (پیکان‌های نشانه قابل مشاهدا است. این واکنش در غشای سلولی اپیتلیوم کنترل نیز با شدت کمتری دیده می‌شود اما در غشای پایه وجود ندارد (رنگ آمیزی زمینه: هماتوکسیلین، بار: ۱۰۰ میکرومتر).



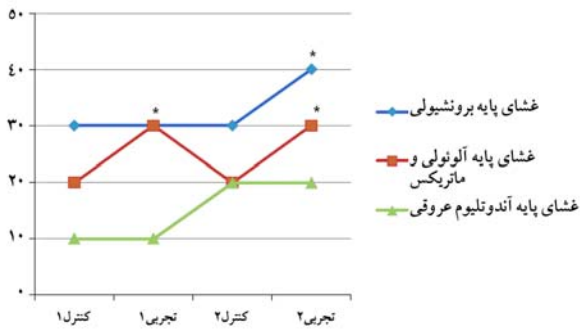
شکل ۲. مقاطع مربوط به اپیتلیوم برونشیال نوزادان ۱٤ روزه موش در گروه کنترل ۲ (c)، و تجربی ۲ (d)، که در نمونه تجربی واکنش غشای پایه اپیتلیوم تنفسی (پیکان‌های نشانه) شدت یافته است. این واکنش اگرچه در نمونه کنترل نیز دیده می‌شود اما مقدار آن اندک است. علاوه بر این واکنش ماتریکس خارج سلولی نمونه تجربی نسبت به کنترل افزایش یافته است.



شکل ٤. مقاطع مربوط به نمونه‌های کنترل مثبت یک مورد از اپیتلیوم تنفسی (g) و پارانشیم ریوی (h) که در نمونه اول غشای سلول‌های اپیتلیال و در نمونه دوم ماتریکس خارج سلولی دارای واکنش مثبت است.



شکل ۳. مقاطع مربوط به پارانشیم ریوی یک نمونه تجربی ۱ (e) و تجربی ۲ (f) که ماتریکس خارج سلولی در هر دو مورد نسبت به آنتی‌کلاژن نوع IV واکنش نشان داده است. در تصویر f علامت ستاره مقطع کامل یک آلوئول ریوی را نشان می‌دهد).



شکل ۵. شمارش در هر یک از گروه‌ها ۱۰۰ مورد و با بزرگنمایی ۲۰ انجام شده و شدت واکنش کلاژن از خفیف تا شدید در چهار رتبه و با علامت + نشان داده شده است. عدم واکنش کلاژن (-)، ضعیف (+)، ملایم (++)، شدید (+++) و بسیار شدید (++++) در نظر گرفته شده است. برای تبدیل اعداد کمی به کیفی به جای منفی عدد ۰، به جای+ عدد۱۰، به جای++ عدد ۲۰، به جای+++ ۳۰ و ۴۰ به جای++++ در نظر گرفته شد. * p=<۰/۰۵

بحث

بر اساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که ماده خارج سلولی و غشای پایه نقش مهمی در فرایند تکامل بافت‌ها بر عهده دارند. غشای پایه نواحی تخصص یافته‌ای از ماتریکس خارج سلولی است که حاوی مولکول‌ها و اجزای خاصی است و نقش‌های مختلفی از قبیل تنظیم تکامل، تکثیر، تعیین شکل و ایجاد بستری برای مهاجرت سلولی را بر عهده دارد. در بین ترکیبات غشای پایه، کلاژن نوع IV ساختار اصلی این بخش را تشکیل می‌دهد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که افزایش معنی‌داری در کلاژن غشای پایه آلوئول‌های ریوی نوزادان گروه‌های تجربی وجود دارد وچنین روند افزایشی در ماتریکس خارج سلولی پارانشیم ریوی این نوزادان نیز دیده می‌شود. از سوی دیگر؛ اگر چه سنتز کلاژن غشای پایه گروه‌های تجربی نسبت به همدیگر معنی‌دار نبود اما نسبت به گروه‌های کنترل تفاوت چشمگیری نشان داد. در عین حال کلاژن ماتریکس خارج سلولی در ریه نوزادان گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش بیشتری یافته و حتی شواهد انکار ناپذیری از نکروز بافتی و مرگ سلولی مشاهده شد. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که نوزادانی که از طریق جفت یا از طریق جفت و شیر مادر نیکوتین دریافت کرده‌اند به نوعی در معرض نقایص تکاملی ریه و بروز آسیب‌های ریوی هستند که تغییرات کلاژن نوع IV و نکروز بافتی از نشانه‌های بارز آن است. در مطالعات قبلی نیز نقش کلاژن نوع IV در ارتباط با شکل‌گیری و تکامل بسیاری از ارگان‌های جنینی مد نظر قرار گرفت. در این یافته‌ها نشان داده شد که بیان این پروتئین در تکامل شبکیه دارای نقشی کلیدی است [۱۳]. هچنین در ارتباط با تکامل عدسی نیز ساختار اپیتلیوم قدامی و ماتریکس عدسی به‌ویژه بخش حاشیه‌ای ساختمان آن به این مولکول وابستگی نشان داد [۱۲و۱۴] یافته‌های دیگر در این زمینه مشخص نمود که شکل‌گیری گلومرول‌ها [۱۵و۱۶] و پیدایش توبول‌های کلیوی به شکل غیر قابل انکاری در گروی کلاژن نوع IV است [۱۷و۱۸]. علاوه بر این؛ نقش آن در تکامل کوروئید مغزی نشان داد که این شبکه عروقی تغییر شکل یافته وابسته به وجود غشای پایه‌ای است که صرفنظر از سایر پروتئین‌هایی که در آن به‌کار گرفته شده، کلاژن نوع IV در ساختار آن نقشی تعیین‌کننده دارد [۱۹]. بنابراین طبیعی به نظر می‌رسد که غشاهای پایه اندوتلیالی و اپیتلیالی و همچنین ماده خارج سلولی بافت‌های مختلف از وجود این پروتئین به خوبی سود می‌برند و در این میان غشای پایه تنفسی و ماده خارج سلولی پارانشیم ریوی از این قاعده مستثنی نیست [۲۳-۲۰]. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که هر عاملی که بتواند بر روند تنظیم کلاژن نوع IV طی فرایند سیستم تنفسی یا حتی بعد از آن اثر بگذارد می‌تواند به نوعی سلامت این ارگان حیاتی را دچار مخاطره نماید. یافته‌های این مطالعه نشان داد که کلاژن ریوی نوزادانی که مادرانشان در معرض دریافت نیکوتین بوده‌اند تغییر می‌کند و بر ساختار غشای پایه و ماده بین سلولی سیستم تنفسی آنان تأثیر می‌گذارد. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که دریافت نیکوتین چه از طریق جفت و چه از طریق شیر مادر می‌تواند

بر روند طبیعی برونکوژنز و تمایز سلول‌های پارانشیمی ریه‌ها تأثیر بگذارد و منجر به افـزایش کـلاژن غـشای پایـه مجـاری تنفسی و ماتریکس خارج سلولی در آنان شود. اما از آنجا کـه در گروهی از نوزادان که علاوه بر دریافت نیکـوتین از طریـق جفت در دوران جنینی، از طریق شیر مادر نیز بعد از تولـد در معرض دریافت آن بوده‌اند، عوارض شـدیدتری مثـل نکـروز سلولی در پارانشیم ریوی قابـل مـشاهده اسـت. ایـن رخـداد ممکن است به این دلیل باشد که چون شیر مادر محتوی لیپید بالاست و نیز خاصیت اسیدی بیشتری از پلاسما دارد، نـسبت نیکوتینی که نوزادان از طریق شیر مادر دریافت نمـوده‌انـد دو تا سه برابر بیشتر از طریق خون مادری است [۲٤]. بـه اعتبـار اینکه سلامت نوموسیت‌ها به روند طبیعـی گلیکـولیز بـستگی دارد، هر گونه اختلالی که در این فرایند پدید آید می‌تواند بـر سلامت ریه‌ها تأثیر بگذارد [۲۵]. تحقیقات نشان داده است که در حیواناتی که در معرض نیکـوتین قـرار گرفتـه‌انـد، فراینـد گلیکولیز مهار می‌شود که این امر بـه کـاهش و از بـین رفـتن سـلول‌هـای نوموسـیت I و از سـوی دیگـر باعـث افـزایش نوموسیت‌های نوع II می‌شود [۲٦]. نتیجه این امر باعث به‌هـم خوردن مرگ برنامه‌ریزی شده سـلولی (programmed cell death) خواهـد شـد کـه هنـوز هـم بعـضی از جنبـه‌هـای آن به درستی مشخص نیست [۲۷]. در عین حال همـان‌طـور کـه اشاره شد تأثیر نیکوتین را بر فرایند گلیکولیز نباید از نظر دور داشت یا به عبارت دیگر می‌تـوان گفـت کـه نیکـوتین باعـث پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که این موضوع کاهش ظرفیـت آنتی‌اکسیدانی ریه را به دنبال دارد. در این‌صورت عدم تعـادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها باعث تغییر برنامه ژنـی و در نتیجـه کـاهش گلیکـولیز شـده و در نتیجـه بـه بیـان و سـنتز غیرطبیعی پروتئین‌هـایی مثـل کـلاژن نـوع IV منجـر شـود و ممکن است از این طریق زمینه تغییـرات هیـستوپاتولوژیک را در ریه‌ها فراهم نماید.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب یک طرح پژوهـشی بـین دانـشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانـشگاه علـوم پزشـکی زابـل صورت گرفته و هزینه‌های آن توسط معاونت محترم پژوهشی دانـشگاه زابـل تـأمین شـده اسـت. بنـابراین بدینوسـیله از مساعدت‌های به عمـل آمـده در ایـن زمینـه تقـدیر و تـشکر می‌گردد. همچنین از خدمات تکنیکی سـرکارخانم متجـدد در آزمایشگاه تخصصی بافت شناسـی دانـشکده پزشـکی مـشهد قدردانی می‌شود.

Refrences

1. **Sekhon HS, Proskocil BJ, Clark JA, Spindel ER.** Prenatal nicotine exposure increases connective tissue expression in foetal monkey pulmonary vessels. Eur Respir J 2004, 23: 906-15.
2. **Wasowicz M, Yokoyama S, Kashima K, Nakayama I.** The connective tissue compartment in the terminal region of the developing rat lung. An ultrastructural study. Acta Anat (Basel) 1996, 156:268–282
3. **Wasowicz M, Biczysko W, Marszalek A, Yokoyama S, Nakayama I.** Ultrastructural studies on selected elements of the extracellular matrix in the developing rat lung alveolus. Folia Histochem Cytobiol 1998, 36:3–13
4. **Rosenbloom J, Abrams WR.** Elastin and microfibrillar apparatus. Connective Tissue and Its Heritable Disorders. Molecular, Genetic, and Medical Aspects. Edited by Royce PM, Steinmann B. New York, Wiley-Liss Inc., 2002, pp 249–269
5. **Torday J.** Cellular timing of foetal lung development. Seminars in perinatology, 1992, 16(2): 130-139.
6. **Sanchez-Esteban J, Wang Y, Cicchielo LA and Rubin LP.** Pre and postnatal lung development,

maturation and plasticity. Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in foetal rat lung fibroblasts. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2002, .282:448-456.

7. **Shifren A and Mecham RP.** The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. Proc. Am. Thorac. Soc. 2006, 3(5): 428-433.
8. **Burgess JK, Ceresa C, Johnson SR, Kanabar V, Moir LM, Nguyen TT, Oliver BG, Schuliga M, Ward J.** Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function. Pulm Pharmacol Ther. 2009, 22(5):379-387.
9. **Hilfer, S. R. Morphogenesis of the lung.** control of embryonic and fetal branching. Annu. Rev. Physiol. 1996, 58:93–113.
10. **Goldin, G. V., and N. K. Wessells.** Mammalian lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis. J. Exp. Zool. 1979, 208:337–346.
11. **Hisa SH, Schulman SR, Meliones JN, Canada AT, Chen SC.** Effects of maternal nicotine exposure on branching morphogenesis of mouse fetal lung: in vivo and in vitro studies. Acta Paediatr Taiwan. 2003, 44(3):150-154.
12. **Firth NA, Reade PC.** The prognosis of oral mucosal squamous cell carcinomas: a comparison of clinical and histopathological grading and of laminin and type IV collagen staining. Aust Dent J. 1996, 41(2):83-86.
13. **Nikravesh Mohammad Reza, Jalali Mehdi, Moein Abbas Ali, Karimfar Mohammad Hassan, Mohammadi Shabnam, Rafighdoust Houshang**. The key role of type IV collagen in developing retinal basement membrane. Scientific Journal of Guilan University of Medical sciences, 2010, 18(72):62-67.
14. **Jalali Mehdi, Nikravesh Mohammad Reza, Moein Abbas Ali, Karimfar Mohammad Hassan, Mohammadi Shabnam, Rafighdoust Houshang**. Immunohistochemical study of retinal collagen type IV expression during lens development, Scientific Journal of Babol University of Medical Sciences, 2010, 11(6): 58-63.
15. **Karimfar Mohammad Hassan, Nikravesh Mohammad Reza, Jalali Mehdi, Moein Abbas Ali, Rafighdoust Houshang**. Immunohistochemical Study Collagen IV Changes in Glomerular Basement Membrane During Fetal and Postnatal Periods of Balb/c Mice . Iranian Journal of Anatomical Sciences, 2009, 6 (25, 26):559-567.
16. **Nikravesh Mohammad Reza, Jalali Mehdi, Karimfar Mohammad Hassan, Moein Abbas Ali, Saeedi Nejat Shahin, Mohammadi Shabnam, Rafighdoust Houshang.** The role of collagen IV in formation glumerolar and mesengial cells basement membrane. J. Cell. Mol. Res., 2009, 1(2): 90-95.
17. **Jalali Mehdi, Nikravesh Mohammad Reza, Moein Abbas Ali, Karimfar Mohammad Hassan, Saeedi Nejat Shahin, Mohammadi Shabnam, Rafighdoust Houshang**. Inductive role of type IV Collagen in nephrogenesis. Urology Journal of Iran, 2009, 6(4): 289-294.
18. **Moein Abbas Ali, Jalali Mehdi, Nikravesh Mohammad Reza, Karimfar Mohammad Hassan, Rafighdoust Houshang.** Study of Expression Type IV Collagen During Mouse Kidney Tubulogenesis in Balb/c Mice . Iranian Journal of Anatomical Sciences, 2008, 6 (24):471-479.
19. **Nikravesh Mohammad Reza, Jalali Mehdi, Moein Abbas Ali, Karimfar Mohammad Hassan, Mohammadi Shabnam, Rafighdoust Houshang**. Study of basement membrane type IV collagen appearance in the brain choroids plexus of mouse fetuses. Scientific journal of Hamadan university of medical sciences & health services,

2009, 16 (1): 5-9.

20. **West JB. Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier**. the unique avian solution. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009, 297(6): 1625-1634.
21. **Kang D, Nakayama T, Togashi M, Yamamoto M, Takahashi M, Kunugi S, Ishizaki M, Fukuda Y.** Two forms of diffuse alveolar damage in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. Hum Pathol. 2009, 40(11):1618-1627.
22. **Hinenoya N, Naito I, Momota R, Sado Y, Kumagishi K, Ninomiya Y, Ohtsuka A.** Type IV collagen alpha chains of the basement membrane in the rat bronchioalveolar transitional segment. Arch Histol Cytol. 2008, 71(3):185-194.
23. **Lan KP, Lai SC. Angiostrongylus cantonensis**. induction of urokinase-type PA and degradation of type IV collagen in rat lung granulomatous fibrosis. Exp Parasitol. 2008, 118(4):472-477.
24. **Gert SM.** Nicotine and Lung Development. Birth Defects Res. 2008, 84:45–53.
25. **Maritz GS.** Lung glycogen metabolism in suckling rats: a comparative study. Biol Neonate. 1988, 54:100–106.
26. **Maritz GS,** Thomas RA. Maternal nicotine exposure: reponse of type II pneumocytes of neonatal rat pups. Cell Biol Inter. 1995, 19 (4): 323-332.
27. **Johannes CS, Valentin D, Alan F, Peter HB.** Programmed cell death contributes to postnatal lung development. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998, 18: 786-793.