Original Article

Immunohistochmistry Study of Collagen IV Changes in Glomerular Basement Memebrane During Fetal and Postnatal Periods of Balb/c Mice

Karimfar M.H., Ph.D., Nikaravesh M.R., Ph.D. *, Moeen A.A., Ph.D., Jalali M., Ph.D., Rafighdoost H., Ph.D.

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

Abstract

Purpose: In this investigation specific antibody type IV collagen has been used in light microscopy to study development of BMG of the embryonic and postnatal mouse glomerular mesangium.

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 scarified 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: This study indicated that Collagen IV showed weak reaction on day 15 of gestation. The amount of collagen increased continuously until next days of fetal life and primary of 10 days postnatal in BMG. After this period, collagen IV reaction was not showed significant change in newborns.

Conclusion: These data indicate that collagen IV appear just during the glomerular vasculogenesis and because of continuity with vasculature which is required for glomerular endothelial cell differentiation, type IV collagen, is the major structural protein in BMG implicated in these processes.

Key words: Collagen IV, Glomerular Basement Membrane, Kidney, Mouse

مقاله تحقیقی

مطالعه ایمونوهیستوشیمی تغییرات کلاژن نوع IV در غشای پایه کلافه‌های گلومرولی در دوران جنینی و پس از تولد در موش نژاد Balb/c

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

* گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ایران

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

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

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

تاریخ وصول: بهمن‌ماه ۸۷ ، تاریخ پذیرش: فروردین‌ماه ۸۸

چکیده

هدف: استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی کلاژن نوع IV و مطالعه تکامل غشای پایه مزانژیوم گلومرولی در دوره جنینی موش به کمک میکروسکوپ نوری.

مواد و روش‌ها: برای این منظور ۲۰ موش ماده نژاد Balb/C به‌طور تصادفی انتخاب شده و پس از مراقبت در شرایط استاندارد و جفت‌گیری، وجود پلاک 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 انجام شد تا با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمیایی، کلاژن نوع IV غشای پایه کلافه‌های گلومرولی در کلافه‌های گلومرولی کلیه‌های آن‌ها ردیابی شود. 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: این مطالعه نشان داد که کلاژن نوع IV در روز پانزدهم جنینی در غشای پایه کلافه‌های گلومرولی با واکنش ضعیف ظاهر شده و در روزهای بعد افزایش یافته و شدت آن تا روز دهم پس از تولد ادامه می‌یابد اما پس از آن تغییری پیدا نمی‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل بر این موضوع دلالت دارد که در خلال میانکنش‌های اجزای غشای پایه گلومرولی، کلاژن نوع IV که از حدود روز پانزدهم جنینی ظهور یافته است تا حدود روز دهم پس از تولد بر گسترش و نقش ساختمانی آن افزوده می شود زیرا در طول این دوره روند شکل‌گیری عروق و تمایز سلول‌های اندوتلیال عروقی ادامه دارد و کلاژن نوع IV یکی از پروتئین‌های عمده غشای پایه گلومرولی است که در روند پیشرفت این پدیده مداخله می‌نماید.

کلید واژه‌ها: کلاژن نوع IV ، غشای پایه گلومرولی، کلیه، موش

مقدمه

غشای پایه نواحی تخصص یافته‌ای از مادهٔ خارج سلولی (ECM: Extra Cellular Matrix) است که حاوی ترکیبات مختلفی از قبیل پروتئین‌ها و قندها است [۱ و ۲]. این ماده معمولاً از ترکیباتی از قبیل انواع رشته‌های کلاژن از قبیل کلاژن نوع IV و V، لامینین، فیبرونکتین و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته و غیرسولفاته تشکیل می‌شود [۲ و ۳]. در بین ترکیبات غشای پایه، کلاژن جزء فراوان‌ترین ترکیبات موجود است و از این

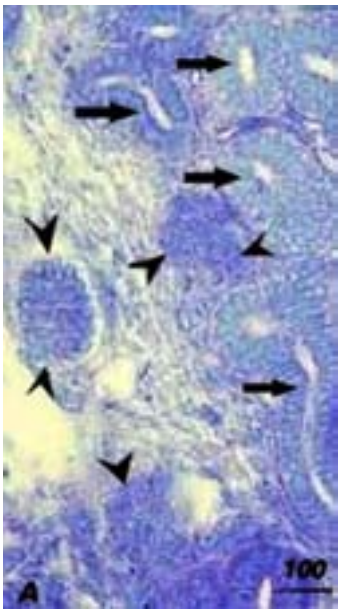
آدرس مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
E-mail:Nikravesh@hotmail.com

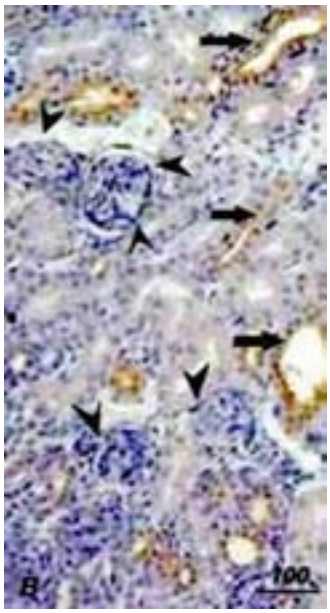
میان کلاژن نوع IV ساختار اصلی این بخش را ایجاد می‌نماید [٤ و ٥]. تغییرات غشای پایه سلولهای اپیتلیایی نـه تنهـا طـی روند تکامل جنینی بلکه در طول حیات موجود زنده نیز ادامـه دارد تا آنجا که تغییرات غیرطبیعی آن در هر دوره‌ای می‌توانـد به‌عنوان شاخص تغییرات بافتی در مطالعات پاتولوژیک نیز مد نظر قرار گیرد [٦ و ٧]. در یک تعریف کامل‌تر می‌توان گفـت اجزای ECM در ارگان‌های درحال تکامل، به‌طور مداوم تغییر پیدا کرده و مجدداً سنتز می‌شـوند [٨ و ٩]. بـه عبـارت دیگـر مولکـول‌هـا و اجـزای خاصـی از مـاتریکس بـرای تمـایز سلولی‌ضروری است که از این میان کلاژن نوع IV از اهمیـت ویژه‌ای برخوردار است تا آنجا که نقش فعـال و پیچیـده‌ای را در تنظیم رفتار سلول‌ها از قبیل تکامل، مهاجرت، تکثیر، تعیین شکل و متابولیـسم ایفـاء مـی‌کنـد [١٠ و١١]. مـشخص‌تـرین نقش‌های ECM ایجاد سوبسترایی برای مهاجرت‌های سـلولی و همچنین اتصال سلول‌های اپی‌تلیالی به یکدیگر است که بـه کمک کـلاژن نـوع IV بـه‌وقـوع مـی‌پیونـدد [١٢، ١٣ و ١٤]. بنابراین با توجه به اینکه کلاژن نوع IV از طریق تاثیرگـذاری بـر ECM و سـاختمان‌هـای غـشای پایـه بـه عنـوان یکـی از اصلی‌ترین عوامل تغییرات ارگان‌های زنده محسوب می‌شـود، ضروری به نظر می‌رسد که در مورد آن مطالعات علمی عمیق و دامنه داری صورت گیرد که مطالعـه حاضـر بخـشی از ایـن برنامه است.

مواد و روش‌ها

با انتخاب تصادفی ۲۰ موش بـاکره نـژاد Balb/C و تعیـین روز صفر بارداری در آنـان در هریـک از روزهـای ۱۳ تـا ۱۸ بارداری، روزانه ۲ موش با استفاده از کلروفرم بیهوش شـده و پس از قطع نخاع و سزارین، جنین‌های به‌دسـت آمـده مطـابق روش‌های معمول بافت‌شناسی تثبیـت و آمـاده سـازی بـافتی شدند. مشابه این عمل برای نوازدان موش‌های باقیمانده در هر یک از روز های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پس از تولد به انجام رسـید بدین ترتیب که در هر یک از روزهـای یـاد شـده کلیـه‌هـای نوزادن متعلق به دو موش مطابق روش‌هـای یـاد شـده آمـاده سازی شد. سرانجام از همه نمونه‌های جنینی و نوزادی اقـدام به تهیه بلوک‌های پارافینی شده و بـرش‌هـایی بـا ضـخامت ۷ میکرون تهیه شد. پس از پارافین زدایی و آبدهی برش‌هایی که از ناحیه کلیه‌ها در جنین‌ها و نوزادان به‌دست آمده بود دو بـار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر تریس (حاوی ۱/۵٪ کلـرور سدیم‌در pH =۷/٤) شستشو داده‌شد.برای‌بلوک‌کردن‌آنتی‌ژن های غیراختصاصی، ابتدا برای مدت ۳ ساعت، برش‌ها در مجاورت تریتون۰/۳٪درصد X100 در بافر تریس و goat serum و پس از آن برای مهار فعالیت آندوژناز پراکسیداز به مدت ۱ ساعت در محلول۳ درصد آب اکسیژنه در متانول قرار گرفت و پـس از آن برای مدت ٢٤ ساعت با آنتی بادی کلاژن IV (کانژوگـه شده با Horse radish peroxidase) با رقت ۱ به ۵۰ مجاورت یافته و سپس مجدداً در محلول تریس بـافر حـاوی تریتـون ۳ درصد و سرم ۲ درصد قرار گرفت و آنگاه ۳ بار و هر بار بـه مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس شستشو داده شـد. پـس از ایـن مرحله، برش‌ها بـرای مـدت ۱۵ دقیقـه در معـرض دی آمینـو بنزیـدین (Di-aminobenzidine) حـاوی ۰/۰۳ درصـد آب اکسیژنه قرار داده شده و در آخرین مرحله پس از شستـشوی نمونه‌ها برای ایجاد رنگ زمینه از هماتوکسیلین اسـتفاده شـد. برش‌هایی که بدین ترتیب آماده مطالعه شدند با استفاده از ژل گلیسرول تثبیت شدند. با این روش رنگ‌آمیزی، کلاژن مـورد نظر براساس میزان پیدایش، به آنتی‌کلاژن واکنش مثبت نـشان داده و برحسب میزان کلاژن از قهوه‌ای روشن تا تیـره ظهـور یافت.

به اعتبار اینکه واکنش به رنگ‌پذیری کلاژن نوع IV کـه بـا استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونـال شـاخص مناسـبی در تعیـین تراکم این نوع کلاژن محسوب می‌شـود، درجـه رنـگ‌پـذیری براساس روش درجه‌بندی فرث(Firth) [١٥] بـه‌عنـوان معیـار تراکم کلاژن مد نظر قرار گرفت. در خاتمه، نتـایج مبتنـی بـر مطالعـات میکروسـکوپیک ارزیـابی شـده و بـا اسـتفاده از میکروسکوپ دوربین‌دار Olympus از مناطق موردنظر عکس‌های



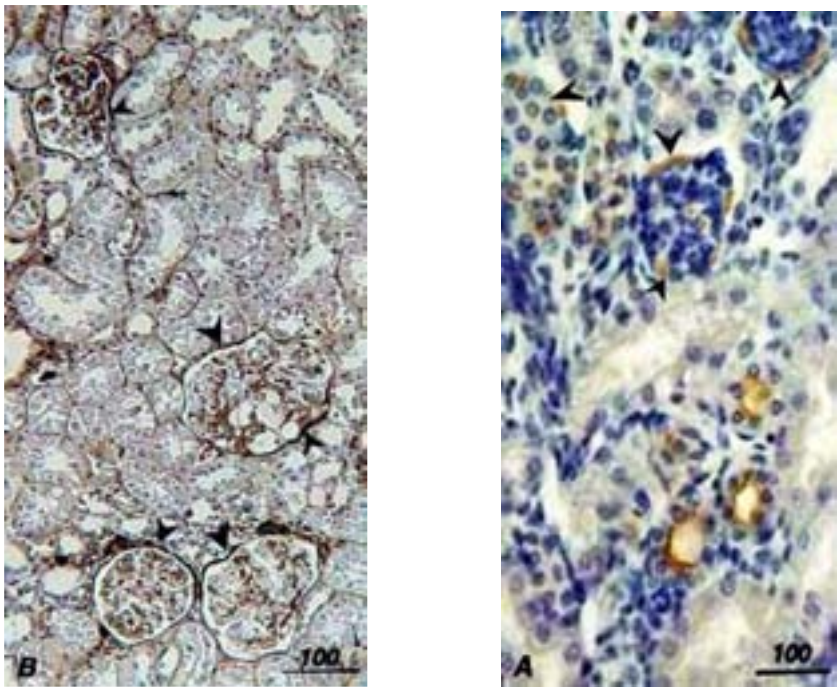


شکل ۱. A: مربوط به پارانشیم کلیه در روز سیزدهم جنینی است که هیچ‌یک از اجزای کلیه نسبت به آنتی کلاژن واکنش نشان نداده و پیش سازهای گلومرولی (پیکان‌های دوشاخه) و ساختار اولیه توبولهای کلیوی (پیکان‌های دنباله دار) با رنگ زمینه و یکسان به چشم می‌خورند.
B: مربوط به روز چهاردهم جنینی است که علیرغم اینکه ساختار کلافه‌های گلومرولی (پیکان‌های دو شاخه) کامل‌تر شده است هنوز از واکنش کلاژن در غشای پایه خبری نیست و فقط غشای پایه مقاطع عروقی (پیکان‌های دنباله‌دار) واکنش نشان داده و با رنگ قهوه ای روشن قابل تشخیص هستند (بار: ۱۰۰ میکرومتر).

دیجیتال تهیه و فایل مربوط به آن ذخیره شد. پس از مطالعه عکس‌ها در نواحی کلافه‌های 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.

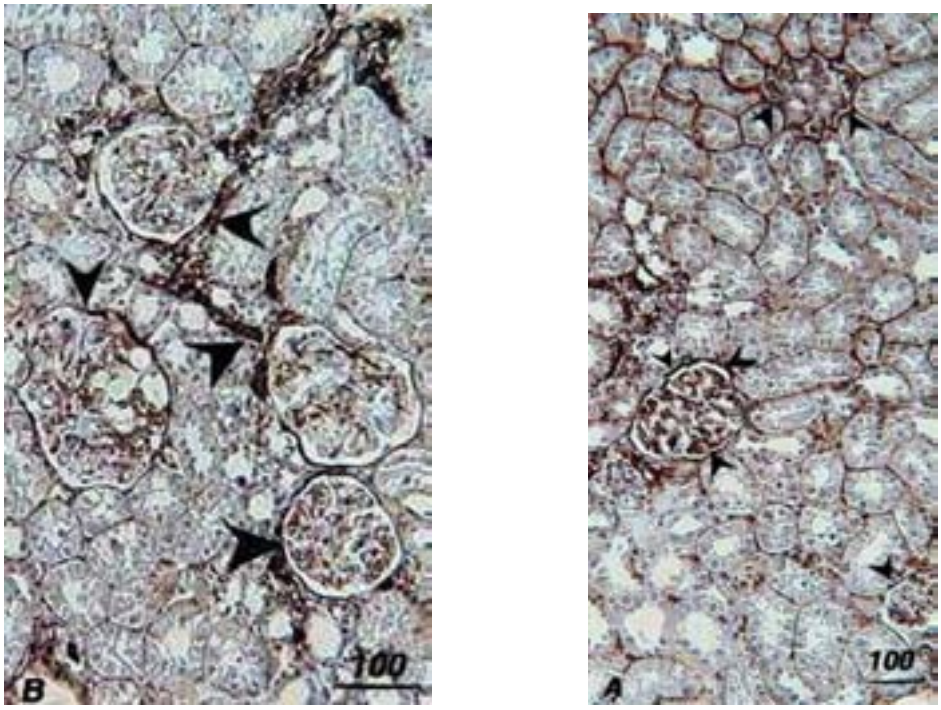
یافته‌ها

بررسی‌های به عمل آمده نشان داد که در روز سیزدهم، سلول‌های مزانشیمی سازنده کلیه اطراف جوانه حالب‌ساز را گرفته و ساختمان‌های پیش ساز کلافه‌های گلومرولی و شکل ساده‌ای از توبول‌های اولیه با رنگ زمینه مشخص شده است (شکل ۱A)، اما از کلاژن غشای پایه مربوط به آنها واکنشی دیده نشد. در روز چهاردهم جنینی تکامل ساختمان کلافه‌های گلومرولی کامل‌تر شده و فقط کلاژن غشای پایه مقاطع عروقی پارانشیم کلیه به‌صورت ضعیف واکنش نشان داده است، اما از واکنش کلاژن در غشای پایه کلافه‌های گلومرولی اثری دیده نشد. در روز پانزدهم جنینی (شکل ۲A) اولین واکنش‌های مورد نظر به‌صورت ضعیف در نواحی قشری گلومرول‌ها به‌صورت پراکنده بروز نمود و علائم ظهور کلاژن در این نواحی به مقدار اندک به ثبت رسید. در روزهای بعد بر مقدار این واکنش‌ها افزوده شد، به‌طوری‌که غشای پایه بافت مزانژیال گلومرولی با رنگ‌پذیری کلاژن در روز هجدهم جنینی کاملا متمایز شد (شکل ۲B). نتایج مربوط به این مرحله نشان داد که غشای پایه سلول‌های اپیتلیالی نه تنها در بخش قشری شبکه‌های گلومرولی نسبت به روزهای قبل افزایش یافته بلکه در آندوتلیوم عروقی داخل کلافه‌ها نیز این افزایش به‌خوبی ظهور پیدا نموده است. بررسی‌های مربوط به روزهای پنجم، و دهم پس از تولد نیز نشان داد که واکنش غشای پایه گلومرولی در روز پنجم نسبت به دوران جنینی شدت بیشتری یافته و تا روز دهم به حداکثر می‌رسد (شکل‌های ۳A و ۳B) اما در روزهای بعد از نظر شدت واکنش کلاژن نوع IV به رنگ‌پذیری تفاوت معنی‌داری با روز دهم مشاهده نشد.



شکل ۲. A: مربوط به تعدادی از کلافه‌های گلومرولی در روز پانزدهم جنینی است که اولین شواهد مربوط به رنگ پذیری در غشای پایه نواحی قشری کلافه‌ها (پیکان‌های نشانه) به‌صورت پراکنده به چشم می خورد (بار: ۱۰۰ میکرومتر).

B: مربوط به کلافه‌های گلومرولی روز هجدهم جنینی است که علاوه بر آنکه غشای پایه بخش قشری گلومرول‌ها (پیکان‌های نشانه) به خوبی واکنش نشان داده، غشای پایه ساختمان‌های داخلی آن‌ها نیز عکس العمل شدیدی نشان داده است.



شکل ۳ A: تعدادی از کلافه‌های گلومرولی را در روز پنجم پس از تولد نشان می‌دهد که غشای پایه کلافه‌های گلومرولی به‌خوبی واکنش نشان داده است (پیکان‌های نشانه).

B: مربوط به روز دهم پس از تولد است که شدت واکنش در نواحی گلومرولی نسبت به تصویر قبلی افزایش بیشتری یافته است و به بالاترین حد خود رسیده است (بار: ۱۰۰ میکرومتر).

بحث

کلیه یکی از بخش‌های شاخص سیستم ادراری محسوب می‌شود که با گذر از مراحل تکاملی مختلف، مزانشیم آن دارای این قابلیت است که منجر به پیدایش اپیتلیوم توبول‌ها و گلومرول‌های کلیوی می‌شود [۱۶ و ۱۷]. مطالعات جنین‌شناسی نشان می‌دهد که کانون‌های اولیه کلافه‌های گلومرولی موش در اواخر روز سیزدم و اوایل روز چهاردهم جنینی شروع به پیدایش می‌کنند [۱۸].

بررسی‌های ایمونو هیستوشیمی مربوط به شکل‌گیری آندوتلیوم کلافه‌های گلومرولی در این مطالعه نشان داد که اولین واکنش‌های کلاژن نوع IV در غشای پایه گلومرول‌ها از روز پانزدهم به‌صورت ضعیف قابل ردیابی است. این موضوع نشان می‌دهد که شکل‌گیری آندوتلیوم عروقی در این کلافه‌ها مستلزم شکل‌گیری و حمایت غشای پایه‌ای است که صرفنظر از سایر پروتئین‌هایی که در آن به‌کار گرفته شده، الیاف کلاژن و خصوصاً کلاژن نوع IV دارای نقشی کلیدی است [۱۹]. یافته‌های حاصل همچنین نشان می‌دهد که ساختار این بخش از غشای پایه نه تنها تا پایان دوره جنینی رو به افزایش است بلکه در ۱۰ روز اول پس از تولید نیز ادامه می‌یابد.

البته این بدان معنی نیست که در سایر دوره‌های زندگی تراکم آن تحت تاثیر فاکتورهایی که از فعالیت دراز مدت کلیه‌ها و افزایش سن ناشی می شود تغییر نخواهد کرد [۲۰]. مطالعات مربوط به دوره های بعدی در این زمینه نشان داده است که تغییراتی نظیر دیابت و پرکاری کلیه بر ضخامت غشای پایه و تراکم کلاژن موجود در آن تاثیر می‌گذارد [۲۱] و علاوه بر این که در مراحل اولیه تکامل کلیوی از این نوع پروتئین به‌عنوان عاملی تاثیرگذار بر شکل‌گیری گلومرول‌ها قلمداد می‌شود، براساس نوعی واکنش دفاعی از پیش تعیین شده و با ارسال سیگنال‌هایی به بافت‌های مجاور و ماده خارج سلولی اطراف خود سبب می‌شوند که بر ضخامت غشای پایه و تراکم کلاژن موجود در آن افزوده شود [۲۲]. این ویژگی به صورت یک واکنش اتوایمیون اگر چه از آندوتلیوم عروقی گلومرول‌ها در مقابل فاکتورهای شیمیایی مخرب و تاثیرگذار حمایت می‌نماید اما از سوی دیگر به کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی و کم کاری کلیه منجر شده و در موارد حاد به از کار افتادگی آن می‌انجامد.

قبلاً چنین تصور می‌شد که ترکیبات غشای پایه فقط به‌عنوان پایه و اساس ساختار فیزیکی بافت سلول‌های اپیتلیالی انجام وظیفه می‌نماید، حال آنکه اکنون مشخص شده است که ماده خارج سلولی یاECM که غشای پایه بخشی از آن است، نقش‌های پیچیده و فعالی را در تنظیم رفتار سلول‌ها از قبیل تکامل، مهاجرت، تکثیر، تعیین شکل و متابولیسم سلولی و تغییرات پاتولوژیک آن بر عهده می‌گیرد [۲۳]. براساس شواهد موجود، ECM ، همچنین فعالیت‌های مختلف سلولی اعم از چسبندگی، مهاجرت و انتقال سیگنال‌های کنترل‌کنندهٔ سلول‌ها را رهبری می‌کند [۲۴] که بخش عمدهٔ این فعالیت‌ها در گرو وجود پروتئین‌های رشته‌ای موجود در ساختمان آن محسوب می‌شود [۲۵].

به‌طور کلی پروتئین‌های رشته‌ای ECM بر دو گروهند: پروتئین‌هایی نظیر کلاژن و الاستین که نقش ساختمانی دارند و پروتئین‌هایی مانند فیبرونکتین و لامینین که نقش اتصالی و چسبندگی ایفا می‌کنند [۲۶]. از بین این پروتئین‌ها، کلاژن‌ها فراوانترین پروتئین‌های بدن و فراوانترین جزء ماتریکس خارج سلولی محسوب می‌شوند، چنانکه تا کنون حداقل ۱۹ نوع کلاژن شناسایی شده است. در عین حال مهمترین نوع کلاژن به‌کار رفته در ECM همان نوع IV است که به اختصار به اهمیت و نقش حیاتی آن اشاره شد. امروزه مشخص شده است که انواع کلاژن می‌توانند در فرآیندهای مختلف مورفولوژیک نیز حائز اهمیت باشند. تحقیقات نشان داده است که علاوه بر این انواعی از کلاژن دارای این قابلیت است که می‌تواند سلول‌های اندوتلیال را القا کرده و آن‌ها را وادار به تشکیل مجاری لوله‌ای شکل نماید [۲۷] یا اینکه کلاژن نوع II ممکن است در واکنش‌های اپی‌تلیالی- مزانشیمی نقش داشته

باشد، به‌طوری کـه فراینـد اسـکلت‌دار شـدن را در سـلول‌هـا تحریـک کنـد [۲۸]. کـلاژن نـوع VI نیـز احتمـالاً در میـان کنش‌های مـاتریکس سـلول نقـش دارد و در تجدیـد آرایـش اسکلت سلولی فیبروبلاست‌ها و در نتیجه افزایش و گـسترش سطح سلولی طی روند تکامل انجـام وظیفـه مـی‌نمایـد [۲۹]. تحقیقات نشان می‌دهد که ECM در بافت‌های مختلف اعمـال تخصص یافته‌ای را باعث می‌شود. بـرای‌مثـال، هپاتوسـیت‌هـا بایستی برای ساختن پروتئین‌های خاص سلولی در تمـاس بـا ECM و غشای پایه قـرار گیرنـد. همچنـین تعـداد زیـادی از فاکتورهای رشـد و هورمـون‌هـا از طریـق اتـصال بـه ECM، سیگنال‌ها را از سلولی به سلول دیگر منتقل‌مـی‌کننـد کـه ایـن مهم به مدد کلاژن نوع IV موجود در ECM صورت می‌گیـرد [۳۰]. از سـوی دیگـر، شـناخت اجـزای ECM در ارتبـاط بـا مکانیسم عمل انواع فاکتورهای رشد و همچنین فهـم پـاتوژنز بیماری‌های مختلف و ایجاد راه‌هـای جدیـد درمـانی اهمیـت دارد [۳۱]. به بیان دیگر به لحاظ اهمیت پروتئین‌های رشـته‌ای موجود در ECM و به‌خصوص کلاژن نـوع IV ، نقـش آن در تکامل اندام‌ها و طـرح‌ریـزی و اتـصالات انتهـایی تانـدون‌هـا انکارناپذیر است [۳۲]. دخالـت فیبریـل‌هـای ECM بـه‌ویـژه کلاژن نوع IV, صرفنظر از اینکه به‌عنوان یک سیستم هـدایت کننده برای مهاجرت سلولی به حساب می‌آید در روند تـرمیم زخـم، سـنتز و تجدیـد اجـزای ECM (از قبیـل فیبـرونکتین، تناسین، انواع کلاژن، کندروایتین سولفات و هپاران سـولفات) و همچنین در مهاجرت و تکثیر و تمـایز سـلولی مـؤثر اسـت [۳۳]. نکتهٔ جالب توجه دیگر اینکه ثابت شده است که تـرمیم زخم‌های جنینی به‌کمـک پـروتئین‌هـای رشـته‌ای ECM (و از جمله کلاژن نوع IV) صورت می‌گیرد بدون آنکـه هـیچ‌گونـه اثری (Scar) از این‌گونه جراحت‌ها بر جای مانده باشد [۳٤ و ۳۵]. براساس شـواهد حاصـل از ایـن مطالعـه چنـین بـه‌نظـر می‌رسد که شکل‌گیری و تکامل کلافه‌هـای گلـومرولی نیـز از این قاعده مستثنی نیست. یافته‌های حاصل بیانگر این موضـوع است که برای آرایش اپیتلیوم کلافه‌های گلومرولی ابتـدا بایـد بستر مناسب شکل‌گیری نموده و پروتئین‌های لازم در ارتبـاط با پیدایش غشای پایه سنتز شوند. در این میان کلاژن نـوع IV به‌عنوان یکی از ارزشمندترین عناصر سـاختاری غـشای پایـه گلومرولی تحت تاثیر مکانیسم‌های القایی شروع به سنتز نموده و در محـدوده سـاختمان‌هـای پـیش‌سـاز گلـومرولی ذخیـره می‌شود. افزایش کلاژن نوع IV در خـلال تکامـل کلافـه‌هـای عروقی کلیه گویای این واقعیت است که تکامل گلومرول‌های کلیوی در گروی بیـان کـلاژن نـوع IV اسـت کـه در خـلال شکل‌گیری مزانژیوم گلومرولی ظهور نموده و افزایش می‌یابد. ظهور کلاژن غشای پایه گلومرولی در روز پـانزدهم جنینـی و افزایش آن در خلال روزهای پس از آن بر این موضوع دلالت دارد کـه شـکل‌گیـری و رونـد تکامـل کلافـه‌هـا منـوط بـه شکل‌گیری بستر مناسبی است که اجزای سازنده غـشای پایـه تضمین کننده آن است. بر اسـاس ایـن واقعیـت شـاید بتـوان گفت زمانی که پس از تولـد سـاختار گلـومرولی کلیـه‌هـا بـه تکامل نهایی خود رسید تراکم کلاژن نوع IV کـه طـی رونـد شکل‌گیری گلومرول‌های کلیوی بسیار حائز اهمیت اسـت، از این مرحله به بعد در یک حد اپتیموم باقی می‌مانـد و تغییـری نمی‌کند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب یـک طـرح پژوهـشی بـین دانـشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانـشگاه علـوم پزشـکی زابـل صورت گرفته و هزینه‌های آن توسط معاونت محترم پژوهشی دانـشگاه زابـل تـامین شـده اسـت. بنـابراین بدینوسـیله از مساعدت‌های به عمل آمده در این زمینه از هر دو معاونت این دانشگاه‌ها تقـدیر و تـشکر مـی گـردد. همچنـین از خـدمات تکنیکـی سـرکارخانم متجـدد در آزمایـشگاه هیـستوتکنیک دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می‌شود.

References

1. **Gullberg D, Ekblom P.** Extracellular matrix and its receptors during development. Int. J Dev Biol 1995; 39: 845-54.
2. **Berkholtz 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.
3. **Mates L, Nicolae C, Morgelin M, Deak F, Kiss I, Aszodi A.** Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. Matrix Biol 2004; 23(3): 195-204.
4. **Thesleff I, Stenman S, Vaheri A, Timple R.** Changes in the Matrix Proteins, Fibronectin and Collagen, during Differentiation of Mouse Tooth Germ. Dev Biol 1979; 70: 116-26.
5. **Horacek MJ, Thompson JC, Dada MO, Terracio L.** The extracellular matrix components laminin, fibronectin, and collagen IV are present among the epithelial cells forming Rathke's pouch. Acta Anat 1993; 147(2): 69-74.
6. **Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U.** Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. Development 2004; 131(7): 1619-28.
7. **Cosgrove D, Meehan DT, Delimont D, Pozzi A, Chen X, Rodgers KD, Tempero RM, Zallocchi M, Rao VH.** Integrin alpha1beta1 regulates matrix metalloproteinases via P38 mitogen-activated protein kinase in mesangial cells: implications for Alport syndrome. Am J Pathol 2008; 172(3): 761-73.
8. **Carnegie JA, Cabaca O.** Extracellular matrix composition and resilience: two parameters that influence the in vitro migration and morphology of rat inner cell mass-derived cells. Biol Reprod 1993; 48(2): 287-99.
9. **Chai Q, Krag S, Miner JH, Nyengaard JR, Chai S, Wogensen L.**TGF-beta1 induces aberrant laminin chain and collagen type IV isotype expression in the glomerular basement membrane. Nephron Exp Nephrol 2003; 94(4): 123-36.
10. **Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH.** Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. Dev Biol 1991; 143(2):303-8.
11. **Thesleff I, Stenman S, Vaheri A, Timple R.** Changes in the Matrix Proteins, Fibronectin and Collagen, during Differentiation of Mouse Tooth Germ. Dev Biol 1979; 70: 116-26.
12. **Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG.** Mammalian collagen IV. Microsc Res Tech 2008; 71(5): 357-70.
13. **Carnegie JA, Cabaca O. The influence of extracellular matrix components on the proliferation and migration of inner cell mass-derived parietal endodermal cells.** Biol Reprod 1991; 45(4): 572-80.
14. **Ment LR, Stewart WB, Ardito TA, Madri JA.** Beagle pup germinal matrix maturation studies. Stroke 1991; 22(3): 390-95.
15. **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): 83-6.
16. **Abrass CK, Berfield AK, Ryan MC, Carter WG, Hansen KM.** Abnormal development of glomerular endothelial and mesangial cells in mice with targeted disruption of the lama3 gene. Kidney Int 2006; 70(6): 1062-71.
17. **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. Cell 1999; 99: 377–86.
18. **Sukhatme VP.** Renal development: challenge and opportunity. Semin Nephrol 1993; 13: 422–26.
19. **Mjelle JE, Rekvig OP, Fenton KA.** Nucleosomes

possess a high affinity for glomerular laminin and collagen IV and bind nephritogenic antibodies in murine lupus-like nephritis. Ann Rheum Dis 2007; 66(12): 1661-68.

20. **Gubler MC.** Inherited diseases of the glomerular basement embrane. Nat Clin Pract Nephrol 2008; 4(1): 24-37.
21. **Funabiki K, Makita Y, Yamamoto M, Shike T, Fukui M, Sumiyoshi Y, et al.** Dissociated expression of collagen type IV subchains in diabetic kidneys of KKAy mice. Nephron 1998; 80(2): 208-13.
22. **Borza DB.** Autoepitopes and alloepitopes of type IV collagen: role in the molecular pathogenesis of anti-GBM antibody glomerulonephritis. Nephron Exp Nephrol 2007; 106(2): 37-43.
23. **Gullberg D, Ekblom P.** Extracellular matrix and its receptors during development. Int J Dev Biol 1995; 39: 845-54.
24. **Hurle JM, Hinchliffe JR, Ros MA, Critchlow MA, Balvez G.** The ECM architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part ofthe developing chick limb: an ultrastructureal, histochemical and immunocytochemical analysis. Cell Differ Dev 1989; 27: 103-20.
25. **Cohen MP, Lautenslager GT, Hud E, Shea E, Wang A, Chen S, Shearman CW.** Inhibiting albumin glycation attenuates dysregulation of VEGFR-1 and collagen IV subchain production and the development of renal insufficiency. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 292(2): 789-95.
26. **Olson AD, Pysher T, Bienkowski R.** Organization of intestinal epithelial cells into multi cellular structure requires laminin and functional actin microfilament. Exp Cel Res 1991, 192: 543-49.
27. **Maeshima A, Sakurai H, Nigma SK.** Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. J Am Soc Nephrol 2006; 17(1): 188-98.
28. **Ishibe T, Seongchae I, Yoo J.** Type II collagen distribution in the ear of the developing chick embryo. Laryngoscope 1989; 99: 547-53.
29. **Doane, KJ, Yang G, Birk DE.** Corneal cell matrix interaction type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblast. Exp Cell Res 1992; 200: 490-99.
30. **Zhang HJ, Tai GX, Zhou J, Ma D, Liu ZH.** Regulation of activin receptor-interacting protein 2 expression in mouse hepatoma Hepa1-6 cells and its relationship with collagen type IV. World J Gastroenterol 2007, 13(41): 5501-5.
31. **Favor J, Gloeckner CJ, Janik D, Klempt M, Neuhäuser-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.
32. **Langmaier F, Meladek M, Kolomaznik K, Sukop S.** Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins. Reaction condition and the yield of enzymatic hydrolysis of short cattle tendons. Int J Cosmet Sci 2001; 23(4): 201-6.
33. **Holster T, Pakkanen O, Soininen R, Sormunen R, Nokelainen M, Kivirikko KI, et al.** Loss of assembly of the main basement membrane collagen, type IV, but not fibril-forming collagens and embryonic death in collagen prolyl 4-hydroxylase I null mice. J Biol Chem 2007; 282(4): 2512-19.
34. **Campos AC, Groth AK, Branco AB.** Assessment and nutritional aspects of wound healing. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2008; 11(3): 281-8.
35. **Figus A, Leon VJ, Philip B.** Dziewulski P. Severe multiple extensive postburn contractures: a simultaneous approach with total scar tissue excision and resurfacing with dermal regeneration template. J Burn Care Res 2007; 28(6): 913-17.