Archive of SID
Pharmaceutical Sciences, 2010, Vol.16, No 3, Page 181-186

علوم داروئی، ۱۳۸۹ دوره ۱۶، شماره ۳، ۱۸۶-۱۸۱

اثر تجویز نیکوتین مادری بر فرایند حاصل از تغییرات کلاژن نوع IV و نقش آن بر برونکوژنز و آلوئول سازی ریه نوزادن موش

محمد رضا نیکروش*[۱]، عباسعلی معین[۲]، مهدی جلالی[۱]، شبنم محمدی[۱]، محمد حسن کریم فر[۲]

[۱] گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. [۲]گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۷ ، تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۱

Maternal nicotine induces collagen type IV changes and its role on pulmonary bronchogenesis and alveolarization in mouse newborns

Nikravesh M.R.[1*], Moeen A.A.[2], Jalali M.[1], Mohammadi S.[1] Karimfar M.H.[2]

[1]Department of Anatomy and cell biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

[2]Department of Anatomy, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

Received: 28 Jun. 2010, Accepted: 12 Aug. 2010

Objective: Nicotine is one the chemical substance by high level of toxically which can rapidly absorbed from the lungs of smokers. It crosses the placenta and accumulates in the developing fetus. Our previous investigation indicated that collagen type IV appearance has a key role in basement membrane of various embryonic organs. We evaluated the effect of maternal nicotine exposure pre and postnatal period on collagen IV expression during bronchogenesis and alveolarization in the lung of mouse newborns**. Methods:** Pregnant Balb/C 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 were received the same amount of nicotine during the same gestational days as well as 2 first week after birth (lactation). The control groups received the same volume of normal saline during the same periods. At the end of exposure times, all of newborns 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 groups increased significantly in compared to control groups. Our finding showed that an alveolar remodeling and abnormal bronchogenesis in experimental group especially group 2 were observed. **Conclusion:** These data indicate that maternal nicotine exposure may induces an abnormal collagen IV expression and cause a defect in bronchopulmonary development

Key words*: nicotine, collagen IV, bronchogenesis, alveolarization, mouse.*

زمینه و هدف: نیکوتین به عنوان یکی از ترکیبات با قابلیت جذب و سمیت بالا است که علاوه بر جذب ریوی در افراد سیگاری به راحتی از سد جفتی نیز می گذرد و بر تکامل جنین اثر می گذارد. در این مطالعه اثر تجویز نیکوتین مادری بر تغییرات کلاژن نوع IV و تاثیر آن بر فرایند آلوئول سازی و برونکوژنز ریه نوزادان موش ارزیابی گردید. **روش ها:** موشهای حامله نژاد balb/c به دو گروه تجربی و دو گروه کنترل تقسیم شدند. به گروه تجربی ۱ از روز پنجم تا پایان دوره حاملگی روزانه ۳mg/kg نیکوتین بصورت داخل صفاقی تزریق گردید و در گروه تجربی ۲ این عمل تا دوهفته پس از زایمان ادامه یافت. گروههای کنترل نیز حجم مشابهی از نرمال سالین دریافت نمودند. در پایان دوره، ریه نوزادان جهت مطالعه ایمونوهیستوشیمی مورد فیکس و آماده سازی قرار گرفت. **یافته ها:** واکنش کلاژن در غشای پایه برونشیال و ماده خارج سلولی پارانشیم ریوی نوزادان گروههای تجربی نسبت به کنترل افزایش معنی داری داشت. همچنین در ریه گروههای تجربی نشانه هایی از تغییر مدل آلوئولی و برونکوژنز غیر طبیعی دیده شد که این امر در گروه تجربی ۲ بیشتر قابل مشاهده بود. **نتیجه گیری:** به نظر می رسد چنانچه مادران حامله در معرض نیکوتین مستمر قرار گیرند، افزایش کلاژن غیر متعارفی در غشای پایه آلوئلی و ماده خارج سلولی ریوی فرزندان آنها پدید می آید که به تغییر در مدل آلوئولی و برونکوژنز آنها منجر می شود.

واژه های کلیدی: *نیکوتین، کلاژن نوع IV، تغییر مدل آلوئولی ، برونکوژنز، موش.*

* نویسنده مسئول: محمدرضا نیکروش، استاد علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران، تلفن: ۸۰۰۲٤۹۰-۰۵۱۱، نمابر ۸۰۰۲٤۸٤-۰۵۱۱

** Corresponding author:Mohammad Reza Nikravesh, Professor of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Tel: +98-511-8002490, Fax: +98-511-8002484*

E-mail:doctornikravesh@yahoo.com,

Web:www.nikravesh.mysite.com

www.SID.ir

۱- مقدمه

در مقایسه با سایر سیستم های بدن، تکامل ریه به دلیل اینکه به یک دستگاه تبادل گاز تبدیل می شود، اهمیت دارد. ریه باید در رحم 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 می رسد.

تکامل ریه در طی دوران جنینی به چندین مرحلـه تقسیم می شود. روند طبیعی تکامل و گذر از این مراحل به خاطر اینکه ریه در آینده عضو تبادل گاز های تنفسی است، اهمیت فراوان دارد (۱). اختلال در این مراحل بر بلوغ و نیز مقاومت ریه در برابر بیماریها در زندگی آینده می تـواند تأثیر بگذارد (٤-۲). در این دستگاه نیز مثل بسیاری از ارگانهای دیگر، سلول های مزانشیمی بوسیله فاکتورهـای رشـد و تمایـز (که توسط هورمونها تنظیم می شوند) باعث جهت دهی به اسکلت سلولی و رشد بافت می شود (۵). در این راستا بعضی از محققین، رابطه مستقیمی بین غشای آلوئولی (**Blood-Gas Barrier**) و کشش مکانیکی ایجاد شده توسط حرکات تنفسی جنین یافتند (٦).

مطالعات انجام گرفته در این زمینه نشان می دهد که کشش مکانیکی از تکثیر فیبروبلاستها جلوگیری می کند و (زمانی که بطور طبیعی ضخامت مزانشیم کاهش یافته) باعث تحریک آپوپتوز در مرحله کانالیکولار ریوی می شود (٦). این موضوع نشان می دهد که به طور طبیعی آپوپتوز در زمان تکامل سیستم تنفسی نیز اتفاق می افتد و چنانچه عاملی بر این روند تاثیر بگذارد به نقایص تکاملی ریه ها خواهد انجامید. از سوی دیگر ماتریکس خارج سلولی جزء مهمی از پارانشیم ریه است که در تکامل داربست بافت همبنـد ریـه و حـفظ سـاختـار و عـملکـرد آن اهـمیت فوق العاده ای دارد (۷). بنابراین هرگونه تغییر در ماده خارج سلولی یا غشای پایه سلول های ریوی ممکن است حتی بر تمایز سلولی آن نیز اثر بگذارد (۱۰-۸). ماتریکس خارج سلولی بطور عمده از رشته های کلاژن، الاستیک، رشته های رتیکولر، گلیکوپروتئین ها، پروتئوگلیکان ها و گلیکوز آمینوگلیکان ها تشکیل شده است که در این میان الیاف کلاژن و بخصـوص کلاژن نـوع IV نقش تعیین کننده ای در ساختمان آن ایفا می نماید. بنابراین به اعتبار اینکه نیکوتین در طی دوران جنینی با عبور از سد جفتی و پس از تولد از طریق شیر مادر به جنین ها و نوزادان منتقل شده و بر بافت همبند تاثیر مخرب می گذارد، ضروری بـه نظـر می رسد که نتیجه این تاثیرگذاری بر ریه نـوزادان از طریق تغییـرات عنـاصر تشکیل دهنده بافت همبندی آن منجمله کلاژن نوع IV مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: تجویز نیکوتین و تهیه بافت

در این مطالعه از ٢٤ موش balb/c استفاده شد که پس از جفت گیری و تعیین روز صفر حاملگی به ۲ گروه تجربی و ۲ گروه کنترل تقسیم شدند. شرایط نگهداری حیوانات دمای $۲۲\pm۱^{\circ}c$ 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 حاملگی روزانه ۳mg/ kg نیکوتین محلول در نرمال سالین بصورت داخل صفاقی تزریق گردید (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 گردیده و ریه های آنان به مدت ٢٤ ساعت در فرمالدهید ۱۰٪ فیکس گردیـد و بـه منظور مطالعات ایمونوهیستوشیمی مـورد آماده سازی بافتی قرار گرفت.

۲-۲: تکنیک های ایمونوهیستوشیمی

روش به کار رفته در ایـن تـحقیق تکنیـک آویدین- بیوتین پراکسیداز بـــود. برش هایی که از ریه نوزادن بدست آمده بود به میزان دو بـار و هـر بـار به مدت ۵ دقیقـه در PBS (حاوی ۱/۵٪ کلرور سدیم در pH =۷/٤) شستشو داده شد. جهت بلوک کردن آنتی ژنهای غیر اختصاصی، ابتدا بـرای مدت ۳ ساعت، بـرش هـا در مجـاورت تریتون۰/۳٪ X100 در PBS و goat serum و پس از آن برای مهار فعالیت آندوژناز پراکسیداز به مدت ۱ ساعت در محلول ۳٪ 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٪ و سرم ۲٪ قرار گرفت و آنگاه ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس شستشو داده شد. پس از این مرحله، برش ها برای مـدت ۱۵ دقیقه در معرض Di-aminobenzidine حاوی ۰/۰۳٪ آب اکسیژنه قرار داده شده و در نهایت پس از شستشوی نمونه ها برای ایجاد رنگ زمینه از هماتوکسیلین استفاده گردید. برش ها با ژل گلیسرول تثبیت شد و با میکروسکوپ نوری مـورد بررسـی قـرار گرفت. بـه اعتبار اینکه واکنش بـه رنگ پذیری کلاژن نوع IV که با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال صورت می گیرد شاخص مناسبی در تعیین تراکم این نوع کلاژن محسوب می شود. درجهٔ رنگ پذیری بر اساس متدهای درجه بندی رایج (۱۲) به عنوان معیار تراکم کلاژن مد نظر قرار گرفت.

www.SID.ir

در خاتمه، نتایج مبتنی بر مطالعات میکروسکوپیک مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار Olympus. B57 از مناطق مورد نظر اقدام به تهیه عکس های دیژیتال گردیده و فایل مربوط به آن ذخیره شد. پس از مطالعه عکس ها ارزشیابی کلاژن در نواحی غشای پایه آلوئولی و پارانشیم ریوی، بر اساس شدت واکنش، بصورت دو نفره و جدای از یکدیگر درجه بندی شد. علاوه بر این با استفاده از متد های استریولوژی مبتنی بر اصول کاوالیه که در مطالعات قبلی از آن بهره گیری شده بود، مدل برونش ها و آلوئول های ریوی در ریه نوزادان گروههای مختلف مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت (۱۳). برای این منظور با استفاده از کادر نمونه برداری (مطابق شکل ۱) اقدام به شمارش مقاطع آلوئولی در واحد سطح گردیده و با محاسبه ضخامت برشها و در نظر گرفتن برشهایی که بصورت سریال حذف گردیده بودند تعداد آلوئولها در واحد حجم محاسبه گردید. برای اندازه گیری قطر آلوئول ها نیز بزرگترین قطر عرضی آلوئولی نیز در هر یک از مقاطع به حساب آمده مورد اندازه گیری قرار گرفت.

۳-۲: آنالیز آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS 13 و آزمون کروسکال والیس و من- ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی دار بودن برای یافته های این مطالعه $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

ارزیابی کلاژن در ریه گروه های مختلف نشان داد که واکنش این پروتئین در غشای پایه برونشیول نمونه های کنترل به رنگ قهوه ای روشن ظاهر می شود (شکل ۲a). این واکنش ها در غشای پایه مشابه از نوزادان تجربی با بروز رنگ قهوه ای تیره افزایش یافت و نسبت به نمونه های کنترل تفاوتی معنی دار نشان داد (شکل ۲b). در مشاهدات میکروسکوپیک برونشیول های گروه تجربی ۲ نیز مشخص گردید که قطر بعضی از آنها نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می دهد و روند کانالیزه شدن آنها به خوبی صورت نگرفته است که این یافته ها در مطالعات مورفومتریک این نواحی نیز معنی دار بود (شکل ۲b در مقایسه با ۲a).

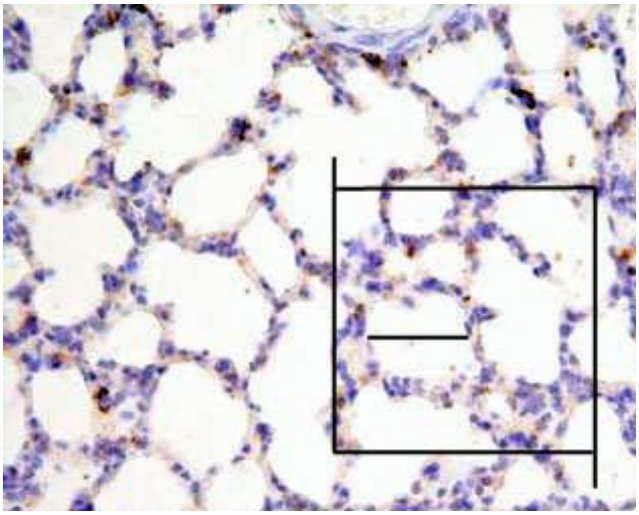
در این حالت در مناطقی از فضاهای برونشی بقایای سلولی مزانشیمال بصورت توده های سلولی باقی مانده و در حالیکه عمل کانالیزه شدن در سایر نقاط کامل شده بود این مناطق دارای انسداد بود (شکل ۲b). بررسی های انجام شده در مورد کلاژن غشای پایه آلوئول های ریوی و ماده خارج سلولی مربوط به آنها نیز در گروههای تجربی افزایش یافته (جدول ۱) و اگر چه نسبت به همدیگر (در گروه تجربی ۱ و ۲) معنی دار نبود. اما نسبت به نمونه های مشابه از گروه های کنترل (شکل های ۲c تا ۲f) اختلافی معنی دار نشان داد.

در مطالعات مورفومتریک مربوط به این نواحی نیز مشخص شد که تعداد آلوئول های ریوی در نمونه های کنترل در مقایسه با نمونه های تجربی بیشتر و در عین حال آنها کمتر است (جدول ۱) در عین حال میانگین کلی شمارش آلوئولی در نمونه های کنترل نسبت به تجربی افزایش چشمگیری نشان داد که دارای اختلافی معنی دار بود (جدول۱).

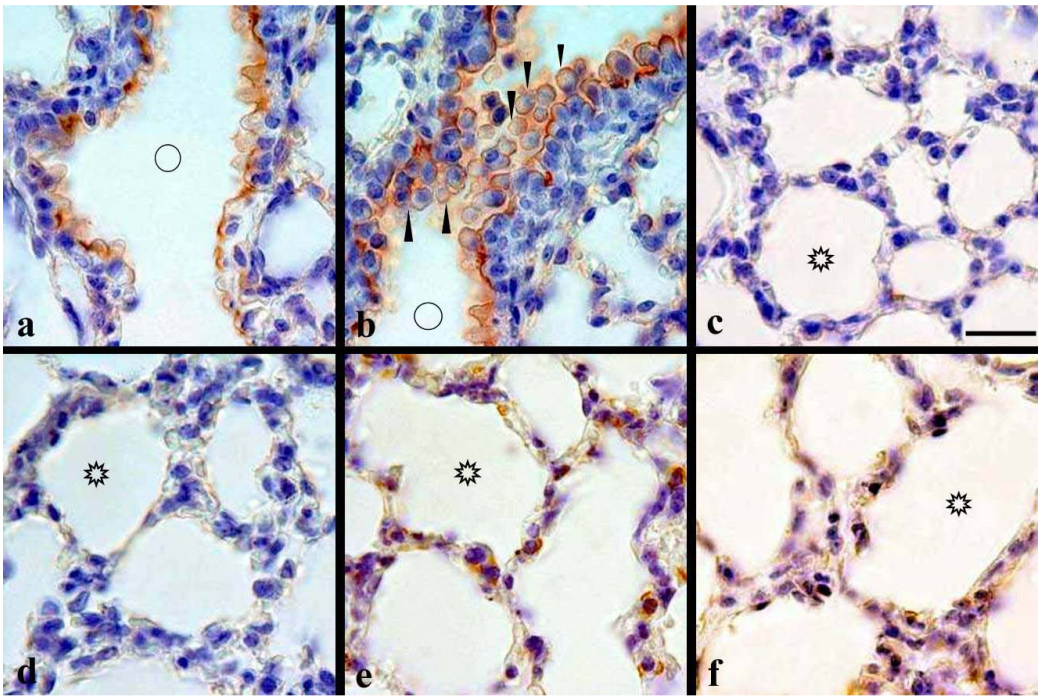
جدول۱. مقایسه پارامتر های بدست آمده حاصل از برش های پارانشیم ریوی مربوط به نمونه های تجربی و کنترل (شمارش و اندازه گیری در هر یک از گروهها ۱۰۰ مورد، $P<۰/۰۵$= * و $P<۰/۰۰۵$= **)

میانگین (SD ±)	کنترل ۱	تجربی ۱ (*)	کنترل ۲	تجربی ۲ (**)
تعداد مقاطع آلوئولی	۷/۵۱ × ۱۰^{۲} (±۲۹/٦٤)	۷/٦۷ × ۱۰^{۲} (±۳۳/٤۰)	۹/۷٦ × ۱۰^{۲} (±۲۷/۸۱)	٦/۲۱ × ۱۰^{۲} (±۳٦/۱٤)
بزرگترین قطر عرضی	۸۵±۱۲/۱۱	۹۷±۱۷/۲۲	۸۸ ± ۱۱/۲۸	۱۱۲ ±۲۱ /۱٤
تعداد آلوئول (mm^3)	۸/۸±۳/۱۱	۷/٦±۱/۲۱	۱۱±٤/۱۱	۵/۵±۱/٦۷
واکنش کلاژن نوع IV	++	++++	++	++++

www.SID.ir



شکل۱. برشی از پارانشیم ریوی که کادر شمارش آلوئولی بر روی بخشی از آن نشان داده شده و طریقه اندازه گیری قطر آلوئول هایی که با دیواره کامل در داخل کادر قرار دارند مشخص گردیده است. (اندازه گیری ها بر حسب میکرومتر محاسبه گردیده است).



شکل۲. مقاطع مربوط به رنگ آمیزی اختصاصی بر علیه کلاژن نوع IV که واکنش به آنتی کلاژن را در اپیتلیوم برونشیال و آلوئل های ریوی نمونه های مختلف به رنگ قهوه ای نشان داده است. در این شکل های به ترتیب در گروه کنترل ۲ (a) مقطع یک برونشیول و فضای داخل آن (دایره) نشان داده شده است، برش مشابه آن در گروه تجربی ۲ (b) نیز نشان می دهد که در بعضی مناطق (پیکانهای نشانه) بصورت مسدود باقی مانده است. شکل های مربوط به مقاطع آلوئل های ریوی گروههای کنترل ۱ و ۲ (c و d) نیز نشانگر دیواره بندی و تشکیل آلوئلهای معمولی (ستاره) را نشان می دهد در حالیکه در گروههای تجربی ۱ و ۲ (e و f) نشانه های بارزی از گسیختگی دیواره های آلوئلی و افزایش حجم فضای آلوئلی باقیمانده (ستاره ها) به چشم می خورد.
(رنگ آمیزی زمینه هماتوکسیلین، scale bar =۱۰۰µm).

www.SID.ir

Archive of SID

٤- بحث

براساس مطالعات قبلی مشخص شد که کلاژن نوع IV یکی از مهمترین پروتئین هایی است که در غشای پایه مربوط به ساختارهای اپیتلیالی و همچنین ماتریکس خارج سلولی ایفای نقش می نماید. این پروتئین با دارا بودن نقش کلیدی در تمایز و میانکنش های بین سلولی در بستر سازی تکاملی دوران جنینی و فعالیت های حیاتی بسیاری از بافت ها در طول حیات مد نظر قرار دارد.

یافته های این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی داری در کلاژن ریوی نوزادان گروههای تجربی وجود دارد که چنین تغییراتی در ارتباط با تاثیر نیکوتین در یافته های دیگر نیز گزارش گردیده است (۱). از سوی دیگر مشخص شد که تاثیر نیکوتین از طریق انتقال مادر به نسل بعدی چه به لحاظ اختلال در بیان کلاژن و چه به هر علت دیگر توانسته است تکاملی ریه ها را بگونه ای تحت تاثیر قرار دهد که روند طبیعی برونکوژنز را دچار مشکل نموده تا آنجا که برونشییول ها در مواردی مسدود مانده اند. علاوه بر این نتایج حاصل نشان داد که میانگین قطر آلوئولهای ریوی در گروه های تجربی نسبت کنترل افزایش یافته اما در عوض تعداد آلوئولها در واحد حجم در گروه های تجربی و بخصوص گروه تجربی ۲ به شکل معنی داری کاهش نشان می دهد که نشانگر کاهش سطح تنفسی در این نمونه هاست. این موضوع نشان می دهد که نوزادانی که از طریق جفت و یا از طریق جفت و شیر مادر نیکوتین دریافت کرده اند به نوعی در معرض نقایص تکاملی ریه و بروز آسیب های ریوی هستند که تغییرات کلاژن نوع IV و نکروز بافتی که به عدم تشکیل دیواره های آلوئولی منجر شده است از نشانه های بارز آن محسوب می شود. همچنین در رابطه با کلاژن نوع IV در مطالعات قبلی مشخص شد که شکل گیری و تکامل بسیاری از ارگانهای جنینی به بیان به موقع این مولکول بستگی دارد (١٤، ١٢). از آنجا که یافته های قبلی نقش تعیین کننده این پروتئین را در زمینه روند تکامل تایید می نماید به نظر می رسد که هرگونه عامل تراتوژن که بیان ژن های مربوط به زنجیره های α را در این پروتئین تحت تاثیر قرار دهد خواهد توانست روند طبیعی تمایز را دچار مشکل نماید (۱۷-۱۵). بنابراین طبیعی به نظر می رسد که ساختمان های غشای پایه و همچنین ماده خارج سلولی بافت های مختلف از وجود این پروتئین به خوبی سود می برند و در این میان غشای پایه تنفسی و ماده خارج سلولی پارانشیم ریوی از این قاعده مستثنی نیست (۲۰-۱۸). لذا چنین به نظر می رسد که هر عاملی از قبیل نیکوتین که بتواند بر روند تنظیم کلاژن نوع IV در طی فرایند سیستم تنفسی و یا حتی بعد از آن اثر بگذارد می تواند به نوعی سلامت این ارگان حیاتی را دچار مخاطره نماید.

یافته های این مطالعه نشان داد که در نوزادانی که مادرانشان در معرض دریافت نیکوتین بوده اند روند طبیعی برونکوژنز و تمایز تکامل آلوئول های ریوی تغییر می کند. در این ارتباط گزارش شده است که مادرانی که در طول دوره بارداری در معرض نیکوتین قرار داشته اند اختلالاتی در تکامل آلوئولهای ریوی نوزادان آنها به ثبت رسیده که به کاهش سطح آنزیم لیزیل اکسیداز نسبت داده شده است (۲۲، ۲۱). این یافته ها یاد آور می شود که فعالیت این آنزیم برای شکل گیری اتصالات بین رشته های الاستین و کلاژن امری ضروری است بنا بر این بار دیگر باید بر نتایج مطالعه sekhon و همکاران تاکید کرد که تاثیر نیکوتین در مادران باردار می تواند سلامت سیستم تنفسی فرزندان آنها را تحت تاثیر قرار داده و تغییرات غیرطبیعی در ساختمان مجاری تنفسی آنها پدید آورد که افزایش کلاژن راههای هوایی یکی از عوارض آن به حساب می آید (۱).

در تفسیر این فرایند چنین نتیجه گیری شده است که نیکوتین بر مسیر سیگنال هایی که تمایز لیپوفیبروبلاست موجود در بافت بینابینی را به میوفیبروبلاست ها رهبری می کند تاثیر می گذارد (۲۳).

٥- نتیجه گیری

چنین به نظر می رسد که مداخله نیکوتین از طریق خون (جفت) و شیر مادر بر فرایند تشکیل آلوئول های ریوی زاده های آنان تاثیر می گذارد و تکامل طبیعی ریه و مجاری تنفسی را با مشکل مواجه می نماید.

از سوی دیگر با توجه به اینکه لیپوفیبروبلاست ها از یک طرف در برابر رادیکال های آزاد از نوموسیت ها محافظت نموده و از جهت دیگر زمینه تمایز میوفیبروبلاست ها را فراهم می کنند شاید بتوان گفت که نیکوتین توانسته است علاوه بر تاثیر گذاری و اختلال در تنظیم کلاژن ریوی، تکامل طبیعی فیبروبلاست های دیواره های آلوئولی را با اشکال مواجه نموده و زمینه بروز نقایصی از جمله آنچه را که در یافته های این مطالعه به ثبت رسید فراهم نماید.

www.SID.ir

٦- تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب یک طرح پژوهشی بین دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی زابل صورت گرفته و هزینه های آن توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل تامین گردیده است. لذا بدینوسیله از مساعدت های به عمل آمده در این زمینه تقدیر و تشکر می گردد. همچنین از خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد در آزمایشگاه تخصصی بافت شناسی دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می شود.

References:

1. Sekhon H.S., Proskocil B.J., Clark J.A., Spindel E.R. Prenatal nicotine exposure increases connective tissue expression in foetal monkey pulmonary vessels, Eur. Respir J. 2004, 23: 906-915.
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. 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 L.A., Rubin L.P. 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., Mecham R.P. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. Proc. Am. Thorac. Soc. 2006, 3(5): 428-33.
8. Burgess J.K., Ceresa C., Johnson S.R., Kanabar V., Moir L.M., Nguyen T.T., et al. 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., Wessells N.K. 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 S.H., Schulman S.R., Meliones J.N., Canada A.T., Chen S.C. 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. Nikravesh M.R., Jalali M., Karimfar M.H., Moein A.A., Saeedi Nejat S., Mohammadi S., et al. The role of type IV Collagen in developing eye lens in mouse fetuses, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2009, 12 (3-4): 158-162.
13. Behnam Rasouli M., Nikravesh M.R. The Application of Stereological Methods in a Morphometric and Morphologic Study of Vascularization in Cortical Region of Brain, Scientific Medical Journal of Urmia, 1998, 8(3): 160-170.
14. Karimfar M., Nikravesh M.R., Jalali M., Moein A.A., Rafighdoust H. 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.
15. Jalali M., Nikravesh M.R., Moein A.A., Karimfar M.H., Saeedi Nejat S., Mohammadi S., et al. Inductive role of type IV Collagen in nephrogenesis. Urology Journal of Iran, 2009, 6 (4): 289-294.
16. Moein A.A., Jalali M., Nikravesh M.R., Karimfar M.H., Rafighdoust H.: Study of Expression Type IV Collagen During Mouse Kidney Tubulogenesis in Balb/c Mice . Iranian Journal of Anatomical Sciences, 2008, 6 (24):471-479.
17. Nikravesh M.R., Jalali M., Moein A.A., Karimfar M., Mohammadi S., Rafighdoust H. 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.
18. Hinenoya N., Naito I., Momota R., Sado Y., Kumagishi K., Ninomiya Y., et al. Type IV collagen alpha chains of the basement membrane in the rat bronchioalveolar transitional segment, Arch Histol Cytol, 2008, 71(3): 185-194.
19. West J.B. Comparative physiology of the pulmonary blood-gas barrier, the unique avian solution, Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009, 297(6): 1625-1634.
20. Kang D., Nakayama T., Togashi M., Yamamoto M., Takahashi M., Kunugi S., et al. Two forms of diffuse alveolar damage in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome, Hum Pathol. 2009, 40(11): 1618-1627.
21. Pierce R.A., Nguyen N.M.: Prenatal nicotine exposure and abnormal lung function, Am J Respir Cell Mol Biol. 2002, 26 (1):31-41.
22. Sekhon H.S., Keller J.A., Benowitz N.L., Spindel E.R. Prenatal nicotine exposure alters pulmonary function in newborn rhesus monkeys, Am J Respir Crit Care Med. 2001, 164 (6):989-994.
23. Catassi A., Servent D., Paleari L., Cesario A., Russo P. Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis, Mutat Res. 2008, 659(3): 221-312.

www.SID.ir