

بررسی تغییرات گلیکو پروتئین های سطح سلولی ماکروفاژهای ریه در بیماری های فیروز ریوی

دکتر ابوالفضل برخوردار^{۱*}، پروفیسور جان مک کلور^۲

چکیده

مقدمه: سلول های ماکروفاژ در بیماری های التهابی مزمن ریه از جمله بیماری های فیروتیک ریوی نقش مهمی را در دفاع از سیستم تحتانی تنفس در مقابل ذرات استنشاق شده ایفاء می نمایند. گرچه اهمیت و نقش گلیکوپروتئین ها در فرآیندهای مختلف از جمله تمایز سلولی، چسبندگی سلول ها به یکدیگر و ماده زمینه ای مورد توجه محققین قرار گرفته ولی مطالعات محدودی در رابطه با نحوه ی بیان گلیکوپروتئین های سطح سلول های ماکروفاژ در بیماری های فیروتیک ریوی موجود می باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی گذشته نگر است که نحوه ی تغییر گلیکوپروتئین ها در ۴۰ نمونه بیوپسی ریه طبیعی و افراد مبتلا با استفاده از جامع ترین پانل مارکر لکتین (۲۷ مارکر) و با روش هیستوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: با توجه به نتایج تحقیق علاوه بر تغییر در اندازه ماکروفاژها، تعداد سلول ها نیز در افراد مبتلا افزایش قابل توجهی نشان دادند نتایج نشان داد که تعداد ۱۷ مارکر لکتین در افراد طبیعی با قندهای سطح سلولی باند شدند (I-PHA, e-PHA, LCA, PSA HHA, PTL-II, VVA, SBA) در حالی که بقیه مارکرها (WFA, HPA, MPA, ECA, SNA, MAA, NPA GNA, LEA, PAA, s-WGA, UEA-I, LTA, AHA, BSA-1B4, DBA, AAA) منفی بودند. همچنین سلول های ماکروفاژ در افراد بیمار بر خلاف افراد طبیعی با مارکرهای UEA-I, AAA, PTL-I, AHA, VVA, DBA, SBA باند شدند

نتیجه گیری: نتایج تحقیق بیانگر تغییرات قابل توجهی در گلیکوپروتئین های سطح سلولی ماکروفاژها در افراد مبتلا می باشد به طوری که قندهای آلفا مانوز ۱ و ۳ و ان-استیل لاکتوزامین کاهش و قند آلفا مانوز ۱ و ۲ افزایش نشان دادند از طرفی قندهای بتا گالاکتوز تیپ یک (۳ و ۱)، آلفا گالاکتوز و فیوکوز که در سلول های افراد نرمال غیرقابل دسترس بودند در افراد بیمار به طور قوی بیان شدند بنابراین تغییر در گلیکولیزه شدن سلولی ممکن است یک تغییر فتوتیپی رایج در فیروتیک شدن بافت ریه در بیماری های مزمن محدود کننده ریه محسوب گردد.

واژه های کلیدی: سلول های ماکروفاژ، ریه طبیعی، بیماری های ریوی شغلی، گلیکوپروتئین ها، لکتین هیستوشیمی

مقدمه

شناسایی شدند^(۱). این سلول ها علاوه بر نقش فاگوسیتیک به عنوان سلول های تنظیم کننده و ترشحی نیز محسوب می شوند. این که منشاء سلول های ماکروفاژ مغز استخوان (سلول های مونوسیت) بوده و یا از سلول های ماکروفاژ آلوئولی یا بین بافتی مشتق شده و سپس به فضای مویرگ ها مهاجرت می نمایند کاملاً مشخص نمی باشد ولی نظریه غالب این است که

سلول های بیگانه خوار یا ماکروفاژها بیش از ۱۰۰ سال پیش

*- نویسنده مسئول: استادیار گروه بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت

تلفن: ۰۳۵۱ ۸۲۴۵۴۴۲ - نامبر: ۰۳۵۱ ۸۲۴۵۴۴۶

Email: abc1340@yahoo.co.uk

- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد

۲- استاد گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه منچستر، انگلستان

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۴/۹/۳

افراد طبیعی و مبتلا می باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی و به روش گذشته نگر می باشد. تعداد ۲۰ نمونه بیوپسی ریه طبیعی و ۲۰ نمونه بیوپسی ریه افراد مبتلا به بیماری های فیروتیک ریوی از قسمت آرشیو بیمارستان منچستر انگلستان دریافت گردید پرونده کلیه بیماران مربوط به نمونه های مبتلا بر اساس تشخیص اولیه ثبت شده استخراج شدند. برای تمام نمونه ها پس از مراحل آماده سازی بافت، جهت تأیید تشخیص پاتولوژی قبلی، رنگ آمیزی معمولی **ایوزین-هماتوکسیلین** انجام و کلیه نمونه ها توسط دو پاتولوژیست که هیچگونه اطلاعی از محتوای پرونده و تشخیص اولیه نداشتند مشاهده و مجدداً تأیید شدند. افرادی که از نظر بافت شناسی طبیعی بوده و هیچگونه تظاهرات کلینیکی در رابطه با عوارض ریوی نداشته و همچنین افرادی که به علت بیماری های غیرریوی و یا حادثه فوت نموده بودند و قبلاً نیز هیچگونه سابقه بیماری ریوی نداشتند به عنوان طبیعی تلقی گردیدند. سوابق شغلی بیماران حاکی از تماس آنها با سیلیس و ذرات چوب و زغال سنگ بود این مطالعه با استفاده از روش استاندارد هیستوشیمی و جامع ترین پانل مارکر یعنی ۲۷ لکتین (Biotinylated lectins) از هفت طبقه بندی اصلی قندها بر اساس ویژگی باند شدن (Specificity) آنها انتخاب گردیدند^(۱۷) (جدول ۱).

سلول های مونوسیت منشاء سلول های ماکروفاژ می باشند گرچه تمایز سلول های ماکروفاژ آلوئولی در بعضی مطالعات نیز نشان داده شده است. در شرایط طبیعی سلول های ماکروفاژ به صورت محدود در فضای آلوئولی و در نزدیک سلول های اپی تلیوم موجود بوده و با داشتن تعدادی لیزوزوم، واکوئل و گرانول در داخل سیتوپلاسم قابل شناسایی هستند^(۸-۲) اندازه این سلول ها بین ۴۰-۱۲ میکرون متغیر بوده و ۱۹-۳٪ سلول های آلوئولی را در افراد غیرسیگاری تشکیل می دهند ولی اندازه و تعداد آنها در افراد سیگاری افزایش یافته به طوری که اندازه آنها تا ۵۰ میکرون نیز می رسد. سلول های ماکروفاژ نقش مهمی در دفاع از سیستم تنفسی تحتانی در مقابل میکروارگانیسم ها و ذرات استنشاق شده را داشته و پاکسازی ذرات استنشاق شده در ریه را عهده دار می باشند. بنابر این در بیماری های التهابی ریه از جمله بیماری های شغلی ریوی، ماکروفاژها احتمالاً از طریق تولید رادیکال های آزاد اکسیژن، آنزیم ها و سیتوکین های متعدد مهمترین نقش را ایفا می نمایند. سلول های ماکروفاژ همچنین توانایی جوش خوردن و پیوستن به یکدیگر و تشکیل سلول های غول پیکر (giant cells) را نیز دارند که نمونه بارز آن را می توان در بیماری های سارکوییدوزیس و بریلیوزیس مشاهده نمود^(۱۶-۹) گرچه نقش سلول های ماکروفاژ در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته است ولی نقش گلیکوپروتئین های سطح سلولی در بیماریزایی و ایجاد بیماری های مزمن محدود کننده ریوی مشخص نمی باشد بنابراین هدف از این مطالعه بررسی گلیکوپروتئین های سطح سلول های ماکروفاژ در ریه

جدول ۱: گروه های لکتین مورد استفاده و خصوصیات باند شدن آنها با هیدروکربورها

گروه	ویژگی	لکتین ها
1	α -Mannose and complex N-glycans	GNA, NPA, HHA, ConA, PSA, LCA, IPHA, ePHA
2	Linear and branched oligomers of N-acetylglucosamine: di-N-acetyl chitobiosyl sequences	LEA, PAA, sWGA
3	β -Galactosyl termini	AHA, ECA, MPA
4	α -2-Deoxy,2-acetamido-galactose, in various linkages	HPA, PTL-II, WFA, DBA, VVA, SBA
5	α -Galactosyl	PTL-I, BSA-IB ₄
6	α -N-Acetylneuraminyl (and other sialyl) termini	SNA, MAA
7	α -L-Fucosyl termini	UEA-I, LTA, AAA

جدول ۲: لیست اسامی و شرکت های تأمین کننده مواد و لکتین های مورد استفاده

لیست مواد و لکتین ها	شرکت های تأمین کننده آنها
Industrial methylated spirit (IMS)	Genta Medical, York
Acetone	BDH, Merck Ltd., Lutterworth, Leics
Aminopropyltriethoxysilane (APES)	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Xylene	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Hydrogen peroxide	BDH, Merck Ltd., Lutterworth, Leics
Methanol	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Crude trypsin, type II-S	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Calcium chloride	BDH, Merck Ltd., Lutterworth, Leics
Tris buffered saline (TBS)	Boehringer Mannheim
SNA, MAA	Boehringer Mannheim, Lewes, UK
GNA, NPA, HHA	Vector Laboratories, Peterborough, UK
AAA	EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA, USA
AHA, ECA, WFA, PTL-II, HPA, MPA, DBA, VVA, SBA, PTL-I, LEA, PAA, sWGA, WGA, BSA- IB4, UEA-I, LTA	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Avidin-peroxidase conjugate	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Sodium chloride	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
DAB for lectin staining	Aldrich Chemical Co. Ltd., Poole, Dorset
Methyl green	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset
Xam	Sigma Chemical Co. Ltd, Poole, Dorset

Biotinylated lectins

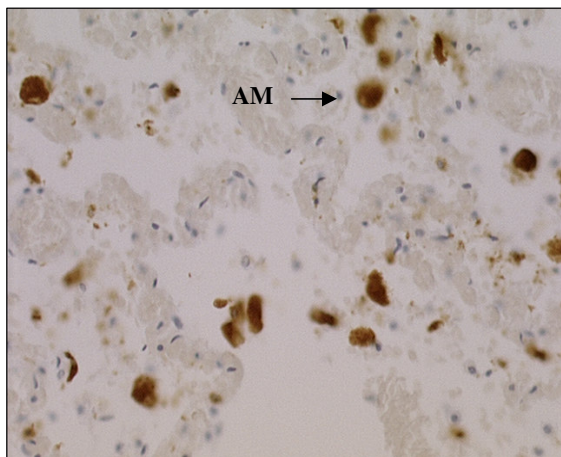
اسلایدها را در آب سرد قرار داده تا فعالیت آنزیمی آن متوقف شود و در ادامه داخل محلول (TBS) (سه مرحله و هر کدام ۵ دقیقه) قرار دادیم. بعد از تمیز کردن اطراف نمونه موجود با پیپت، سه قطره محلول لکتین بیوتینه روی نمونه ها با غلظت ده میکروگرم بر میلی لیتر ریخته و آنها را داخل محفظه مرطوب در حرارت معمولی اتاق قرار می دهیم. در این مرحله فقط محلول TBS روی نمونه های شاهد قرار گرفتند. بعد از ۳۰ دقیقه اسلایدها را بیرون آورده و با محلول TBS و کلرید کلسیم به آرامی شسته و سپس آنها را داخل محلول TBS و کلرید کلسیم (سه مرحله و هر مرحله ۵ دقیقه) قرار می دهیم تا خوب شسته شوند و سپس بر روی هر نمونه چند قطره اویدین پروکسیداز با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر در محلول ۰/۱۲۵ مول TBS ریخته و برای مدت یک ساعت در داخل محفظه مرطوب قرار

در این مطالعه از روش هیستوشیمی پس از بهینه سازی به روش استاندارد به شرح ذیل استفاده گردید^(۱۸،۱۹) نمونه های قالب گیری شده در پارافین جامد توسط میکروتوم به ضخامت پنج میکرون مقطع گیری شده و سپس بر روی لام های از قبل آماده شده (APES-Coated slides) قرار داده شدند^(۲۰) به طوری که پس از قرار دادن اسلایدها در اجاق ۶۰ درجه سانتیگراد و عبور دادن آنها در گزین (سه مرحله) پارافین زدایی انجام و سپس در الکل آبگیری گردیدند. به منظور توقف فعالیت پروکسیداز داخلی نمونه ها در محلول متانول حاوی اسید کلریک و هیدروژن پروکسیداز به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند بعد از شستن مختصر اسلایدها با آب و TBS (Tris Buffered Saline) آنها را داخل محلول (pH=۷/۶ و ۳۷ درجه سانتیگراد) حاوی تریپسین و کلرید کلسیم به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس

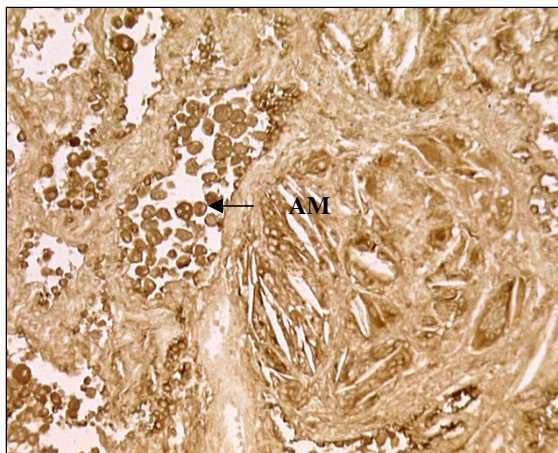
نتایج

یافته های مطالعه نشان دادند که تعداد سلول های ماکروفاژ در ریه افراد طبیعی کم و اندازه آنها کوچک بودند در حالی که در بیماران مبتلا تعداد سلول های ماکروفاژ افزایش یافتند. نمونه های کنترل در هر دو روش لکتین هیستوشیمی و ایمنو هیستوشیمی در همه نمونه ها منفی بودند. به منظور افزایش اعتبار و روایی، ابتدا ده درصد از اسلایدهای مورد پژوهش به روش نمونه گیری تصادفی تعیین و روایی درونی و بیرونی آن مورد بررسی قرار گرفت به منظور تعیین روایی بیرونی ابتدا اسلایدها توسط محقق و سوپروایزر به صورت جداگانه با میکروسکوپ مشاهده و نتایج در جداول جداگانه ثبت گردیدند. نتایج حاصله نشان داد که احتمال توافق و ضریب تصحیح در سطح ۰/۰۱ بین نتایج دو مشاهده گر ۰/۹۵۱ بوده اند بالا بودن ضریب تصحیح بیانگر معنی دار بودن روایی بیرونی می باشد به منظور تعیین میزان روایی درونی اسلایدهای انتخاب شده کدگذاری و در سه زمان متفاوت و به فاصله یک ماه از هم توسط پژوهشگر مشاهده و نتایج در جدول ثبت شدند. پس از مقایسه نتایج با استفاده از تست آماری ضریب همبستگی میزان روایی درونی بسیار بالا بود به طوری که ضریب تصحیح بین دفعه اول و دوم برابر با ۰/۹۶۵، بین دفعه اول و سوم ۰/۹۷۴ و بین دفعه دوم و سوم ۰/۹۸۴ بودند. نتایج نشان دادند که نوع و میزان قند موجود بر روی سطح

می دهیم و بعد از آن اسلایدها را به آرامی با TBS شسته و آنها در محلول TBS (سه مرحله و هر مرحله ۵ دقیقه) عبور داده شدند. در ادامه اسلایدها را در محلول DAB (۲۸۰ میلی لیتر TBS و ۲۰ میلی لیتر DAB و ۴۵ میکرولیتر هیدروژن پروکسیداز) برای مدت ۵ دقیقه قرار تا رنگ مربوطه به صورت قهوه ای متمایز گردد. به منظور افتراق هسته سلول با سیتوپلاسم اسلایدها را با آب شسته و آنها را داخل محلول متیل گزین (۳۰ ثانیه) قرار داده و پس از شستن مجدد با آب آنها را به منظور آبگیری داخل الکل در سه مرحله (الکل ۷۰ درجه و دو مرحله الکل مطلق) قرار داده شدند و در نهایت آنها را از محلول گزین عبور داده تا الکل آن شسته و جذب گردد. مقطع رنگ شده بافت موجود بر روی لام به وسیله ماده ای به نام XAM پوشانده و بر روی آن لامل قرار میدهم. اسلایدهای آماده شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Leit 2 Dalun 20 EB) مشاهده و شدت باند شدن لکتین به صورت ۱ (ضعیف)، ۲ (متوسط)، ۳ (قوی) و ۴ (بسیار قوی) و ۰ (منفی) رتبه بندی گردید. گرچه شکل، اندازه و محل سلول های ماکروفاژ مشخص و قابل افتراق با سایر سلول های موجود در فضای آلوئولی می باشد ولی به منظور تشخیص قطعی آنها از مارکر اختصاصی CD-68 استفاده گردید. شمارش سلول های ماکروفاژ با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم افزار کامپیوتری و حداقل در ده میدان انجام گردید میانگین تعداد سلول ها توسط کامپیوتر محاسبه می گردید.



شکل ۱: فرد مبتلا به فیروز ریه



شکل ۲: ماکروفاژهای ریه در فرد طبیعی

مشخص شده است^(۱۷). بنابراین در این مطالعه برای اولین بار تغییرات گلیکان های سطح سلولی ماکروفاژهای ریه انسان در حالت بیماری با استفاده از روش هیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت به علت تنوع قندهای موجود در سطح سلوم لازم است تا از طیف جامع و وسیع مارکرهای مربوطه جهت شناسایی قندهای گوناگون استفاده گردد. باتوجه به نتایج تحقیق، سلول های ماکروفاژ در ریه نرمال حاوی قند مانوز و قندهای انتهایی غیرکاهنده (non-reducing) به ویژه آلفا ۱ و ۳، ان - استیل لاکتوزامین و ان - استیل چیتوبیوز، بتاگالاکتوز به ویژه زنجیره تیپ دو (بتا ۱ و ۴)، ان - استیل گالاکتوزامین و سیالیک اسید می باشند در حالی که سایر قندها از جمله تیپ یک بتا گالاکتوز (بتا ۱ و ۳)، آلفا گالاکتوز، ان - استیل گلوکوزامین و فیوکوز غیرقابل دسترس بودند. اختلاف در شدت رنگ حاصله از باند شدن قندها با لکتین های گروه مانوز بیانگر حضور انواع مختلف ساختمان با باندان (N-linked) می باشد در افراد مبتلا به بیماری های شغلی علاوه بر تغییر در اندازه ماکروفاژها، تعداد سلول ها نیز افزایش قابل توجهی نشان دادند. نتایج تحقیق همچنین بیانگر تغییرات قابل توجهی در گلیکان های سطح سلولی می باشد به نحوی که بعضی از قندها در حالت پاتولوژیک کاهش و بعضاً ناپدید شده و یا غیرقابل دسترسی بودند و برعکس بعضی از قندها در حالت بیماری ظاهر شدند به طوری که قندهای آلفا مانوز ۱ و ۳ و ان - استیل لاکتوزامین کاهش و قند آلفا مانوز ۱ و ۲ افزایش نشان دادند از طرفی قندهای بتاگالاکتوز تیپ یک (۳ و ۱)، آلفا گالاکتوز و فیوکوز که در سلول های افراد نرمال غیرقابل دسترس بودند در افراد بیمار به طور قوی بیان شدند بنابراین تغییر در گلیکولیزه شدن سلولی ممکن است یک تغییر فتوتیپی رایج در فیبروتیک شدن بافت ریه در بیماری های مزمن محدود کننده ریه محسوب گردد لذا مطالعه بعدی در تعیین و شناسایی ژن های مؤثر در این فرآیند می تواند نقش مهمی را در پیشگیری و ایجاد بیماری های مزمن محدود کننده ریه از جمله بیماری های شغلی ریوی ایفا نماید.

سلول های ماکروفاژ در افراد مختلف مشابه بودند به عبارتی گلیکان های موجود در کلیه افراد طبیعی، تابلوی مشابهی داشتند. از طرفی باند شدن قندهای موجود با اکثر لکتین ها بیانگر حضور طیف وسیعی از گلیکان ها در سطح سلول های ماکروفاژ می باشند در افراد طبیعی از ۲۷ مارکر مورد استفاده ۱۷ مارکر مثبت و ۱۰ مارکر دیگر منفی بودند. به طوری که کلیه لکتین های طبقه اول یعنی LCA, ConA, L-PHA, e-PHA, PSA, HHA, NPA, GNA و طبقه دوم (LEA, PAA, S- WGA) طبقه پنجم (SNA, MAA) مثبت بودند در حالی که لکتین های طبقه ششم (BSA-1B4, PTL-I) و طبقه هفتم (LTA, UEA-I, AAA) همگی منفی بودند. در طبقه سوم AHA منفی ولی ECA مثبت بود. همچنین در طبقه پنجم WFA, HPA, MPA مثبت و سایر لکتین ها یعنی PTL-II, VVA, SBA, DBA منفی بودند. سلول های ماکروفاژ در افراد بیمار بر خلاف افراد طبیعی با مارکرهای UEA-I, AAA, PTL-I, AHA, VVA, DBA

بحث و نتیجه گیری

بررسی گلیکوپروتئین های سطح سلولی و تغییرات آنها در بیماری های ریوی و نقش آنها در بیماریزایی از اهمیت خاصی برخوردار است. اخیراً اهمیت و نقش گلیکوپروتئین ها در فرآیندهای مختلف از جمله تمایز سلولی، چسبندگی سلول ها به یکدیگر و ماده زمینه ای مورد توجه محققین قرار گرفته است لذا با توجه به این مهم و بررسی نحوه بیان گلیکوپروتئین های سطح سلول های ماکروفاژ در بیماری های شغلی ریوی از ضرورت بالایی برخوردار است. به منظور تعیین نحوه تغییر گلیکان های سطح سلول های ماکروفاژ در بیماری های فیبروتیک ریه، ابتدا ضروری است تا نحوه توزیع گلیکان ها را در افراد طبیعی تعیین و مشخص نمود تا دید وسیع و جامعی از ساختار گلیکان های ریه را در حالت پاتولوژیک بیماری به دست آورد. توزیع گلیکان ها در وضعیت طبیعی در مطالعه ای

References

1. du Bois RM: *The alveolar macrophage*. Thorax, 1985; 40:321-327.
2. Adamson IY, Bowden DH: *Adaptive responses of the pulmonary macrophagic system to carbon*. II. Morphologic studies. Lab Invest, 1978; 38: 430-438.
3. Hasleton PS: *The anatomy of lung. Spencer's Pathology of the Lung*. New York, London, McGraw Hill, 1996: 1-44.
4. Junqueira LC, Carneiro J, Long J A.: *Basic Histology*. London, Prentice-Hall, 1996: 1-530.
5. Bowden DH, Adamson IY: *Adaptive responses of the pulmonary macrophagic system to carbon*. I. Kinetic studies. Lab Invest, 1978; 38: 422-429.
6. Bowden, D. H. *The alveolar macrophage. Environ. Health Perspect.* 1984; 55, 3-341-27.
7. Robinsons SL: *Basic Pathology. Edited by Robinsons SL*. London, Philadelphia, Saunders 1997.
8. Thomas ED, Ramberg RE, Sale GE, Sparkes RS, Golde DW: *Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man*. Science, 1976; 192: 1016-1018.
9. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER: *Cell number and cell characteristics of the normal human lung*. Am Rev Respir Dis, 1982; 126:332-337.
10. Crapo, J. D. BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER: *Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs*. Am. Rev. Respir. Dis. 1983, 128 (2 Pt 2), S42-S46.
11. Danel C, Dewar A, Corrin B, Turner-Warwick M, Chretien J: *Ultrastructural changes in bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis and comparison with the tissue granuloma*. Am J Pathol, 1983; 112: 7-17.
12. Weibel ER, *The cell population of the normal lung*. 3-16. In: Lung Cells in Disease. Edited by Bouhuys A, Amsterdam, North-Holland, 1984.
13. Hunninghake GW, *The human alveolar macrophage*. Methods Cell Biol 1980; 21A: 95-105.
14. Chambers, T. J.; Spector, W.G.- *Inflammatory giant cells*.- Immunobiology 1982; Apr; 161(3-4): 283-9.
15. Chejfec, G. Candel A, Jansson D.S, Warren W.H, Koukoulis G.K, Gould JE et al. *Immunohistochemical features of giant cell carcinoma of the lung: patterns of expression of cytokeratins, vimentin, and the mucinous glycoprotein recognized by monoclonal antibody A-80*. Ultrastruct. Pathol. 1991, 15 (2), 131-138.
16. Prezant, D. J. Dhala A, Goldstein A, Janus D, Ortiz F, Aldrich, TK, et al. *The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters*. Chest 1999, 116 (5), 1183-1193.
17. Barkhordari A, Stoddart RW, McClure SF, McClure J: *Lectin histochemistry of normal human lung*. J Mol Histology 2004, 35, 147-156.
18. Jones, C. J.; Stoddart, R. W. *A post-embedding avidin-biotin peroxidase system to demonstrate the light and electron microscopic localization of lectin binding sites in rat kidney tubules*. Histochem. J. 1986, 18 (7), 371-379.
19. Jones, C. J. et al.. *Elimination of the non-specific binding of avidin to tissue sections*. Histochem. J. 1987, 19 (5), 264-268.
20. Maddox, D. E.; Shibata, S.; Goldstein, I. J. *Stimulated macrophages express a new glycoprotein receptor reactive with Griffonia simplicifolia I-B4 isolectin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1982, 79 (1): 166-170