

نقش اختصاصی و زمان بروز قند انتهایی α -L-Fucose در تکامل جنینی کلیه موش

مختار جعفرپور (Ph.D.) * علیرضا نظری (M.Sc.) **

چکیده

سابقه و هدف: نقش قندهای انتهایی زنجیره‌های گلیکوکونژوگه به عنوان عوامل القایی در تکامل بافت‌های جنینی مشخص شده است. هدف این مطالعه، ردیابی قند انتهایی α -L-Fucose با روش لکتین بافتی- شیمیایی، تعیین زمان بروز و روشن کردن نقش اختصاصی آن در تکامل کلیه موش بود.

مواد و روش‌ها: جنین‌های موش‌های باردار از نژاد Balb/c در روزهای مختلف بارداری طی مراحل طی فرمالین تثبیت شدند. پس از آنگیری با روش‌های معمول بافت‌شناسی با استفاده از پارافین، قالب‌گیری انجام شد. از بلوک‌های به دست آمده با روش برش متوالی، برش‌های ده میکرونی تهیه شد. لکتین LTA (Lotus Tetragonolobus) به عنوان ردیاب ویژه قند انتهایی α -L-Fucose با غلظت استاندارد تهیه شد و برش‌هایی را که قابلیت استفاده آن‌ها قبلاً با رنگ‌آمیزی آلسین بلو مشخص شده بود، در معرض آن قرار داده شد. غلظت ۱۰ میکروگرم لکتین در یک میلی‌لیتر PBS (Phosphate Buffered Saline)، توسط شرکت فروشنده به عنوان غلظت استاندارد توصیه شده است. در خاتمه از آلسین بلو به عنوان رنگ زمینه استفاده شد. مقاطع پس از آماده شدن با میکروسکوپ نوری همزمان توسط چند نفر و به صورت منفی مورد بررسی قرار گرفته و ضمن تبادل یافته‌ها، شدت واکنش‌ها درجه‌بندی شد.

یافته‌ها: در نمونه‌های قبل از روز پانزدهم جنینی هیچ واکنشی با لکتین LTA دیده نشد و شروع واکنش در روز پانزدهم مشاهده شد. در روزهای بعدی، شدت واکنش و وسعت آن افزایش یافته و این پدیده در روزهای ۱۹ و ۲۰ جنینی به حداکثر رسید. جالب‌ترین نکته این بود که واکنش عمدتاً در لوله‌های ادراری مشاهده شد و بقیه بافت کلیه توسط رنگ زمینه مشخص می‌شد.

استنتاج: در این مطالعه مشخص شد که قند انتهایی α -L-Fucose در روز پانزدهم جنینی در لوله‌های ادراری کلیه موش بروز کرده و در روزهای بعدی افزایش می‌یابد؛ به نحوی که در روزهای آخر جنینی به حد اکثر میزان خود می‌رسد. لذا به نظر می‌رسد که قند مذکور نقش کلیدی را در تکامل لوله‌های ادراری ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: لکتین LTA، قند انتهایی α -L-Fucose، لوله‌های ادراری، تکامل جنینی

مقدمه

شکل‌گیری با تمایزات و تغییرات گوناگون و پیچیده سلولی با نظم بسیار دقیق همراه بوده و در این میان، میان

درک وقایع مولکولی در مراحل حساس اندام‌زایی جنینی از مسائل مهم زیست‌شناسی تکوینی است. دوران

✉ مشهد: خیابان دانشگاه - دانشکده پزشکی

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** مربی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ تصویب: ۸۳/۸/۱۳

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۳/۴/۲۷

تاریخ دریافت: ۸۳/۱/۲۲

از عوامل فیزیکی و شیمیایی (تشعشعات، داروها و غیره ...) بروز انواع ناهنجاری در جنین را شاهد بوده‌اند (۱۰، ۹). با نگاه اجمالی به تحقیقات فوق، دامنه وسیعی از زمینه‌های تحقیقاتی پدیدار می‌گردد که مبنای آن‌ها شناسایی قندهای انتهایی موثر در تکامل اعضا می‌باشد. فقدان برخی از این قندها که می‌تواند زمینه ژنتیکی داشته و یا به علل فیزیکی- شیمیایی ایجاد شود، می‌تواند از بعد ایجاد ناهنجاری‌های عضوی مورد تحقیق قرار گیرد.

در این مطالعه با توجه به ناهنجاری‌های فراوان تکاملی در کلیه، برخی عوامل القایی تکامل در مرحله اول تحقیق، شناسایی شده و در مراحل بعدی، در حد امکان با حذف عوامل القایی شناخته شده، احتمال ایجاد ناهنجاری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

موش‌های آزمایشگاهی دو ماهه با وزن تقریبی ۳۰-۳۵ گرم از نژاد Balb/c به تعداد ۱۲ سر ماده و ۴ سر نر با مشخصات و شرایط مشابه انتخاب شدند. این حیوانات در مؤسسه سرم‌سازی رازی مشهد نگهداری می‌شدند. شرایط زیستی حیوانات از نظر تغذیه، دمای اتاق، رطوبت و میزان نور و تاریکی به صورت مشابه مهیا شد. هر حیوان نر به همراه ۳ حیوان ماده در یک قفس قرار داده شد. مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. حیوانات آزمایشگاهی باردار به ترتیب از روز نهم تا روز بیستم بارداری با کلروفرم بی‌هوش شده و ضمن عمل لاپاراتومی، جنین‌ها از رحم مادران خارج شدند. کشتن موش‌ها از روز نهم بارداری آغاز شده و در هر روز یک موش باردار قربانی شد. در روز نهم بارداری از یازده جنین به دست آمده یک مورد ظاهر غیرطبیعی داشته و از مسیر مطالعه حذف شد. در روز یازدهم بارداری نیز از ۱۲ مورد جنین به دست آمده، یک مورد غیر طبیعی بود. در روز هیجدهم، ۹

کنش‌های سلولی و عوامل القایی نقش تعیین‌کننده دارند. برخی از این عوامل القایی، ترکیبات قندی هستند که در اعمال میان کنش‌های سلولی نقش حساسی دارند.

قندهای انتهایی زنجیره‌های گلیکوکونژوگه، مولکول‌های زیست‌شناختی هستند که تقریباً در تمام بافت‌های جنینی، نقش کلیدی در تکامل ایفا می‌کنند. این قندها پس از ساخته شدن در سلول‌های در حال تکامل جنین، بسته به نوع سلول‌های مذکور، مدتی فعال بوده و سپس با پوشیده شدن به وسیله اسید سیالیک، تغییر شکل فضایی و یا تغییر نحوه اتصال با قند ما قبل آخر، فعالیت زیست‌شناختی خود را از دست می‌دهند (۲، ۱). برای ردیابی و شناسایی قندهای انتهایی، در سال‌های اخیر ردیاب‌هایی تهیه شده‌اند که عمدتاً ماهیت گیاهی داشته و لکتین نامیده شده‌اند. لکتین‌های ویژه هر کدام از این قندها، قادر به ردیابی آن قند هستند. لازم به ذکر است که هر قند انتهایی در زمان بروز، فقط گروه سلولی خاصی از عضو مربوطه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در هر مرحله تکاملی یک عضو، ممکن است یک یا چند قند انتهایی ظاهر شده و هر کدام، گروه سلولی ویژه‌ای را تحت تاثیر خود قرار دهند (۴، ۳).

با استفاده از روش‌های لکتین بافتی- شیمیایی و ایمنی- بافتی- شیمیایی، تاکنون مطالعات زیادی در زمینه شناسایی آثار القایی قندهای انتهایی در تکامل جنینی اعضا منجمله کلیه صورت گرفته است. توسط گروهی از محققین نقش موثر و مثبت قند دی- گالاکتوز در تکامل سلول‌های اینترکاله در کلیه با استفاده از روش‌های فوق مورد تحقیق و تایید قرار گرفته است (۵ تا ۷). در تحقیق دیگری اثر القایی قند انتهایی گالاکتوز- ان- استیل گالاکتوز آمین در تکامل لوله‌های جمع‌کننده ادراری، به ویژه در رشد طولی آن‌ها مشخص شده است (۸). در بررسی‌های دیگری با استفاده از حذف و یا تغییر برخی قندهای انتهایی موثر در تکامل اعضای جنینی، با استفاده

مورد جنین از رحم موش باردار خارج شد. موش‌های باردار که در بقیه روزهای بارداری قربانی شدند، هر کدام ۱۰ مورد جنین در رحم خود داشتند. کل جنین‌های به دست آمده ۱۲۲ مورد بودند که ۱۲۰ مورد از آن‌ها در مسیر مطالعه قرار گرفتند. جنین‌ها به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین شست‌و‌شو داده شده و سپس به مدت ۲ روز در فیکساتیو فرمالین قرار داده شدند. حذف جنین‌های با ظاهر غیرطبیعی که توضیح داده شد، قبل از قرار دادن جنین‌ها در فیکساتیو صورت گرفت. براین مبنای دو مورد جنین به صورت توده‌های سلولی بی‌شکل از مسیر مطالعه خارج شدند. بعد از خروج از فیکساتیو، جنین‌ها به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین شست‌و‌شو داده شده و سپس توسط غلظت‌های مختلف الکل مراحل آبگیری انجام شد و در حالی که جنین‌ها به پشت خوابانیده شده بودند، قالب‌گیری با پارافین صورت گرفت.

برای تهیه برش از ناحیه کلیه جنین‌ها، برش‌های متوالی متعدد انجام شده و با استفاده از آلسین بلو، محل برش شناسایی و با رسیدن به ناحیه کلیه ۱۰ برش اول حذف شده و سپس برش‌های بعدی برای رنگ‌آمیزی تهیه شدند. از هر کدام از بلوک‌های به دست آمده برش‌هایی به ضخامت ۱۰ میکرون با روش فوق تهیه شده و تعداد سه برش از هر جنین با آلسین بلو جهت بررسی کیفیت بافت رنگ‌آمیزی شد. قبل از این مرحله برش‌هایی با ضخامت‌های مختلف از ۵ تا ۲۰ میکرون تهیه شده و پس از رنگ‌آمیزی با آلسین بلو، برش ۱۰ میکرونی، با توجه به کیفیت بهتر برای انجام مطالعه انتخاب شد. در گام بعدی و در ادامه برش‌های مربوط به آلسین بلو تعداد ۳ برش از هر جنین جهت بررسی لکتین بافتی- شیمیایی انتخاب شدند. لکتین LTA کوزوگه شده با HRP که از شرکت سیگما خریداری شده بود، به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بافر PBS رقیق شد. استفاده از لکتین در pH=6.8 صورت گرفت.

قبل از اضافه کردن محلول لکتین به برش‌ها، این برش‌ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه در متانول حاوی ۱ درصد آب اکسیژنه جهت خنثی کردن پراکسیداز درون‌زا (endogenous peroxidase) قرار داده شدند. سپس در یک اتافک مرطوب، محلول لکتین که قبلاً آماده شده بود، به صورت قطره قطره روی بافت‌ها چکانده شد. محلول لکتین به مدت ۲ ساعت روی بافت‌ها قرار داشت. در گام بعدی تمام برش‌ها با PBS شست و شو داده شده و سپس در محلول ۰.۳٪ DAB (diaminobenzidin) که در PBS حل شده بود، به مدت ده دقیقه قرار داده شد و به آن به میزان ۲۰ میکرو لیتر در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر، آب اکسیژنه اضافه گردید.

بعد از خارج کردن برش‌ها از محلول فوق، به مدت ۱۰ دقیقه با جریان ملایم آب معمولی شست و شو داده شدند. سپس جهت رنگ‌آمیزی زمینه بافت‌ها به مدت ۵ دقیقه در آلسین بلو (pH=2.5) قرار داده شد.

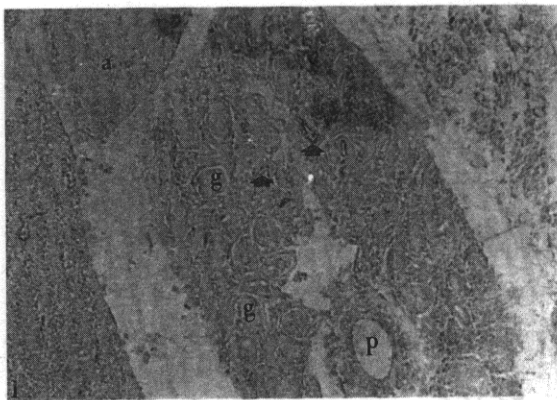
در صورت وجود قند انتهایی مورد نظر در هر قسمت از بافت، واکنش آن با لکتین آزمایش می‌شد و رنگ قهوه‌ای بروز می‌کرد. و بقیه بخش‌های بافت شامل هسته سلول‌ها و ماده خارج سلولی با توجه به میزان کم کربوهیدرات‌ها با آلسین بلو در pH=2.5 واکنش داده و به رنگ آبی در می‌آمدند. کلیه برش‌های فوق با میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفتند. شدت واکنش با همکاری سه نفر به صورت مخفی تعیین و با مقیاس ۱+ تا ۵+ ثبت گردید.

عدم واکنش صفر، واکنش خیلی کم ۱+، کم ۲+، متوسط ۳+، شدید ۴+ و خیلی شدید ۵+ در نظر گرفته شد. با توجه به درجه‌بندی شدت رنگ که ذکر گردید، با استفاده از آزمون ضریب همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن تحلیل آماری انجام شد.

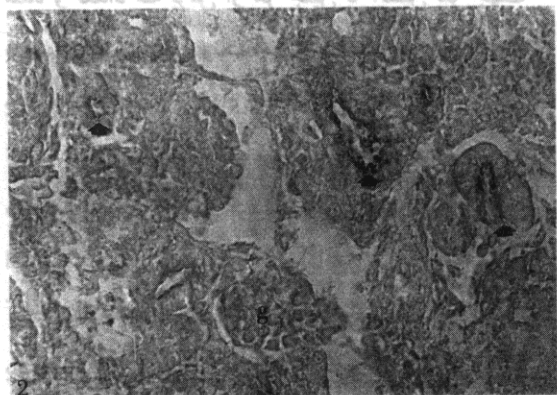
از موارد انتخابی با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار الیمپوس AH2 تصویر برداری انجام شد.

یافته‌ها

گلوومرول‌ها واکنشی به لکتین مورد آزمایش نشان نداده و با رنگ زمینه آبی مشخص شدند (تصاویر شماره ۳ و ۴). آزمون ضریب همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن، به دلیل عدم تفاوت در شدت رنگ برش‌ها در هر گروه جنینی (روزهای ۱۴-۹، ۱۸-۱۵ و ۲۰-۱۹)، نشان داد که بین روزهای جنینی و شدت رنگ که نماینده میزان ظهور قند انتهایی α -L-Fucose است، همبستگی شدید وجود دارد ($R=0.98$).



تصویر شماره ۱: کلیه جنین پانزده روزه موش، غده فوق کلیوی = a، گلوومرول = g، لگنچه کلیه = p، لوله ادراری = فلش، لکتین استفاده شده LTA درشتنمایی 10×10 .



تصویر شماره ۲: بخشی از تصویر شماره یک با درشت نمایی بالاتر، گلوومرول = g، لوله ادراری = فلش، درشت نمایی 10×40 .

در روزهای ۱۴-۹ جنینی واکنش یافت کلیه به لکتین LTA، چه در ناحیه قاعده‌ای و چه در سطح مجرای لوله‌های ادراری، صفر بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: واکنش یافت کلیه به لکتین LTA.

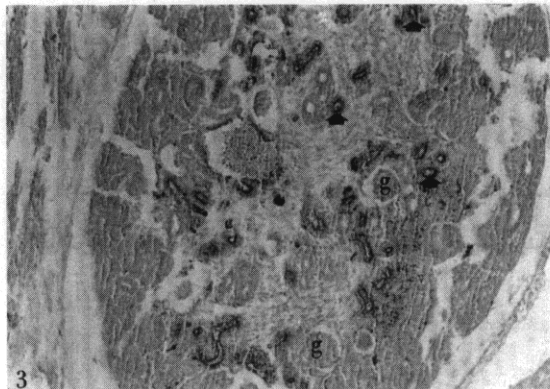
روز جنینی	تعداد جنین‌ها	تعداد برش‌ها	شدت رنگ ناحیه قاعده‌ای لوله‌ها	شدت رنگ ناحیه مجرای لوله‌ها
نهمم	۱۰	۳۰	صفر	صفر
دهم	۱۰	۳۰	صفر	صفر
یازدهم	۱۱	۳۳	صفر	صفر
دوازدهم	۱۰	۳۰	صفر	صفر
سیزدهم	۱۰	۳۰	صفر	صفر
چهاردهم	۱۰	۳۰	صفر	صفر
پانزدهم	۱۰	۳۰	متوسط ۳+	شدید ۴+
شانزدهم	۱۰	۳۰	متوسط ۳+	شدید ۴+
هفدهم	۱۰	۳۰	متوسط ۳+	شدید ۴+
هجدهم	۹	۲۷	متوسط ۳+	شدید ۴+
نوزدهم	۱۰	۳۰	شدید ۴+	خیلی شدید ۵+
بیستم	۱۰	۳۰	شدید ۴+	خیلی شدید ۵+

در روزهای ۱۴-۹ جنینی واکنش لکتین LTA با لوله‌های ادراری در کلیه مشاهده شد. شدت واکنش که به صورت رنگ قهوه‌ای DAB ظاهر شده بود، در سطح مجرای لوله‌های ادراری بیش‌تر از بقیه بخش‌های آن بود. این شدت در سطح مجرای شدید (۴+) و در بقیه بخش‌های لوله متوسط (۳+) بود (تصاویر ۱ و ۲). در این روزها گلوومرول‌های کلیوی هیچ واکنشی با لکتین آزمایش شده نشان ندادند. این بخش‌های کلیه جنین فقط با رنگ زمینه آلسین بلو مشخص شدند (تصویر شماره ۱). در روزهای ۲۰-۱۹ جنینی واکنش لوله‌های ادراری به لکتین LTA نسبت به روزهای ۱۸-۱۵ افزایش یافت (جدول شماره ۱). در این روزها شدت واکنش در سطح مجرای خیلی شدید (۵+) بوده و در بقیه قسمت‌های لوله‌های ادراری در مقیاس (۴+) مشاهده شد (تصاویر شماره ۳ و ۴). در این روزها نیز همانند روزهای قبل،

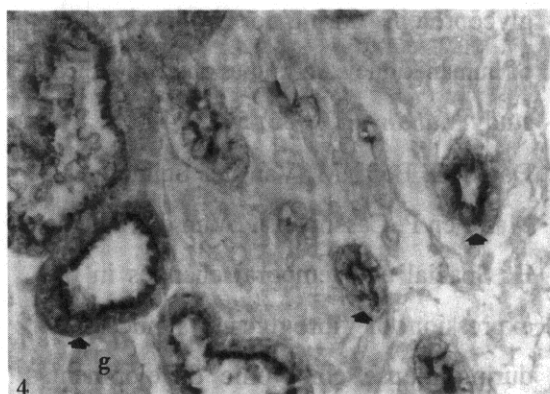
در مطالعات قبلی روشن شده است که در هر مرحله از تکامل جنینی، در یک عضو خاصی از بدن جنین، قند یا قندهای انتهایی خاصی، نقش القایی در روند تکامل را ایفا می‌کنند. ممکن است یک قند انتهایی فقط بخش کوچکی از یک عضو را تحت تاثیرات القایی خود قرار دهد (۱۱، ۵، ۳).

از مقایسه مطالعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که تا قبل از روز پانزدهم جنینی قند α -L-Fucose که با لکتین LTA واکنش نشان می‌دهد، نقشی در تکامل کلیه جنین موش ندارد. بروز قند انتهایی فوق در روز پانزدهم نشان می‌دهد که از این روز و در این مرحله از تکامل کلیه، ایفای نقش کلیدی خود را در تکامل آغاز کرده است. بروز این قند در لوله‌های ادراری نشان دهنده این است که قند مذکور فقط در تکامل لوله‌های ادراری نقش دارد. این موضوع با نتایج تحقیقات دیگران که گفته شده یک قند انتهایی گاهی فقط بر بخش کوچکی از یک عضو اثر دارد، مطابقت دارد (۱۲، ۵).

قندهای انتهایی در داخل سلول‌های در حال تکامل، ساخته شده و به سمت غشاء سلول حرکت می‌کنند. بخش بزرگی از این قندها گلیکوکالیکس سلول‌ها را تشکیل می‌دهند (۱۳ تا ۱۵). یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که درونی‌ترین بخش لوله‌های ادراری با شدت بیشتری به لکتین LTA واکنش داده‌اند که نشانه وجود مقدار بیشتری قند انتهایی مربوطه در گلیکوکالیکس سلول‌های ادراری است. این یافته با اطلاعات داده شده در بالا مطابقت دارد. افزایش شدت واکنش در روزهای بالاتر که حداکثر آن در روزهای نوزدهم و بیستم جنینی دیده شد، نیز با یافته‌های قبلی مطابقت دارد. یعنی با توجه به این که قند انتهایی فوق مورد نیاز در تکامل بافتی می‌باشد، مرتباً ساخته شده و میزان آن در سلول‌ها افزایش می‌یابد. در این مطالعه گلومرول‌ها در هیچ یک از روزهای جنینی مورد بررسی به لکتین LTA واکنش ندادند. این



تصویر شماره ۳: کلیه جنین ۱۹ روزه موش، گلومرول = g، لوله ادراری = فلش، لکتین استفاده شده LTA، درشت نمایی 10×10



تصویر شماره ۴: بخشی از تصویر ۳ با درشت‌نمایی بالاتر، گلومرول = g، لوله ادراری = فلش، درشت نمایی 40×10

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که قند انتهایی α -L-Fucose در روزهای ۱۴-۹ جنینی در بافت کلیه موش به صورت آشکار وجود ندارد. این یافته را عدم واکنش بافت جنینی کلیه با لکتین LTA که مخصوص قند فوق است، نشان می‌دهد. این نکته قابل ذکر است که وجود هر قند انتهایی در یک بافت جنینی به صورت غیر آشکار، مثلاً به صورت پوشیده شده با اسیدسالیسیک، به معنی نداشتن فعالیت در آن موقعیت است (۲، ۱).

براساس یافته‌های این تحقیق تصور می‌شود که قند انتهایی α -L-Fucose از روز پانزدهم جنینی نقش کلیدی خود را در تکامل لوله‌های ادراری آغاز می‌کند و این روند تا پایان دوره جنینی ادامه دارد. این تحقیق، یافته‌های دیگران را که بیان کرده‌اند، در صورت اختلال در متابولیسم قندها ناهنجاری‌های مادرزادی در سیستم لوله‌های ادراری پدید می‌آید، قابل درک نموده است (۹، ۱۰).

بدان معنی است که قند انتهایی α -L-Fucose نقشی در تکامل گلومرول‌ها ندارد. در یافته‌های دیگران مشخص شده که هر بخش از یک بافت ممکن است تحت تاثیر یک قند انتهایی خاص تکامل پیدا کند (۱۳، ۱۶، ۱۷). بنابراین یافته‌های این مطالعه در مورد گلومرول‌ها با یافته‌های دیگران مطابقت دارد، به این معنی که گلومرول‌ها تحت تاثیر قند انتهایی دیگری تکامل پیدا می‌کنند.

فهرست منابع

1. Mounier F, Foidart JM, Gubler MC. Distribution of extracellular matrix glycoproteins during normal development of human kidney. An immunohistochemical study. *Lab Invest*. 1986; 54: 394-401.
2. David G, Bai XM, Van der Schueren B, Marynen P, Cassiman JJ, Van der Berghe H. Spacial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development. *Development*. 1993; 119: 841-854.
3. Laitinen L, Virtanen I, Saxen L. Changes in the glycosylation pattern during embryonic development of mouse kidney as revealed with lectin conjugation. *J Histochem Cytochem*. 1987 Jan; 35(1): 55-65.
4. Kispert A, Vainio S, Shen L, Rowitch DH, McMahon AP. Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development*. 1996; 122: 3627-3637.
5. Brown D, Roth J, Orci L. Lectin-gold cytochemistry reveals intercalated cell heterogeneity along rat kidney collecting ducts. *Am J Physiol*. 1985 Mar; 248(3 pt 1): C348-56.
6. Minuth WW, Rudolph U. Successive lectin-binding changes within the collecting duct during post-natal development of the rabbit kidney. *Pediatr Nephrol*. 1990 Sep; 4(5): 505-9.
7. Holthofer H, Schult BA, Pasternack G, Siegel GJ, Spicer SS. Three distinct cell populations in rat kidney collecting duct. *Am J Physiol*. 1987 Aug; 253(2 Pt): C323-8.
8. Karl Schumacher, Raimund Strehl, Uwe de Vries, Hermann Josef Groenet, Will W. Minuth. SBA-Positive Fibers between the CD Ampulla, Mesenchyme, and Renal Capsule. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 2446-2453.
9. Woolf AS, Winyard PJD. Advances in the cell biology and genetics of human kidney malformations. *J Am Soc Nephrol*. 1998; 9: 1114-25.

10. Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996; 382: 76-79.
11. Bullock SL, Johnson TM, Bao Q, Hughes RC, Winyard PD, Woolf AS. Galectin-3 modulates ureteric bud branching in organ culture of the developing mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 515-523.
12. Pohl M, Sakurai H, Stuart RO, Nigam SK. Role of hyaluronan and CD44 in invitro branching morphogenesis of ureteric bud cells. *Dev Biol*. 2000; 224: 312-325.
13. Holtbofer H, Schulte BA, Spicer SS. Heterogeneity of apical glycoconjugates in kidney collecting ducts: further studies using simultaneous detection of lectin binding sites and immunocytochemical detection of key transport enzymes. *Histochem J*. 1988 Sep; 20(9): 471-7.
14. Saunders S, Paine-Saunders S, Lander AD. Expression of the cell surface proteoglycan Glypican-5 is developmentally regulated in kidney, limb, and brain. *Develop Biol*. 1997; 190: 78-93.
15. Holtbofer H. Cell type-specific glycoconjugates of collecting duct cells during maturation of the rat kidney. *Cell Tissue Res*. 1988 Aug; 253(2): 305-9.
16. Vainio S, Lehtonen E, Jalkanen M, Bernfield M, Saxen L. Epithelial-mesenchyme interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, in the developing kidney. *Dev Biol*. 1989; 134: 382-391.
17. Vainio S, Lehtonen E, Jalkanen M, Bernfield M, Saxen L. Epithelial-mesenchymal interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the developing kidney. *Dev Biol*. 1989; 134: 382-391.