

## **Study of Expression Type IV Collagen During Mouse Kidney Tubulogenesis in Balb/c Mouse**

**Moeen A.A., Ph.D., Jalali M., Ph.D., , Nikravesh M.R., Ph.D.\* , Karimfar M.H.  
Rafighdoost H., Ph.D. Saeedi Nejat Sh., M.D.**

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

### **Abstract**

**Purpose:** In this study specific antibody have been used for tracing type IV collagen basement membrane during renal tubules morphogenesis in mouse fetuses.

**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 sacrificed 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:** Based on our data, Collagen IV showed weak reaction on day 14 of gestation in tubular BM. The amount of collagen increased continuously until next days of fetal life and primary of 5 days postnatal in BM. After this period, collagen IV reaction was not showed significant change in newborns.

**Conclusion:** These results indicate that developmental changes in various nephron segments from most immature stages to most differentiated structures are dependent to the type IV collagen expression.

**Key words:** Collagen IV, Tubulogenesis, Kidney, Mouse.

## مطالعه بیان کلاژن نوع IV طی شکل‌گیری توپول‌های کلیوی موش balb/c

عباسعلی معین Ph.D.\*، مهدی جلالی Ph.D.\*\*، محمد رضا نیکروش Ph.D.\*\*، محمد حسن کریمفر Ph.D.\*  
هوشنگ رفیقدوست Ph.D.\*\*، شهین سعیدی نجات M.D.\*\*

\*گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران  
\*\*گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران  
\*\*\*گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران  
تاریخ وصول: خردادماه ۸۷، تاریخ پذیرش: مردادماه ۸۷

### چکیده

**هدف:** بررسی استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی برای ردیابی کلاژن نوع IV و تغییرات آن در شکل‌گیری توپول‌های کلیوی جنین موش **مواد و روش‌ها:** این مطالعه به روش تجربی انجام شد. برای این منظور ۲۰ موش ماده نژاد Balb/C به‌طور تصادفی انتخاب شده و پس از مراقبت در شرایط استاندارد و جفت‌گیری، وجود پلاگ 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 شدند تا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و ردیابی کلاژن نوع IV در غشای پایه، مورفوژنز توپول‌های کلیوی در دوران جنینی موش مورد ارزیابی قرار گیرد. 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:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ظهور کلاژن در غشای پایه توپول‌های کلیوی از روز چهاردهم جنینی با واکنش ضعیف ظاهر شده و در روزهای بعد افزایش یافته و شدت آن تا روز پنجم پس از تولد ادامه می‌یابد اما پس از آن تغییری پیدا نمی‌کند.

**نتیجه‌گیری:** الگوی نحوه توزیع کلاژن IV نشان‌دهنده این موضوع است که تنظیم فعالیت‌ها و پیشروی شاخه‌های جوانه‌حالی به درون مزانشیم در گروه تغییرات اولیه ماده خارج سلولی در زمان شکل‌گیری توپول‌هاست. نتایج حاصل بر این موضوع دلالت دارد که شکل‌گیری بخش‌های مختلف نفرون‌ها و تبدیل ساختار نابالغ آن به نفرون‌های بالغ به ظهور کلاژن نوع IV وابسته است.

**کلیدواژه‌ها:** کلاژن نوع IV، شکل‌گیری توپولی، کلیه، موش.

### مقدمه

بافت‌های موجودات زنده نشان داده و مشخص شده است که تنوع آن‌ها به دلیل تفاوت در ماهیت پلی‌پپتیدهای تشکیل

یافته‌های مختلف تا کنون انواع مختلفی از کلاژن را در

✉ آدرس مکاتبه: ایران، مشهد، میدان آزادی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

E mail: Nikravesh@hotmail.com

جمع‌کننده ادراری پیدا می‌کنند [۹]. مطالعات نشان داده است که فیبروبلاست‌ها مسئول سازنده اسیدهای آمینه‌ای هستند که منجر به تشکیل مولکول‌های پیش‌ساز کلاژن (Procollagen) می‌شوند. این مولکول‌ها تحت اثر آنزیم پروکلاژن پپتیداز به تروپوکلاژن تبدیل می‌شوند و تروپوکلاژن پلیمریزه شده کلاژن را می‌سازد و به کمک اسید هیالورونیک که از انواع ماده زمینه بی‌شکل است از پراکنده شدن الیاف آن جلوگیری می‌کند تا در غشای پایه رسوب داده شود [۱۰]. از آنجا که در زمان شکل‌گیری توبول‌های کلیوی ماده خارج سلولی و به تبع آن غشای پایه توبولی در شکل‌گیری بخش‌های مختلف نفرون‌ها بی‌تاثیر نیست، در این مطالعه سعی شده است تا طی روند شکل‌گیری نفرون‌ها و تبدیل ساختار آنها به نفرون‌های بالغ نحوه ظهور کلاژن نوع IV در غشای پایه این بخش از ساختار کلیه مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

با انتخاب تصادفی ۲۰ موش باکره نژاد Balb/c و تعیین روز صفر بارداری در آنان در هریک از روزهای ۱۳ تا ۱۸ بارداری، روزانه ۲ موش با استفاده از کلروفورم مورد بیهوشی قرار گرفته و پس از قطع نخاع و سزارین، جنین‌های مربوط به آنان جمع‌آوری و مطابق روش‌های معمول بافت‌شناسی تثبیت و آماده‌سازی بافتی انجام شد. مشابه این عمل برای نوزادان موش‌های باقیمانده در هر یک از روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پس از تولد به انجام رسید. بدین ترتیب که در هر یک از روزهای یاد شده کلیه‌های نوزادان متعلق به ۲ موش مطابق روش‌های یاد شده آماده سازی شدند.

سرانجام از همه نمونه‌های جنینی و نوزادی بلوک‌های پارافینی و برش‌هایی با ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی و آبدهی برش‌هایی که از ناحیه کلیه‌ها در جنین‌ها و نوزادان به دست آمده به میزان دو بار و هر بار به

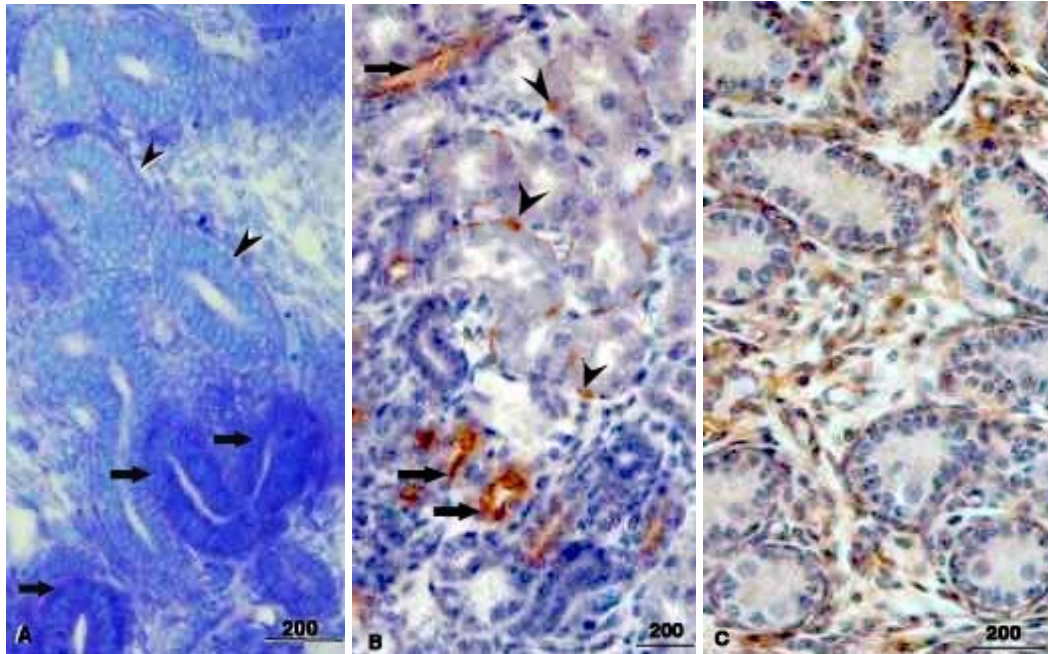
دهنده آن‌هاست [۱]. از کنار هم قرار گرفتن مولکول‌های مارپیچ کلاژن، رشته‌های کلاژن به وجود می‌آیند [۲]. نحوه قرار گرفتن مارپیچ‌ها طوری است که انتهای مولکول‌های مجاور روی هم قرار می‌گیرند. این نحوه قرارگیری باعث می‌شود که رشته‌های کلاژن قابلیت کشش زیادی داشته باشند و استحکام لازم را به ساختمان‌های موجود زنده به دنبال داشته باشند [۳]. برخلاف سایر کلاژن‌ها که ساختار رشته‌ای (فیبریل) یا رتیکولر دارند، کلاژن نوع IV دارای ساختمان غیرپلیمری است و جزء ساختار اصلی غشاهای پایه محسوب می‌شود [۴]. اگرچه پروتئین‌های دیگری از قبیل لامینین و فیبرونکتین نیز در تشکیل غشای پایه نقشی سازنده ایفا می‌نمایند اما کلاژن نوع IV به عنوان فراوانترین ترکیب غشای پایه اپیتلیالی یا اندوتلیالی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است زیرا این ماده می‌تواند داربستی را به وجود آورد که بقیه اجزای غشای پایه روی آن ساخته می‌شوند [۵]. برای شکل‌گیری توبول‌های کلیوی لازم است که انشعابات جوانه‌حالی به داخل پارانشیم متانفریک نفوذ نموده و پس از انشعابات پی در پی به تشکیل لوله‌های جمع‌کننده ادراری منجر شود [۶]. در این مرحله که در حدود روز یازدهم جنینی موش و معادل هفته پنجم جنینی انسان محسوب می‌شود [۷]. مطالعات جنین‌شناسی نشان می‌دهد که بخش انتهایی لوله‌های جمع‌کننده باعث القای سلول‌های مزانشیمی متانفریک شده و در روز سیزدهم جنینی موش به لوله‌های متانفریک تبدیل می‌شوند [۸]. در این مرحله به موازات اینکه بخش دیستال توبول‌های کلیوی در حال شکل‌گیری و کامل شدن هستند انتهای پروگزیمال آنها توسط گلوامرول‌های تمایز یافته انواژینه می‌شود. با اتصال بخش دیستال و پروگزیمال است که تکامل بخش‌های متعدد یک نفرون شامل کورپوسکول‌های کلیوی، لوله‌های در هم پیچیده پروگزیمال، قوس هنله و لوله‌های در هم پیچیده دیستال شکل گرفته و ارتباط خود را به لوله‌های

درجه بندی شد.

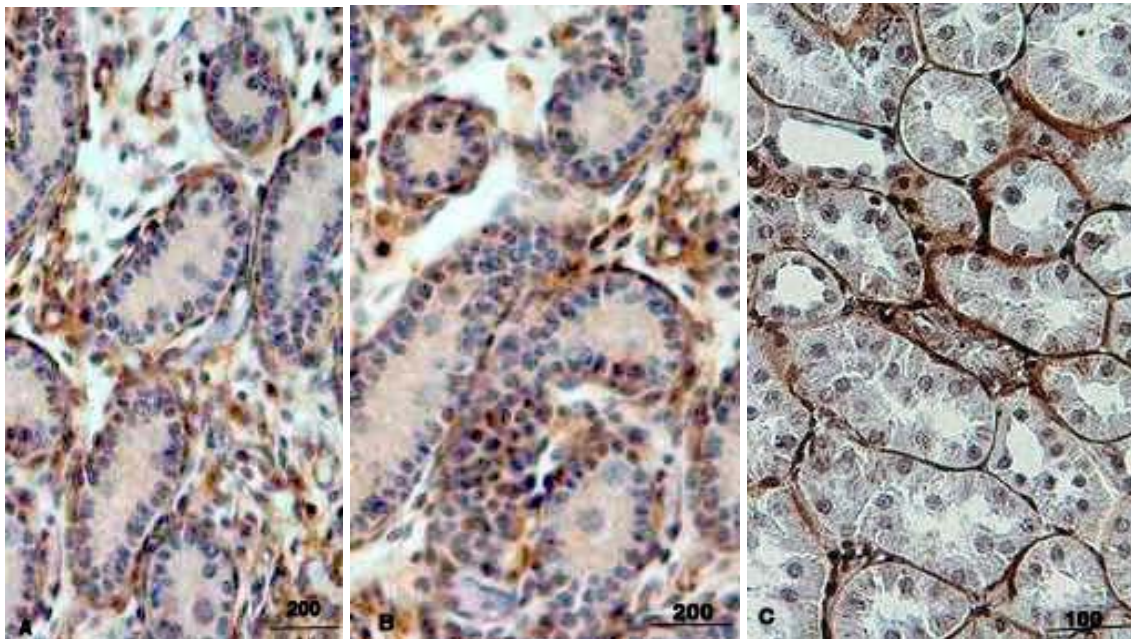
### یافته‌ها

بررسی‌های به عمل آمده نشان داد که در روز سیزدهم جنینی، سلول‌های مزانشیمی سازنده کلیه اطراف جوانه حالب ساز را گرفته و شکل ساده‌ای از توبول‌های اولیه با رنگ زمینه مشخص شده است اما از کلاژن غشای پایه مربوط به آن‌ها بر اساس واکنش آنتی‌کلاژن اثری دیده نمی‌شود (شکل ۱A). در روز چهاردهم جنینی اولین واکنش‌ها در کلاژن غشای پایه بخش دیستال توبول‌های کلیوی و مقاطع عروقی پارانشیم کلیه بروز نموده اما هنوز از واکنش کلاژن در غشای پایه کلافه‌های گلوبولاری اثری دیده نمی‌شود (شکل ۱B). در روز پانزدهم جنینی شدت واکنش‌ها افزایش یافته و علاوه بر غشای پایه نواحی دیستال، واکنش‌های ضعیفی در غشای پایه نواحی پروگزیمال توبول‌ها و همچنین نواحی قشری گلوبول‌ها به صورت پراکنده بروز نمود و علائم ظهور کلاژن در این نواحی به مقدار اندک به ثبت رسید (شکل ۱C). در روز شانزدهم بر مقدار این واکنش‌ها افزوده شد به طوری که غشای پایه بخش‌های مختلف توبول‌ها با رنگ‌پذیری کلاژن متمایز شد (شکل ۲A). مطالعات مربوط به روزهای بعد نیز نشان داد که بر شدت واکنش‌ها تا روز هجدهم افزوده شده و رنگ‌پذیری غشای پایه سلول‌های اپیتلیالی نه تنها نسبت به روزهای قبل افزایش یافته بلکه در اپیتلیوم عروقی داخل کلافه‌ها نیز این افزایش به خوبی ظهور پیدا نموده است (شکل ۲B). بررسی‌های مربوط به دوران پس از تولد نشان می‌دهد که واکنش غشای پایه توبول‌ها تا روز پنجم نسبت به دوران جنینی شدت بیشتری یافته (شکل ۲C) اما در روزهای بعد از آن از نظر شدت واکنش کلاژن نوع IV در غشای پایه توبولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

مدت ۵ دقیقه در بافر تریس (حاوی ۱/۵٪ کلرور سدیم در pH = ۷/۴) شستشو داده شد. برای بلوک کردن آنتی ژن‌های غیراختصاصی، ابتدا برای مدت ۳ ساعت، برش‌ها در مجاورت تریتون X100 ۳ / ۰ درصد در بافر تریس 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 پس از آن برای مدت ۲۴ ساعت با آنتی‌بادی کلاژن IV (کانزوگه شده با Horse radish peroxidase) با رقت ۱ به ۵۰ مجاورت یافته و سپس مجدداً در محلول تریس بافر 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-آمینوبنزدین (Di-aminobenzidine) حاوی ۰/۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شده و در آخرین مرحله پس از شستشوی نمونه‌ها برای ایجاد رنگ زمینه از همتوکسیلین استفاده شد. برش‌هایی که بدین ترتیب آماده مطالعه شدند با استفاده از ژل گلیسرول تثبیت شدند. با این روش رنگ آمیزی، کلاژن مورد نظر بر اساس میزان پیدایش، به آنتی‌کلاژن واکنش مثبت نشان داده و برحسب میزان کلاژن از قهوه‌ای روشن تا تیره ظهور یافت. به اعتبار اینکه واکنش به رنگ‌پذیری کلاژن نوع IV که با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال شاخص مناسبی در تعیین تراکم این نوع کلاژن محسوب می‌شود، درجهٔ رنگ‌پذیری بر اساس روش درجه‌بندی Firth [۱۵] به عنوان معیار تراکم کلاژن مد نظر قرار گرفت. در خاتمه، نتایج مبتنی بر مطالعات میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار Olympus از مناطق مورد نظر عکس‌های دیجیتال تهیه و فایل مربوط به آن ذخیره شد. پس از مطالعه عکس‌ها در نواحی کلافه‌های گلوبولاری و ارزیابی غشای پایه در این نواحی شدت رنگ‌پذیری با روشی که توضیح داده شد به صورت دو نفره و جدای از یکدیگر



شکل ۱. نماهای A، B و C به ترتیب مقطعی از توبول‌های کلیوی را در روزهای سیزدهم تا پانزدهم جنینی نشان می‌دهد. در شکل A هیچ‌گونه واکنشی نسبت به رنگ‌پذیری کلاژن دیده نمی‌شود (در این تصویر پیکان‌های دوشاخه بخش‌های دیستال توبول‌های کلیوی را نشان می‌دهد و پیکان‌های دنباله‌دار به لوله‌های جمع‌کننده اشاره دارد). در شکل B اولین واکنش‌های غشای پایه بخش‌های دیستال توبول‌های کلیوی (پیکان‌های دوشاخه) و به صورت شدیدتر در مقاطع عروقی (پیکان‌های دنباله‌دار) در روز چهاردهم به چشم می‌خورد. در شکل C واکنش به صورت همگن درآمده و علاوه بر مناطق غشای پایه این رنگ‌پذیری در ماده خارج سلولی نیز قابل ردیابی است.



شکل ۲. نماهای A، B و C به ترتیب مقطعی از توبول‌های کلیوی را در روزهای شانزدهم و هجدهم جنینی و روز پنجم پس از تولد نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصاویر A و B نشان داده شده است، به موازات تکامل توبول‌های کلیوی بر واکنش غشای پایه نیز افزوده شده و در شکل C این واکنش از قهوه‌ای روشن به قهوه‌ای تیره تغییر یافته و به بالاترین حد خود رسیده است.

## بمٹ

پیدایش کلاژن نوع IV در زمان شکل‌گیری توبول‌های کلیوی و افزایش تراکم آن در غشای پایه تا مراحل نهایی تکامل توبول‌ها بیانگر این موضوع است که آرایش سلولی مربوط به این بخش از ساختار کلیه در گروهی بیان مولکول‌های خاصی است که کلاژن نوع IV در این میان از اهمیت به‌سزایی برخوردار است [۱۴-۱۱]. غشای پایه نواحی تخصص یافته‌ای از ماده خارج سلولی (Extra cellular matrix) است که حاوی ترکیبات مختلفی از قبیل پروتئین‌ها و قندها هستند. این ماده معمولاً از ترکیباتی از قبیل انواع رشته‌های کلاژن شامل کلاژن نوع IV، V، لامینین، فیبرونکتین و گلیکوزآمینوگلیکان‌های سولفاته و غیرسولفاته تشکیل می‌شود [۱۷-۱۵]. ر بین ترکیبات غشای پایه، کلاژن جزء فراوان‌ترین ترکیبات موجود است و از این میان کلاژن نوع IV ساختار اصلی این بخش را ایجاد می‌نماید.

تغییر در ساختار ماتریکس خارج سلولی به سهم خود به میانکنش‌هایی می‌انجامد که در وهله اول به سنتز پروتئوگلیکان‌هایی منجر می‌شود که زمینه تولید انواع کلاژن را فراهم می‌آورد [۱۸ و ۱۹]. براساس مطالعات انجام شده، هر چند که انواع کلاژن در نقاط مختلف بدن دارای پراکندگی وسیعی هستند اما کلاژن نوع IV را فقط می‌توان در نواحی خاصی از قبیل غشای پایه مربوط به جدار عروق، لوله گوارش، توبول‌های کلیوی و بافت مزانژیال کلافه‌های گلوبمرولی جستجو کرد [۲۰]. از سوی دیگر اگرچه تفکیک و تمایز کلاژن نوع IV از بقیه اجزای غشای پایه در مطالعات معمول بافت‌شناسی وجود ندارد اما با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی که در این پژوهش صورت گرفت، واکنش کلاژن نسبت به رنگ‌پذیری در غشای پایه توبول‌های کلیوی از زمانی آغاز می‌شود که ساختار نفرون‌ها شکل می‌گیرد. این موضوع تأیید کننده این واقعیت است که میانکنش‌های سلولی

تشکیل دهنده ساختار توبولی در کلیه به القای سلول‌ها در راستای سنتز کلاژن کمک می‌نماید تا بستر مناسبی برای غشای پایه اپیتلیالی در آن‌ها پدیدار شود [۲۱]. ظهور کلاژن نوع IV در غشای پایه بخش دیستال و سپس در بخش پروگزیمال و کلافه‌های گلوبمرولی بر این موضوع نیز دلالت دارد که این نوع پروتئین خاص علاوه بر آنکه نقش داریست ساختمان غشای پایه توبول‌ها را بر عهده می‌گیرد، وظایف دیگری نیز بر عهده خواهد گرفت. در این رابطه می‌توان به تکامل توبول‌های کلیوی و عملکرد آنها در امر فیلتراسیون گلوبمرولی اشاره کرد که غشای پایه توبول‌ها و کلافه‌های گلوبمرولی نقش مهمی در تبادل مواد بازی می‌کنند و این امر در گروهی ساختار خاص غشای پایه است [۲۲]. حضور الیاف کلاژن به عنوان اصلی‌ترین شبکه ساختاری بخش میانی غشای پایه که تحت عنوان تیغه متراکم (Lamina densa) نامیده می‌شود سبب می‌شود که عملکرد کلیه در فیلتراسیون و تبادل مواد بین توبول‌ها و مویرگ‌های مجاور، تضمین شود [۲۳]. سلامت غشای پایه و شکل‌پذیری طبیعی آن به نفرون‌ها این اجازه را خواهد داد که در جذب انتخابی مولکول‌ها مانند یک صافی دقیق عمل نمایند [۲۴]. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که چنانچه کلاژن نوع IV به‌عنوان یکی از مهمترین عناصر ساختاری غشای پایه توبول‌های کلیوی دستخوش تغییر شود، نقص عمده‌ای در ساختار و عمل کلیه‌ها پدیدار خواهد شد که می‌تواند سلامت موجود زنده را به‌صورت جدی تهدید نماید. این تصور از آنجا ناشی می‌شود که در بعضی از بیماری‌ها تغییرات کلاژن به ضخیم شدن غشای پایه انجامیده و به کلیه‌ها آسیب جدی وارد می‌شود [۲۵ و ۲۶]. موضوع دیگر اینکه با شکل‌گیری و تکامل نهایی توبول‌ها میزان کلاژن غشای پایه موجود در آنها نیز باید در یک حد اپتیموم محدود شود و از آن تجاوز نکند. بررسی‌های مربوط به این پژوهش نشان داد که از روز پنجم پس از تولد تغییری در تراکم کلاژن

و روند تکامل ساختمان و عمل توبول‌ها منوط به شکل‌گیری بستر مناسبی است که اجزای سازنده غشای پایه و از جمله کلاژن نوع IV تضمین کننده آن است. براساس این واقعیت شاید بتوان گفت زمانی که پس از تولد، نفرون‌ها به تکامل نهایی خود رسید تراکم کلاژن نوع IV که طی روند شکل‌گیری گلومرول‌های کلیوی بسیار حائز اهمیت است، از این مرحله به بعد ثابت باقی می‌ماند و در روزهای بعد تغییری نمی‌کند.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب یک طرح پژوهشی بین دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی زابل صورت گرفته و هزینه‌های آن توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه زابل تأمین شده است. بنابراین بدینوسیله از مساعدت‌های به‌عمل آمده در این زمینه از هر دو معاونت این دانشگاه‌ها تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از خدمات تکنیکی سرکارخانم متجدد در آزمایشگاه هیستوتکنیک دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می‌شود.

### References

1. **Bergijk EC, Van Alderwegen IE, Baelde HJ, de Heer E, Funabiki K, Miyai H, et al.** Differential expression of collagen IV isoforms in experimental glomerulosclerosis. *J Pathol* 1998; 184(3): 307-15.
2. **Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, et al.** Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 2004; 131: 1619-28.
3. **Lauer-Fields JL, Minond D, Brew K, Fields GB.** Application of topologically constrained mini-proteins as ligands, substrates, and inhibitors. *Method Mol Biol* 2007; 386: 125-66.
4. **Hasegawa H, Naito I, Nakano K, Momota R, Nishida K, Taguchi T, et al.** The distributions of type IV collagen alpha chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Arch Histol Cytol* 2007; 70(4): 255-65.
5. **Sund M, Maeshima Y, Kalluri R.** Bifunctional promoter of type IV collagen COL4A5 and COL4A6 genes regulates the expression of alpha5 and alpha6 chains in a distinct cell-specific fashion. *Biochem J* 2005; 387(3): 755-61.
6. **Bernstein J, Cheng F, Roszka J.** Glomerular differentiation in metanephric culture. *Lab Invest* 1981; 45(2): 183-90.

غشای پایه پدید نمی‌آید. این موضوع شاید به این معنی است که تراکم بیش از حد کلاژن می‌تواند به ضخیم شدن غشاء و کاهش عملکرد توبول‌ها و در نتیجه به کم‌کاری کلیه‌ها منجر شود [۲۷]. به‌عنوان مثال تغییرات بافتی مربوط به افزایش سن یا پدید آمدن محیط هایپرگلیسمیک در بیماری دیابت که به واکنش غشای پایه و افزایش ضخامت آن می‌انجامد به اعتبار افزایش تراکم کلاژن نوع IV و سایر عناصر غشای پایه عملکرد کلیه را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۸]. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که آرایش اپیتلیوم سازنده توبول‌های کلیوی در مرحله اول و عملکرد صحیح نفرون‌ها در وهله دوم در گروهی شکل‌گیری بستر مناسبی است که در ارتباط با پیدایش غشای پایه آنها سنتز شده‌اند.

در این میان کلاژن نوع IV به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ساختارهای غشای پایه تحت تاثیر مکانیسم‌های القایی شروع به سنتز نموده و در محدوده ساختمان‌های پیش‌ساز توبول‌های اولیه ذخیره می‌شود. اولین علائم ظهور کلاژن غشای پایه توبولی در روز چهاردهم جنینی و افزایش آن در خلال روزهای پس از آن بر این موضوع دلالت دارد که شکل‌گیری

7. **Hill MA.** Mouse development stages. UNSW embryology. 2008; ISBN: 978-0-7334-2609-4.
8. **Masayo Y, Akihito, Toshimi M, Masahiro N, Keiichi O.** Hydroxylases Involved in Vitamin D Metabolism Are Differentially Expressed in Murine Embryonic Kidney: Application of Whole Mount in Situ Hybridization. *Endocrinology* 2001; 142(7): 3223-30.
9. **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. 1999; *Cell* 99: 377-86.
10. **Favor J, Gloeckner CJ, Janik D, Klempt M, Neuhauser-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.
11. **LinksGubler MC.** Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008, 4(1): 24-37.
12. **LinksBerkholtz 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.
13. **Links Wu ZZ, Li P, Huang QP, Qin J, Xiao GH, Cai SX.** Inhibition of adhesion of hepatocellular carcinoma cells to basement membrane components by receptor competition with RGD- or YIGSR-containing synthetic peptides. *Biorheology* 2003, 40(4): 489-502.
14. **LinksGuinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M.** "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993; 374(12): 1135-46.
15. **LinksDavid L, Nesland JM, Holm R, Sobrinho-Simões M.** Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 1994; 73(3): 518-27.
16. **LinksDe Rosa G, Barra E, Guarino M, Staibano S, Donofrio V, Boscaino A.** Fibronectin, laminin, type IV collagen distribution, and myofibroblastic stromal reaction in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 1994;16(3): 258-67.
17. **Nakano K, Naito I, Momota R, Sado Y, Hasegawa H, Ninomiya Y, et al.** The distribution of type IV collagen alpha chains in the mouse ovary and its correlation with follicular development. *Arch Histol Cytol* 2007; 70(4): 243-53.
18. **Merjava S, Liskova P, Jirsova K.** Immunohistochemical characterization of collagen IV in control corneas and in corneas obtained from patients suffering from posterior polymorphous corneal dystrophy. *Ophthalmology* 2008; 64(3): 115-19.
19. **Sato H, Naito I, Momota R, Naomoto Y, Yamatsuji T, Sado Y, et al.** The differential distribution of type IV collagen alpha chains in the subepithelial basement membrane of the human alimentary canal. *Arch Histol Cytol.* 2007; 70(5): 313-23.
20. **Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG.** **Mammalian collagen IV.** *Microsc Res Tech* 2008; 71(5): 357-70.
21. **Hartman HA, Lai HL, Patterson LT.** Cessation of renal morphogenesis in mice. *Dev Biol* 2007; 310(2): 379-87.
22. **LinksCarone FA, Butkowski RJ, Nakamura S, Polenakovic M, Kanwar YS.** Tubular basement membrane changes during induction and regression of drug-induced polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1994; 46(5): 1368-74.
23. **Monaghan P, Warburton MJ, N Perusinghe, Rudland PS.** Topographical rearrangement of



- basement membrane proteins in lactating rat mammary gland: comparison of the distribution of type IV collagen, laminin, fibronectin, and Thy-1 at the ultrastructural level. *PNAS*. 1983; 80 (11): 3344 - 8.
24. **LinksSasaki H, Kishiye T, Fujioka A, Shinoda K, Nagano M.** Effects of extracellular matrix macromolecules on the differentiation of plasma membrane structure in cultured astrocytes. *Cell Struct Funct* 1996, 21(2): 133-41.
25. **Miner JH, Sanes JR.** Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol* 1996; 135(5): 1403-13.
26. **Carlson EC, Audette JL, Veitenheimer NJ, Risan JA, Iaturnus DI, Epstein PN:** Ultrastructural morphometry of capillary basement membrane thickness in normal and transgenic diabetic mice. *Anat Rec* 2003; 271(2): 332-41.
27. **Schäfer K, Bader M, Gretz N, Oberbäumer I, Bachmann S.** Focal overexpression of collagen IV characterizes the initiation of epithelial changes in polycystic kidney disease. *Exp Nephrol* 1994, 2(3): 190-5.
28. **Abrass CK, Spicer D, Raugi GJ.** Induction of nodular sclerosis by insulin in rat mesangial cells in vitro: studies of collagen. *Kidney Int* 1995, 47(1): 25-37.
29. **Zent R, Yan X, Su Y, Hudson BG, Borza DB, Moeckel GW, et al.** Glomerular injury is exacerbated in diabetic integrin alpha1-null mice. *Kidney Int* 2006, 70(3): 460-70.
30. **Nicoloff G, Baydanoff S, Petrova Ch, Christova P.** Serum antibodies to collagen type IV and development of diabetic vascular complications in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. A longitudinal study. *Vascul Pharmacol* 2002, 38(3):143-7.