

مطالعه‌ی لکتین هیستوشیمیایی قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها طی تکامل کلیه در رت

علیرضا ابراهیم زاده بیدسکان¹ - فاطمه نیک مرد² - الهام محمد زاده² - هنگامه رضوی³ - علیرضا فاضل⁴

چکیده

زمینه و هدف: فرآیند‌های تکاملی توسط واکنش‌های متقابل سلول به سلول و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی میان‌جیگری می‌شود. از طرفی این میان‌کنش‌ها توسط مولکول‌های شیمیایی تنظیم می‌شود. در این راستا مطالعه حاضر به منظور بررسی توزیع و تغییرات برخی از ترکیبات قندی طی تکامل کلیه در رت انجام گرفت.

روش تحقیق: تعداد 30 سر جنین رت نژاد ویستار در روزهای 14، 16 و 18 حاملگی در فرمالین فیکس و پس از پاساژ بافتی، در پارافین قالب‌گیری، و برش‌هایی به ضخامت 5 میکرون تهیه و در مجاورت با لکتین‌های LTA، MPA و UEA-I که با HRP کونژوگه شده بودند قرار گرفتند. سپس شدت رنگ مقاطع میکروسکوپی برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی به روش کور تعیین، رتبه بندی و با استفاده از روش‌های آماری باهم مقایسه شدند و از نمونه‌های مورد نظر تصویر تهیه گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که واکنش لکتین MPA با پودوسیت‌ها به تدریج با پیشرفت تکامل از روز 14 تا 18 افزایش یافت ($p < 0/05$). سلول‌های مزانشیمی در کلیه‌های در حال تکامل در روزهای 14 و 16 واکنش نشان دادند در حالیکه در روز 18 واکنشی مشاهده نشد ($p < 0/05$). واکنش متوسطی در مجاری جمع‌کننده ادرار در روز 16 مشاهده گردید. واکنش لکتین UEA-I با سلول‌های مزانشیمی در روزهای 14 و 16 متوسط و در روز 18 کم ارزیابی گردید ($p < 0/05$). در حالیکه واکنش پودوسیت‌ها در روز 16 متوسط و در روز 18 واکنش مذکور کاهش یافت ($p < 0/05$). لوله‌های جمع‌کننده در روز 16 واکنش ضعیفی را نشان دادند. واکنش لکتین LTA با لوله‌های پیچیده دور و نزدیک و مجاری جمع‌کننده در روز 18 ضعیف ارزیابی گردید. پودوسیت‌ها در هیچ یک از مراحل تکاملی مورد بررسی واکنشی را با لکتین مذکور بروز ندادند و سلول‌های مزانشیمی در روز 14 واکنش متوسطی را بروز دادند که این واکنش در روزهای 16 و 18 ناپدید گردید.

نتیجه‌گیری: طبق یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که بیان و تغییرات گلیکوکونژوگیت‌ها با قند‌های انتهایی $L\text{-fuc}(\alpha 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$ ، $\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 3)\text{-GalNAc}$ و $\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{Glc}$ طی تکامل کلیه تنظیم شده است.

کلید واژه‌ها: تکامل؛ جنین؛ کلیه؛ گلیکوکونژوگیت‌ها؛ لکتین

افق دانش؛ فصلنامه‌ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره‌ی 18؛ شماره‌ی 1؛ بهار 1391)

پذیرش: 1390/3/4

اصلاح نهایی: 1390/2/25

دریافت: 1389/10/23

1- نویسنده‌ی مسؤول؛ دانشیار، گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آدرس: مشهد مقدس - میدان آزادی - دانشکده‌ی پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی

تلفن: 0511-8002242 شماره: 0511-8002333 پست الکترونیکی: ebrahimzadehba@mums.ac.ir

2- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته‌ی علوم تشریحی، گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

3- استادیار، گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

4- استاد، گروه آموزشی علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

کلیه‌های دائمی یا متانفروز سومین عضو ادراری هستند که در جریان تکامل جنینی بوجود می‌آیند بطوریکه واحد‌های ترشحاتی آن از مزودرم متانفریک بوجود می‌آیند در حالیکه مجاری جمع‌کننده ادرار در کلیه‌های دائمی از جوانه‌حالبی که یک برآمدگی از مجرای مزونفریک در نزدیکی مدخل کلوک است ایجاد می‌گردند. جوانه‌حالبی به مزودرم متانفریک نفوذ می‌نماید و آنرا در جهت تمایز به بخش‌های ترشحاتی نفرون‌ها متعهد می‌سازد. در حالیکه جوانه‌حالبی در جهت بخش‌های هدایتی کلیه تمایز می‌یابد (2,1).

سپس جوانه‌حالبی متسع شده و لگنچه کلیوی اولیه، کالیس‌های اصلی، کالیس‌های کوچک، مجاری و توبول‌های جمع‌کننده کلیوی را تشکیل می‌دهد. توبول‌های جمع‌کننده در انتهای دیستال خود بوسیله بافت متانفریک پوشیده می‌شود که تحت تاثیر تحریک این توبول‌ها سلول‌های بافت متانفریک وزیکول‌های کلیوی را تشکیل می‌دهند (1). وزیکول‌های کلیوی فرورفتگی پیدا می‌کند که سبب تشکیل شکاف عروقی می‌گردد. سپس وزیکول به توبول‌های کوچک s شکل تبدیل می‌شوند. پیش‌ساز اندوتلیوم عروق خونی (آنژیوبلاست) و احتمالاً مزانژیوبلاست، به داخل شکاف عروقی مهاجرت می‌کنند و مویرگ‌های گلوبمرولی را ساخته و واحد‌های دفعی کلیوی یا نفرون‌ها را تشکیل می‌دهد (3). انتهای پروگزیمال نفرون کیسول بومن را تشکیل می‌دهد که از دو لایه احشایی (پودوسیت) و جداری تشکیل می‌گردد (4). واحد‌های دفعی کلیوی طویل شده و لوله‌های پیچیده نزدیک، قوس هنله و لوله‌های پیچیده انتهایی را تشکیل می‌دهند. با تمایز مویرگ‌های گلوبمرولی تولید ادرار شروع می‌شود. نفروژنز در انسان در هفته‌های 4-5 جنینی و در رت از روز 12 جنینی شروع می‌شود (3).

فرایند‌های تکاملی تحت تاثیر کنش‌های متقابل سلول‌به‌سلول و یا سلول با ماتریکس خارج سلولی صورت می‌گیرد. در تمایز کلیه‌ها میان کنش‌های مزانشیمی - اپی تلیالی رخ می‌دهد که این برهم کنش‌ها، میان اپی تلیوم جوانه‌حالبی با مزانشیم بلاستوم متانفریک رخ می‌دهد. میان کنش‌هایی که در نتیجه بیان آبشاری از ژن‌ها و عوامل حاصل از بیان ژن‌ها رخ می‌دهند. از

جمله این موارد می‌توان به بیان Wilms Tumor Protein¹ توسط مزانشیم متانفریک اشاره کرد. WT1 یک عامل نسخه برداری برای آماده کردن بافت‌ها در پاسخ به لقاء جوانه‌حالبی است و از سایر مولکول‌های موثر در این میانکنش‌ها می‌توان به بیان Bone Morphogenic Protein³, Fibroblast Growth Factor² در جوانه‌حالبی و بیان عامل⁴ Glial cell-derived neurotrophic factor در مزانشیم متانفریک اشاره نمود بطوریکه نتایج مطالعات نشان می‌دهد موتاسیون عامل WT1 موجب آژنزی کامل کلیه می‌گردد. از دیگر عوامل موثر در تکامل کلیه می‌توان به عامل BMP7 اشاره کرد که در سلول‌های بنیادی کلیه در مراحل اولیه تکامل بیان می‌شود و اگر چه عدم بیان آن سبب آژنزی کلیه نمی‌شود ولی سبب تکامل ضعیف کلیوی می‌شود (5). از طرفی گلیکوکونژوگیت‌ها از مولکول‌های موجود در سطح سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی هستند و نقش کلیدی قند‌ها ی انتهایی این ترکیبات در روند ارتباطات و میان کنش سلول‌های جنینی نقش بسزایی دارد بطوریکه در کلیه جنین انسان طی تغییرات فنوتیپ مزانشیم نفروژنیک و مراحل ویژه تکامل نفرون، الگوی باند شونده‌ی ویژه‌ای با لکتین‌های مختلف وجود دارد که نشان دهنده تنوع ترکیبات کربوهیدرات‌ها در این مراحل است. بنابراین ظهور طیف وسیعی از قند‌های مختلف در زمان‌های مختلف تکاملی از جمله لقاء‌هایی که در زمان شکل‌گیری و تمایز کلیه رخ می‌دهد به اثبات رسیده است (6). از طرف دیگر گلیکوکونژوگیت‌ها در فرایند‌های تکاملی از قبیل شناسایی، مهاجرت و میانکنش‌های سلولی نقش کلیدی دارند و موجب می‌شوند که سلول‌ها وارد مراحل پیچیده مورفوژنیک گشته و مسیر طبیعی تکامل و تمایز خود را طی می‌کنند (7-9). علاوه بر الگوی خاص باند شونده‌ی لکتین‌ها با قند‌های انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها در طی فرایند‌های تکاملی، این الگو در دوران بعد از تولد و پروسه پیری تغییر نموده و همچنین در جریان بروز بیماری‌ها و سرطان تغییر می‌کند (10-14). لذا این مطالعه به منظور بررسی زمان ظهور، تغییرات و همچنین زمان ناپدید شدن احتمالی این مولکول‌ها در طی تکامل کلیه به روش لکتین هیستوشیمیایی انجام شد (15).

1- Wilms Tumor Protein (WT1)

2- Fibroblast Growth Factor (FGF2)

3- Bone Morphogenic Protein (BMP)

4- Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)

روش تحقیق

گزیلن و درجات نزولی الکل (100٪، 90٪، 70٪ و 50٪) و در نهایت آب مقطر قرار داده شدند.

بعد از آبدهی نمونه ها به مدت 30 دقیقه در محلول PBS قرار داده شدند. سپس به منظور خنثی کردن پراکسیداز داخلی مقاطع به مدت 20 دقیقه در محلول آب اکسیژنه (0/03 آب اکسیژنه در PBS) قرار داده شد. سپس لام ها به سه گروه 5 تایی تقسیم و هر گروه بطور جداگانه با هر یک از لکتین ها با غلظت نهایی 15 میکروگرم در میلی لیتر به مدت 2 ساعت در دمای اطاق در محیطی مرطوب انکوبه شدند. در این پژوهش از لکتین های LTA، MPA و I-UEA که با HRP نشاندار و از شرکت سیگما خریداری شده بودند استفاده گردید (جدول 1).

در مرحله بعد نمونه ها با بافر فسفات سالین، برای حذف لکتین های اضافی، شستشو داده شدند. سپس به مدت 15 دقیقه در محلول 0/03 درصد DAB دی آمینوبنزیدین (0/03 گرم دی آمینوبنزیدین در 100 میلی لیتر PBS) و آب اکسیژنه (200 میکرو لیتر در 100 میلی لیتر محلول DAB) قرار داده شدند. سپس نمونه ها با آب جاری شستشو و برای ایجاد رنگ زمینه از رنگ آمیزی آلسین بلو (pH=2/5) به مدت 5 دقیقه استفاده شد. در نهایت مقاطع مورد نظر با درجات افزایشی الکل آبگیری و با گزیلن شفاف و سپس بر روی لام چسبانده شدند. برای کنترل مراحل رنگ آمیزی یک لام ترکیبی حاوی بافت های مختلف با هر لکتین رنگ آمیزی شد. در این روش با اتصال لکتین های کونژوگه شده با HRP با قند انتهایی اختصاصی خود رنگ قهوه ای ظاهر می شود که نتیجه واکنش HRP با DAB است.

نمونه های آماده شده توسط سه نفر به روش کور (Blind) با میکروسکوپ نوری الیمپوس مدل Bx50 مورد بررسی قرار گرفتند و شدت واکنش برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی با استفاده از طیف لیکرت تعیین گردید (عدم واکنش = 0 و واکنش ضعیف = + و واکنش متوسط ++ و واکنش شدید +++ و واکنش بسیار شدید ++++). سپس اطلاعات به دست آمده برای هر لکتین در مراحل مختلف جنینی با استفاده تست آماری کروسکال والیس و نرم افزار SPSS باهم مقایسه گردیدند. از نمونه های بدست آمده توسط میکروسکوپ دوربین دار Olympus مدل BX51 تصاویر با بزرگنمایی مختلف تهیه گردید.

در این مطالعه از تعداد 40 سر رت نژاد ویستار (30 رت ماده و 10 رت نر) با وزن تقریبی 250-300 گرم که از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تهیه شده بودند استفاده گردید. این حیوانات در شرایط استاندارد خانه حیوانات با دسترسی آزادانه به آب، غذا (تغذیه روزانه دو بار صبح و عصر توسط پلیت وجوانه گندم)، دوره تاریکی و روشنایی 12 ساعته (از ساعت 8 صبح تا ساعت 8 بعد از ظهر)، درجه حرارت 18-24 درجه سانتی گراد و رطوبت مناسب نگهداری و در طی مراحل تحقیق دستوالعمل¹ NIH و² DHEW برای مراقبت از حیوانات مورد توجه و اجرا گردید. پس از آداپتاسیون، رت ها در قفس های مخصوص جفت گیری به نسبت 1 به 3 قرار گرفتند. هر روز از رت ها اسمیر واژینال تهیه و با بررسی میکروسکوپی آن و مشاهده اسپرم روز صفر حاملگی تعیین و رت هایی که به این روش حامله تشخیص داده شدند، به قفس های جداگانه انتقال داده شدند. در روزهای چهاردهم، شانزدهم و هجدهم رت های حامله تحت بیهوشی با کلروفرم قرار گرفتند و با عمل سزارین جنین ها از رحم خارج گردید. سپس جنین ها از پرده های جنینی و جفت جدا شدند. جنین ها بعد از شستشو در سرم فیزیولوژی، در فرمالین 10% به مدت 24-48 ساعت فیکس شدند و بعد از فیکساسیون، نمونه ها به روش معمول آزمایشگاه بافت شناسی توسط الکل اتیلیک با غلظت های افزایشی آبگیری و با گزیلن شفاف سازی شدند. سپس نمونه ها در جهات مختلف در بلوک های پارافینی قالب گیری شدند. از بلوک های پارافینی برش هایی به ضخامت 5 میکرومتری به صورت سریال توسط میکروتوم مدل Leitz1512 تهیه گردید. برای یافتن بافت کلیه در حال تکامل از هر 10 لام تهیه شده یک لام برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین استفاده شد. برای رنگ آمیزی با لکتین، در هر مرحله جنینی تعداد 15 مقطع از برش های سریال که حاوی کلیه بودند انتخاب شدند. به منظور رنگ آمیزی به روش لکتین هیستوشیمیایی، مقاطع بافتی به طریق معمول آزمایشگاه بافت شناسی آبدهی شدند. برای انجام آبدهی، به ترتیب برش های بافتی داخل محلول

1- The National Institutes of Health

2- Department of Health Education & Welfare

جدول 1: اسامی و مشخصات لکتین و شماره کاتالوگ

Lectin	Abbreviation	Carbohydrate Binding Specificity	Catalog Number
Maclura Pomifera Agglutinin	MPA	Gal-(β 1 \rightarrow 3)-GalNAc	Sigma, M-3267
Lotus Tetragonolobus Agglutinin	LTA	L-fuc(α 1 \rightarrow 4)GlcNAc	Sigma, H-1601-1
Ulex Europeus Agglutinin	UEA-I	L-fuc(α 1 \rightarrow 3)Gal(β 1-4)Glc	Sigma, H-2201-1

یافته‌ها

اختلاف معنی دار نبود. سلول‌های مزانشیمی (C) واکنش نسبتاً شدیدی را با لکتین مذکور نشان دادند که این افزایش در مقایسه با روز 14 جنینی، معنی دار بود ($p < 0/05$). در این مرحله از تکامل سلول‌های لایه احشایی کپسول بومن یا همان پودوسیت‌ها (P) و لایه جداری کپسول بومن (PL) به صورت واضح مشخص بودند. پودوسیت‌ها که بصورت سلول‌های درشتی دیده می‌شوند واکنش متوسطی را با لکتین MPA نشان دادند در حالی که لایه جداری کپسول که به صورت یک لایه نازک قابل مشاهده بودند (PL) با لکتین مذکور واکنشی بروز ندادند. لوله‌های پیچیده نزدیک (PCT) واکنش ضعیفی با لکتین مذکور بروز دادند (شکل‌های 1-B، 1-C).

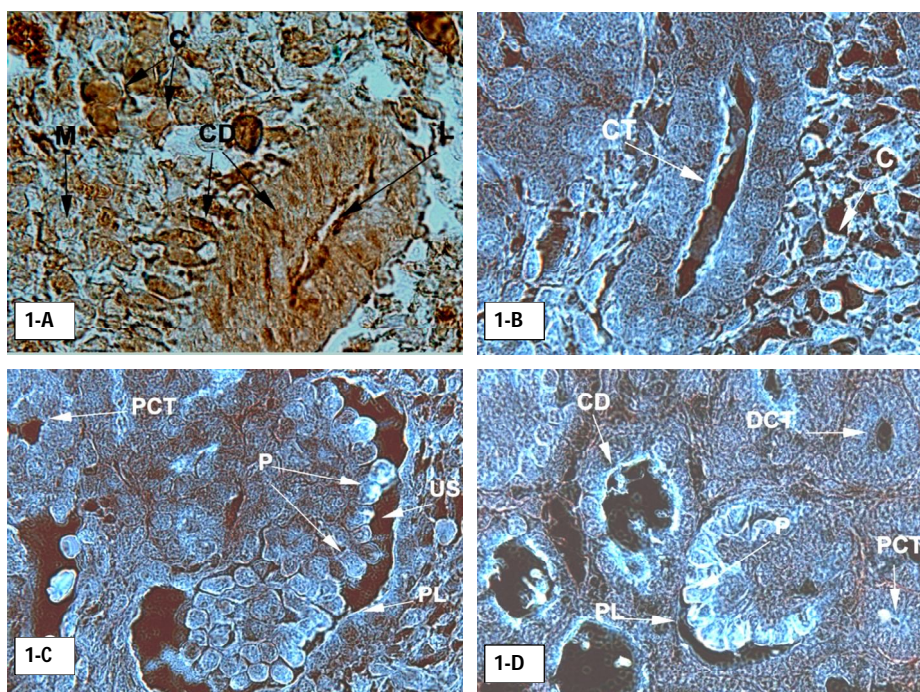
در بررسی مقاطع مربوط به کلیه جنین‌های 18 روزه، پودوسیت‌ها (P) واکنش شدیدی را با لکتین MPA نشان دادند که این افزایش نسبت به روز 16 جنینی معنی دار بود ($p < 0/05$). لایه جداری کپسول بومن (PL) مشابه روز 16 جنینی واکنشی را بروز نداد. سلول‌های مجاری جمع‌کننده (CD) با لکتین MPA واکنش ضعیفی را نشان دادند که در مقایسه با روز 16 جنینی این کاهش در شدت رنگ آمیزی معنی بود ($p < 0/05$). لوله‌های پیچیده دور (DCT)؛ لوله‌های پیچیده نزدیک (PCT) و سلول‌های مزانشیمی (C) در روز 18 جنینی واکنشی را بروز ندادند (جدول 2 و شکل 1-D).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که واکنش لکتین MPA در جنین‌های 14 روزه، تنها با لوله‌های جمع‌کننده که توسط بافت مزانشیمی احاطه شده است قابل تشخیص است. در این مرحله از تکامل مجاری جمع‌کننده (CD) که بصورت یک ردیف سلول منظم قابل مشاهده بودند بصورت ضعیفی با لکتین MPA واکنش نشان دادند بطوریکه واکنش مذکور در سطح لومینال سلول‌ها (L) مشخص تر بود. ماتریکس خارج سلولی که به میزان بسیار کمی مابین سلول‌های مزانشیمی وجود دارد واکنشی را با لکتین مذکور بروز ندادند در حالیکه سلول‌های مزانشیمی (C) که بخش عمده کلیه را در این مرحله از تکامل تشکیل می‌دهد بصورت ضعیف تا متوسط با لکتین MPA واکنش نشان دادند. بقیه ساختارهای کلیه منجمله کپسول بومن، لوله پیچیده دور و نزدیک در این مرحله از تکامل قابل تشخیص نبودند (جدول 2 و شکل 1-A).

در بررسی کلیه جنین‌های 16 روزه، ساختار واضح اجسام مالپیگی، مجاری جمع‌کننده (CD)، لوله‌های پیچیده نزدیک (PCT) و لوله‌های پیچیده دور (DCT) قابل مشاهده بودند. سلول‌های مجاری جمع‌کننده (CD) واکنش متوسطی را با لکتین MPA نشان دادند همچنین در سطح لومینال سلول‌ها (L) واکنش متوسطی قابل مشاهده بود که در مقایسه با روز 14

جدول 2: رتبه بندی شدت واکنش لکتین MPA

Region	P	CD	PCT	DCT	C
E14	0	+	-	-	++
E16	++	++	+	-	+++
E18	+++	+	-	-	-



شکل 1: تصاویر مربوط به کلیه در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته و از آلسین بلو (pH=2/5) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.

شکل 1-A: مقطع عرضی کلیه جنین 14 روزه رت که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. مجاری جمع کننده (CD) بویژه سطح لومینال سلول ها (L) نیز که بصورت یک لایه نازک مشاهده می شود با لکتین مذکور بصورت ضعیف و سلول های مزانشیمی (C) واکنش متوسطی را نشان می دهند ($\times 1000$).

شکل 1-B: مقطع عرضی کلیه جنین 16 روزه رت را نشان می دهد که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. ناحیه راسی (L) سلول های مجاری جمع کننده (CD) واکنش متوسط و سلول های مزانشیمی (C) واکنش شدیدی را نشان می دهند ($\times 1000$).

شکل 1-C: مقطع عرضی کلیه جنین 16 روزه رت را نشان می دهد که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است. پودوسیت ها (P) واکنش متوسط، لایه جداری کپسول بومن (PL) بدون واکنش. لوله های جمع کننده نزدیک (PCT) واکنش ضعیفی را با لکتین مذکور نشان می دهد ($\times 1000$).

شکل 1-D: مقطع عرضی کلیه جنین 18 روزه رت که در مجاورت با لکتین MPA قرار گرفته است را نشان می دهد. پودوسیت ها (P) واکنش شدید، لایه جداری کپسول بومن (PL) بدون واکنشی مشهود مشخص شده است. راس سلول های مجاری جمع کننده (CD) واکنش شدید در صورتیکه لوله های پیچیده دور (DCT) و لوله های پیچیده نزدیک (PCT) با لکتین مذکور واکنش نشان ندادند ($\times 1000$).

بصورت لایه نازکی دیده می شود با لکتین UEA-I واکنشی را نشان ندادند. در حالیکه در برخی مناطق لایه جداری واکنش های ضعیفی قابل مشاهده بود. سلول های مزانشیمی (C) که در اطراف گلومرول وجود دارند، واکنش ضعیف تا متوسطی را نشان دادند که در مقایسه با روز 14 جنینی اختلاف در شدت واکنش معنی دار نبود. در سلول های لوله های پیچیده نزدیک (PCT) و لوله های پیچیده دور (DCT) واکنش ضعیفی قابل مشاهده بود (جدول 3 و شکل 2-B).

در بررسی واکنش UEA-I در کلیه های در حال تکامل جنین های 18 روزه، شدت واکنش پودوسیت ها (P) با لکتین

در بررسی واکنش قسمت های مختلف کلیه های در حال تکامل با لکتین UEA-I، در روز 14 جنینی، مجاری جمع کننده (CD) که بصورت واضح در این روز قابل مشاهده بودند واکنش بسیار ضعیفی را نشان دادند. عدم واکنش ماتریکس خارج سلولی و واکنش متوسط سلول های مزانشیمی (C) با لکتین مذکور قابل مشاهده بود (جدول 3 و شکل 2-A).

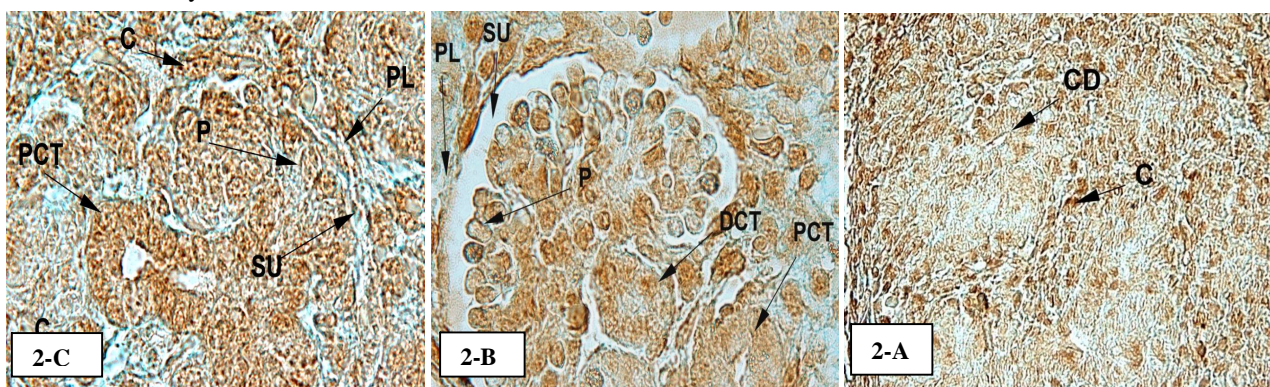
در بررسی واکنش لکتین UEA-I در کلیه های در حال تکامل در روز 16 جنینی، برخی از پودوسیت ها (P) واکنش متوسطی با لکتین نشان دادند در حالیکه سایر سلول های این ناحیه واکنشی را با لکتین مذکور بروز ندادند. لایه جداری کپسول بومن (PL) که

UEA-I در مقایسه با روز 16 جنینی کاهش معنی داری را نشان داد (P<0/05). در حالیکه لایه جداری کپسول بومن (PL) واکنشی را با لکتین مذکور بروز نداد. لوله‌های پیچیده نزدیک (PCT) که در تصویر در مجاورت گلومرول قرار گرفته است، با لکتین مذکور واکنش ضعیف تا متوسطی را نشان داد که در مقایسه با روز 14 و 16 جنینی افزایش معنی داری را نشان می‌دهد (p<0/05). سلول‌های مزانشیمی (C) در این مرحله تکاملی واکنش بسیار ضعیفی نشان دادند که در مقایسه با روز 16 جنینی معنی دار نبود (جدول 3 و شکل 2-C).

جدول 3: رتبه بندی شدت واکنش لکتین UEA-I

Region	P	CD	PCT	DCT	C
E14	0	±*	-	-	++
E16	++	-	+	+	++
E18	±*	-	++	-	±*

*Very Weak Reaction



شکل 2: تصاویر مربوط به کلیه در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین UEA-I قرار گرفته و از آلسین بلو (pH=2/5) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.

شکل 2-A: مقطع عرضی کلیه جنین 14 روزه رت که در مجاورت با لکتین UEA-I قرار گرفته است. مجاری جمع کننده (CD) در این مرحله واکنش بسیار ضعیف و سلول‌های مزانشیمی (C) واکنش متوسطی را نشان می‌دهد (400×).

شکل 2-B: مقطع عرضی کلیه جنین 16 روزه رت که در مجاورت با لکتین UEA-I قرار گرفته است. برخی از پودوسیت‌ها (P) واکنش متوسط، لایه جداری کپسول بومن (PL) عدم واکنش و سلول‌های مزانشیمی (C) واکنش ضعیف تا متوسطی را نشان می‌دهند. بعلاوه سلول‌های لوله‌های پیچیده نزدیک (PCT) و لوله‌های پیچیده دور (DCT) واکنش ضعیفی قابل رویت است (1000×).

شکل 2-C: مقطع عرضی کلیه جنین 18 روزه رت که در مجاورت با لکتین UEA-I قرار گرفته است. پودوسیت‌ها (P) و سلول‌های مزانشیمی (C) واکنش بسیار ضعیف و لوله‌های پیچیده نزدیک (PCT) واکنش متوسطی را نشان می‌دهند (400×).

در بررسی مقاطع کلیه‌های در حال تکامل که در مجاورت با لکتین LTA قرار گرفته بودند، در روز 14 جنینی، مجاری جمع کننده (CD) در این مرحله تنها ساختار قابل مشاهده هستند که با لکتین LTA واکنش ضعیفی نشان دادند. سلول‌های مزانشیمی (C) اطراف مجاری جمع کننده در این مرحله با لکتین مذکور واکنش متوسطی بروز دادند (جدول 4 شکل 3-A).

در بررسی مقاطع کلیه جنین 16 روزه که در معرض لکتین LTA قرار گرفته بودند پودوسیت‌ها در کپسول بومن (P) که بصورت سلول‌های واضح و منظمی دیده می‌شوند با لکتین LTA واکنشی نشان ندادند. لایه جداری کپسول بومن (PL) بصورت یک

در بررسی مقاطع کلیه جنین 16 روزه که در معرض لکتین LTA قرار گرفته بودند پودوسیت‌ها در کپسول بومن (P) که بصورت سلول‌های واضح و منظمی دیده می‌شوند با لکتین LTA واکنشی نشان ندادند. لایه جداری کپسول بومن (PL) بصورت یک

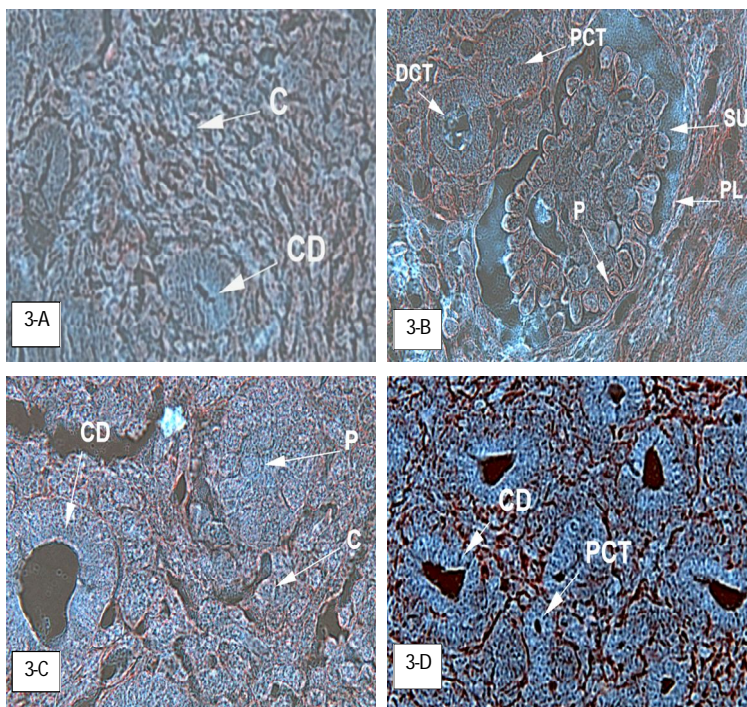
واکنش معنی دار نبود. واکنش لوله های پیچیده نزدیک (PCT) (شکل 3-D) ضعیف تا متوسطی ارزیابی گردید که در مقایسه با روز 14 و 16 جنینی افزایش معنی دار بود ($p < 0/05$). لوله های پیچیده دور (DCT) واکنش متوسطی را نشان دادند که در مقایسه با روز 14 و 16 جنینی افزایش معنی دار بود ($p < 0/05$). سلول های مزانشیمی (C) اطراف نواحی گلمرولی واکنشی با لکتین LTA نشان ندادند (جدول 4 و شکل های 3-C, D).

نشان دادند که در مقایسه با روز 16 جنینی معنی دار بود ($p < 0/05$). هر چند لایه جداری کپسول بومن در این روز فاصله زیادی با پودوسیت ها نداشت ولی با لکتین LTA واکنشی در این سلول ها مشاهده نگردید. مجاری جمع کننده (CD) بصورت مجاری بزرگی در تصویر دیده می شوند و با لکتین LTA واکنش ضعیفی نشان دادند که در مقایسه با روز 16 جنینی افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0/05$) اما در مقایسه با روز 14 جنینی

جدول 4: رتبه بندی شدت واکنش لکتین LTA

Region	P	CD	PCT	DCT	C
E14	0	+	-	-	++
E16	-	-	±*	-	-
E18	+	+	++	++	+

*Very Weak Reaction



شکل 3: مقاطع مربوط به کلیه در حال تکامل رت که در مجاورت با لکتین LTA قرار گرفته و از آلسین بلو (pH= 2/5) به عنوان رنگ زمینه استفاده شده است.

شکل 3-A: مقطع عرضی کلیه جنین 14 روزه رت را نشان می دهد. مجاری جمع کننده (CD) واکنشی ضعیف و سلول های مزانشیمی (C) با لکتین LTA واکنش متوسطی را نشان می دهند. ($\times 400$).

شکل 3-B: مقطع عرضی کلیه جنین 16 روزه رت که در مجاورت با لکتین LTA قرار گرفته است. پودوسیت ها (P)، لایه جداری کپسول بومن (PL) واکنشی با لکتین مذکور نشان ندادند. فضای ادراری (SU)، واکنش بسیار ضعیف سلول های لوله های پیچیده نزدیک (PCT) و عدم واکنش لوله های پیچیده دور (DCT) و سلول های مزانشیمی (C) در تصویر قابل مشاهده است ($\times 1000$).

شکل 3-C, D: مقاطع عرضی کلیه جنین 18 روزه رت را نشان می دهند. پودوسیت ها (P) با لکتین LTA واکنش متوسطی را نشان می دهند. مجاری جمع کننده (CD) با لکتین مذکور واکنش ضعیفی بروز دادند. لوله های پیچیده نزدیک (PCT) با واکنش ضعیف، سلول های مزانشیمی (C) بدون واکنش در تصویر 3-D قابل مشاهده هستند ($\times 400$).

بحث

مورفوژنز کلیه‌های متانفریک رت از روز سیزدهم جنینی شروع می‌شود، در ادامه روند تکامل، در روز 14 جنینی، جوانه‌هایی در کلیه‌ها بصورت مجراهایی با لومن بزرگ و یک ردیف سلول در دیواره آن مشاهده می‌شود که سلول‌های مزانشیمی این ساختار را در بر گرفته‌اند و در روز 16 جنینی ساختار گلومرولی در حال تشکیل دیده شدند که در این ساختارها کپسول بومن با دو لایه احشایی و جداری قابل تشخیص هستند و فضای میان این دو لایه که همان فضای ادراری است بوضوح قابل رویت بودند و با پیشرفت روند تکاملی در روز 18 جنینی با رشد گلومرول در کپسول بومن، دو لایه کپسول بومن بصورت دو لایه مجزا با فضای ادراری واضح قابل تشخیص نبودند. بخش‌های دیگر نفرون‌ها شامل لوله‌های پیچیده نزدیک و دور در روزهای 16 و 18 جنینی در اطراف مقاطع گلومرولی قابل مشاهده بودند. وجه تمایز لوله‌های پیچیده دور و نزدیک از یکدیگر قطر مجاری و نوع سلول‌های دیواره این مجراهاست بدین ترتیب که در لوله‌های پیچیده نزدیک قطر مجرا به واسطه سلول‌های استوانه‌ای کوتاه کوچک‌تر است و در مقطع عرضی 3-5 هسته از سلول‌های مذکور دیده می‌شوند و در مقابل در لوله‌های پیچیده دور لومن مجراها وسیع‌تر بوده و در مقطع عرضی هسته‌های سلولی بیشتری دیده می‌شوند (4).

فرآیند‌های تکاملی حاصل مجموعه‌ای از رخداد‌های مولکولی است که طی آن القاء و میان‌کنش‌های سلولی و بافتی بوقوع می‌پیوندد و این مرحله‌ی آغازی از تکامل و تمایز ارگان‌های مختلف جنینی است. از جمله مولکول‌های موثر و دخیل در فرآیند‌های تکاملی گلیکوپروتئین‌ها، فاکتورهای رشد و غیره هستند. قندها در ساختارهایی از منجمله گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها و پروتئوگلیکان‌ها تظاهر می‌نمایند که تحت عنوان گلیکوکونژوگیت‌ها شناخته می‌شوند. گلیکوکونژوگیت‌ها علاوه بر ذخیره سوختی به عنوان حاملین اطلاعات عمل می‌کنند (16). این مولکول‌ها در تنظیم فرآیندهای تکاملی جنینی از قبیل مهاجرت، تکثیر، تمایز، مورفوژنز، اتصالات سلولی و شناسایی سلولی نقش دارند (17, 18). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که برخی از قندها در دسته‌ای از سلول‌ها، مدت زمان بیشتری ظهور پیدا کرده و برخی به صورت گذرا بوجود آمده و از بین می‌روند که این می‌تواند توجیهی برای

نقش این مولکول‌ها در روند تکاملی کلیه باشد (19, 20). با مروری بر مطالعات انجام گرفته می‌توان دریافت که گلیکوکونژوگیت‌ها یکی از مولکول‌هایی است که در دوران‌های مختلف حیات از دوران جنینی تا پیری در ارگان‌های مختلف از جمله کلیه‌ها بارها مورد توجه قرار گرفته است و نقش این مولکول‌ها در ارگانوژنز نرمال کلیه به اثبات رسیده است (21).

نتایج مطالعه‌ای که بر روی کلیه موش انجام شده است مشخص گردیده که الگوی باند شونده‌ی لکتین‌ها در گلومرول‌های بیمار با گلومرول سالم متفاوت است. به عنوان مثال طی ایجاد ضایعاتی از قبیل ضایعات پرولیفراتیو مزانژیال افزایش ظهور برخی قندها از قبیل N استیل گلوکوز آمین و مانوز دیده می‌شود و برخی قندها از قبیل N استیل D گالاکتوز آمین در مزانژیوم ظهور می‌یابند. که این نتایج نشان می‌دهد برای آنالیز ضایعات گلومرولی می‌توان از الگوی باند شونده‌ی لکتین استفاده نمود و ظهور غیر طبیعی قندها را تعیین کرد که این بیانگر این موضوع است که تعیین قندهای انتهایی ارزش تشخیصی دارد (11). سلول‌های کارسینوما‌ی کلیه نیز الگوی باند شونده‌ی متفاوتی با کلیه طبیعی نشان دادند که بیانگر این مطلب است که این سلول‌ها تغییری در محتوای قندهای انتهایی خود دارند. به این ترتیب که در سلول‌های کارسینوما‌ی قند فوکوز ظهور می‌یابد و بعد از دوره درمان این قند ناپدید می‌شود و در مقابل، بعد از درمان ظهور قندهایی از قبیل N استیل گالاکتوز آمین افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که در بررسی‌های پاتولوژیک تومور کلیه می‌توان ظهور قندها را با روش لکتین هیستوشیمیایی تعیین نمود و همچنین (12) می‌توان روند درمان تومورهای کلیه را با این روش‌ها پیگیری کرد. در روند پیری عملکرد کلیه‌ها دچار تغییر می‌شود و در این مرحله تغییرات در بیان و ظهور گلیکوکونژوگیت‌ها نیز به اثبات رسیده است (14).

با توجه به اینکه بروز بیماری و سرطان کلیه طی روند پیری عملکرد کلیه آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد و بیان و حضور این گلیکوکونژوگیت‌ها در طی این دوران دست‌خوش تغییرات می‌شود، بنابراین شناخت تغییرات بیان و ظهور این مولکول‌ها و نقش احتمالی این مولکول‌ها طی روند طبیعی تکامل کلیه حین دوران جنینی و طول دوره حیات ضروری بنظر می‌رسد. در این راستا در مطالعه حاضر بیان برخی قندهای انتهایی طی روند

بیان قند L فوکوز در طی مراحل تکاملی کلیه رت در این نواحی است. لوله های پیچیده نزدیک واکنش معنی داری را با لکتین UEA-I نشان دادند ($p < 0/05$) که در روز 16 و 18 جنینی بصورت ضعیفی ارزیابی گردید. سلول های مزانشیمی در روز 14 و 16 جنینی واکنش متوسطی نشان دادند که بیانگر بیان قند L فوکوز است و در روز 18 جنینی کاهش واکنش را بصورت واضح نشان می دهند.

در مطالعاتی بر روی موش بالغ انجام شده است نشان می دهد که بیان قند فوکوز در لوله های پیچیده دور و نزدیک مشاهده می شود و در رت این واکنش تنها در انتهای نفرون و مجاری جمع کننده مشاهده می شود. در کلیه انسان نیز لکتین UEA-I در نواحی مجاری جمع کننده و اندوتلیال عروق خونی گلوبول و واکنش نشان داده اند اما در موش و رت بالغ در اندوتلیال عروق گلوبول و واکنشی دیده نمی شود که نشان دهنده عدم بیان قند L فوکوز است (22,23).

در بررسی بیان قند انتهایی L فوکوز در کلیه های در حال تکامل رت با استفاده از لکتین LTA، پودوسیت ها واکنش ندادند که بیانگر عدم بیان قند انتهایی L فوکوز در این سلول هاست. لوله های جمع کننده (CT) واکنش معنی داری با لکتین LTA نشان دادند که در روز 14 و 18 جنینی واکنش ضعیف نشان دادند و در روز 16 جنینی واکنش نشان ندادند که بیانگر بیان ضعیف قند انتهایی L فوکوز در روز های 14 و 16 جنینی است. لوله های پیچیده دور (DCT) و نزدیک (PCT) واکنش معنی داری را نشان دادند، در روز 16 جنینی واکنشی در این مجاری وجود ندارد و در روز 18 جنینی این واکنش افزایش یافته و واکنش متوسطی دیده می شود که بیانگر بیان قند انتهایی L فوکوز در روز 18 جنینی در این مجاری است. سلول های مزانشیمی (C) در واکنش با LTA در روز 14 جنینی واکنش متوسطی نشان دادند که بیانگر بیان قند انتهایی L فوکوز در این سلول ها در این روز است. در روز 16 و 18 جنینی عدم واکنش با لکتین LTA مشاهده می شود که نشان دهنده عدم بیان قند انتهایی L فوکوز در روز های فوق در سلول های مزانشیمی است. در بررسی های کلیه جنین جوجه از مرحله S شکل نفرونی به بعد لکتین LTA در لوله های پیچیده نزدیک واکنش نشان دادند (23). در مطالعه ای بر روی کلیه موش بالغ

طبیعی تکامل کلیه رت در روز های 14، 16 و 18 جنینی مورد بررسی قرار گرفته است برای این منظور از سه نوع لکتین MPA، LTA و UEA-I استفاده گردید.

در بررسی کلیه های در حال تکامل در واکنش با MPA، واکنش معنی داری پودوسیت ها (P) بیانگر بیان قند N استیل گالاکتوز آمین در طی تکامل کلیوی رت است. واکنش پودوسیت ها در روز 16 جنینی بصورت ضعیف ارزیابی شد، که این واکنش متفاوت از سلول های پودوسیت در گلوبول جنین انسان است که در این مرحله تکاملی بصورت قوی با لکتین MPA واکنش نشان می دهند و مطالعه ای در مرحله S توبول های کلیوی در رت راس سلول های پودوسیت و مویرگ های گلوبول با MPA واکنش نشان دادند، بصورت مشابه در موش نیز در مراحل اولیه تشکیل گلوبول بیان قند N استیل گالاکتوز آمین مشاهده شده است (6,13,19).

در روز 14 جنینی، واکنش ضعیف در لوله های جمع کننده (CD)، بیانگر بیان ضعیف قند N استیل گالاکتوز آمین در این نواحی است. واکنش لوله های جمع کننده در روز 16 جنینی افزایش شدت واکنش را نسبت به روز 14 جنینی نشان دادند و در روز 18 جنینی از بین رفتن واکنش بیانگر عدم بیان قند N استیل گالاکتوز آمین در این روز است. واکنش سلول های مزانشیمی در روز 14 به صورت متوسط و در روز 16 جنینی به صورت شدید ارزیابی گردید که نشان دهنده بیان قند N استیل گالاکتوز آمین در این روز های تکاملی است، در صورتیکه عدم واکنش در روز 18 جنینی بیانگر عدم بیان قند N استیل گالاکتوز آمین است. واکنش لوله های پیچیده دور و نزدیک واکنش معنی داری را در روز های 14 و 16 و 18 جنینی نشان ندادند. در صورتیکه در رت بالغ، در توبول های پیچیده نزدیک وجود قند N استیل گالاکتوز آمین به اثبات رسیده است. در صورتیکه این واکنش در موش مشاهده نشده است (22) همچنین در گلوبول بالغ در انسان واکنش MPA ناپدید می شود (19).

در بررسی واکنش UEA-I در روز 16 جنینی واکنش متوسط UEA-I نشان دهنده بیان قند L فوکوز در پودوسیت ها است که این واکنش بصورت ضعیف در روز 18 جنینی ارزیابی شد. مجاری جمع کننده (CD) و لوله های پیچیده دور (DCT) واکنش معنی داری با لکتین UEA-I نشان ندادند که بیانگر عدم

تشکر و تقدیر

مقاله حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح پژوهشی شماره 88/302665 مورخ 1388/10/26 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد است که بدینوسیله از آن معاونت محترم و همچنین خدمات تکنیکی سرکار خانم متجدد در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی مشهد تشکر و تقدیر می‌گردد.

قند فوکوز انتهایی در لوله‌های دیستال مشاهده شده است (6).

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان قندهای انتهایی گلیکوکانژوگیت‌ها منجمله Gal-($\beta 1 \rightarrow 3$)-GalNAc ، L- L-fuc($\alpha 1 \rightarrow 3$)Gal($\beta 1-4$)Glc و fuc($\alpha 1 \rightarrow 4$)GlcNAc در مراحل مختلف تکامل کلیه تنظیم شده است.

References:

- Sadler T W. Longman's medical embryology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009: 235-245.
- Qiao J, Cohen D, Herzlinger D. The metanephric blastema differentiates into collecting system and nephron epithelia in vitro. *Develop* 1995; 121(10): 3207-3214.
- Abrahamson D R. Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. *Organogen* 2009; 5(1): 275-287.
- Junqueira L C, Carneiro J. Basic histology. 10th ed. United States: McGraw-Hill Companies; 2003: 383-391.
- Kreidberg J A. WT1 and kidney progenitor cells. *Organogen* 2010; 6(2): 61-70.
- Laitinen L, Virtanen I, Saxen L. Changes in the glycosylation pattern during embryonic development of mouse kidney as revealed with lectin conjugates. *J histochem cytochem* 1987; 35(1): 55-65.
- Ebrahimzadeh Bideskan AR, Hassanzadeh Taheri MM, Nikravesht MR, Fazel AR. Lectin histochemical study of vasculogenesis during Rat pituitary morphogenesis. *IJBMS* 2011; 14(1): 161-169.
- Fazel AR, Schulte B A, Spicer S S. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera. *Anat Rec* 1990; 228(2): 177-184.
- Qasba P K. Involvement of sugars in protein-protein interaction. *Carbohydr Polym* 2000; 41(3): 293-309.
- Eggence I, Fenderson B A, Toyokuni T, Hakomori S. A role of carbohydrate-carbohydrate interaction in the process of specific cell recognition during embryogenesis and organogenesis: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158(3): 913-920.
- Kizaki T, Takeda Z, Watanabe M, Hanioka K, Itoh H. Histochemical analysis of changes in lectin binding in murine glomerular lesions. *Acta Pathol Jpn* 1989; 39(1): 31-41.
- Ulrich W, Horvat R, Krisch K. Lectin histochemistry of kidney tumors and its pathomorphological relevance. *Histo* 1985; 9(10): 1037-1050.
- Holthofer H, Hennigar R A, Schulte BA. Glomerular sialoconjugates of developing and mature rat kidneys. *Cell Diff* 1988; 24(3): 215-221.
- Hanai T, Usuda N, Morita T, Nagata T. Light microscopic lectin histochemistry in aging mouse kidney: study of compositional changes in glycoconjugates. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(7): 897-906.
- Hewiston T D, Darby I A. *Histology protocols*. Australia: Hum Press; 2008: 103-114.
- Lehninger A L, Cox M M, Nelson D L. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2008: 252-258.
- Zhang L, Tran D T, Ten Hagen K G. An O-glycosyltransferase promotes cell adhesion during development by influencing secretion of an extracellular matrix integrin ligand. *J Biol Chem* 2010; 285(25): 19491-19501.
- Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryos. *Micron* 2001; 32(4): 427-438.

19. Holthofer H, Virtanen I. Glycosylation of developing human glomeruli: lectin binding sites during cell induction and maturation. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(1): 33-37.
20. Murata F, Tsuyama S, Suzuki S, Hamada H, Ozawa M, Muramatsu T. Distribution of glycoconjugates in the kidney studied by use of labeled lectins. *J Histochem Cytochem* 1983; 31(1A Suppl): 139-144.
21. Steer D L, Shah M M, Bush K T, Stuart R O, Sampogna R V, Meyer T N. Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulfated proteoglycans in the developing kidney. *Dev Biol* 2004; 27(2): 310-327.
22. Schulte B A, Spicer S S. Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Am J Anat* 1983; 168(3): 345-362.
23. Truong L D, Phung V T, Yoshikawa Y, Mattioli C A. Glycoconjugates in normal human kidney. A histochemical study using 13 biotinylated lectins. *Histochem* 1988; 90(1): 51-60.

Lectin histochemistry Study of Glycoconjugate Terminal Sugars During Rat kidney Development

Alireza Ebrahimzadeh Bideskan¹, Fatemeh Nikmard², Elham Mohammadzadeh³, Hengameh Razavi⁴
and Alireza Fazel⁴

Abstract

Background and Aim: Developmental processes are mediated by cell surface and extracellular matrix (ECM) interactions that are regulated by the molecular mechanism. The aim of this study was to determine Glycoconjugates terminal sugars distribution and the changes during kidney development in rats using Lectin histochemical technique.

Materials and Methods: Thirty Wistar Rat embryos at different stages from days 14 (E14) to 18 days of gestation were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut into 5 μ m thickness sections serially. The sections were incubated with different HRP-lectins from Lotus tetragonolobus (LTA), Maclura pomifera (MPA) and Ulex europeus agglutinine (UEA-I). Staining intensity was determined by means of blind method and the sections were graded to compare different embryonic stages.

Results: Our findings showed that the reactions of MPA with podocytes started at E14 and increased afterwards ($p < 0.05$). Mesenchymal cells reacted with MPA on E14, E 16 and disappeared at E18 ($p < 0.05$). Collecting duct reaction with MPA was moderate on E 16. Mesenchymal cells reaction with UEA-I was moderate on E14 to E16 but decreased on E18 ($p < 0.05$). A weak reaction was observed in collecting duct with UEA-I on E16. Proximal and distal tubules as well as collecting ducts showed a weak reaction with LTA in E18. No reaction was observed in Podocytes. Mesenchymal cells reacted on E14 but did not react on E16 and E18 with UEA-I lectin.

Conclusion: According to the results, it is concluded that distributions and changes of glycoconjugates with terminal sugars L-Fuc ($\alpha 2-4$) GlcNAc, Gal ($\beta 1-3$) GalNAc and L-fuc ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Gal ($\beta 1-4$) Glc, are regulated during rat kidney development.

Keywords: Embryonic development, glycoconjugates, kidney, lectin

Received: 13 January 2011

Revised: 15 May 2011

Accepted: 25 May 2011

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2012; Vol. 18, No.2

1- **Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Mashad University of Medical Sciences, Mashad, Iran.

Tel: +98 511 8002242

Fax: +98 511 8002333

E-mail: ebrahimzadehba@mums.ac.ir

2- MSc., Student of Anatomy, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Mashad University of Medical Sciences, Mashad, Iran

3- Assistant professor, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Mashad University of Medical Sciences, Mashad, Iran

4- Full Professor, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Mashad University of Medical Sciences, Mashad, Iran