کلاژن IV و نقش کلیدی آن در تکامل غشاء پایه شبکیه موش

*دکتر محمدرضا نیکروش(Ph D)[1]- دکتر مهدی جلالی(Ph D)[1]- دکتر عباسعلی معین(Ph D)[2]- دکتر محمدحسن کریمفر(Ph D)[3]- دکتر هوشنگ رفیقدوست(Ph D)[4]- شبنم محمدی(MS)[1]

*نویسنده مسئول: مشهد، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی

پست الکترونیک: Nikravesh@hotmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۱۱

چکیده

مقدمه: غشاء پایه ناحیه تخصص یافته‌ای از ماتریکس خارج سلولی است که نقش‌های مختلفی از قبیل تنظیم تکامل، تکثیر و ایجاد بستری برای مهاجرت‌های سلولی را بر عهده دارد. از ترکیب‌های غشاء پایه، کلاژن نوع IV ساختار اصلی آن را تشکیل می‌دهد. شبکیه از اندام‌های هدف در بیماری‌هایی نظیر دیابت است که به علت تغییر غشای پایه دچار رتینوپاتی می‌شود. رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی از عواملی است که تشخیص زود هنگام آنها به درمان بهتر کمک کرده و از مرگ و میر این بیماران جلوگیری می‌کند.

هدف: ارزیابی نحوه ظهور و توزیع کلاژن نوع IV در مرحله‌های جنینی و پس از تولد در غشای پایه شبکیه.

موادو روش‌ها: ۲۴ موش باکره نژاد Balb/c در شرایط استاندارد محیطی و غذایی نگهداری شدند. بعد از جفت‌گیری، ایجاد پلاک واژینال در آنها به منزله روز صفر حاملگی تلقی شد. سپس، از روزهای ۱۳ تا ۱۸ حاملگی، روزانه دو موش قطع نخاع شده و سر جنین‌ها ثابت و آماده‌سازی بافتی شد. کلاژن نوع IV با پادتن اختصاصی ردیابی شد. مشابه این عمل نیز در نوزادان ۱ تا ۵ روزه صورت گرفت.

نتایج: کلاژن نوع IV از حدود روز شانزدهم جنینی در غشاء محدودکننده داخلی و خارجی ظاهر شده و تا پایان دوره جنینی بر مقدار این واکنش افزوده می‌شود. بررسی‌های مربوط به روزهای بعد از تولد نیز نشان داد که واکنش غشای پایه شبکیه تا روز سوم به حداکثر می‌رسد، اما پس از آن تغییر چشمگیری نمی‌کند.

نتیجه‌گیری: تکامل شبکیه وابسته به حضور پروتئین‌های مختلفی است که از میان آنها کلاژن نوع IV اهمیت ویژه‌ای دارد.

کلید واژه‌ها: تکامل/ شبکیه/ کلاژنازها/ ماتریکس خارج سلولی/ موش‌ها

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۲، صفحات:۶۲-۵۶

مقدمه

بر اساس مطالعات انجام شده نشان داده شده که تکامل چشم در مهره‌داران محتاج میان‌کنش‌های کاملاً تنظیم شده‌ای است که بین اکتودرم سطحی، نورواپی‌تلیوم پروزنسفالون و مزانشیم اطراف آن صورت می‌گیرد(۱). نقش تعیین‌کننده در تمایز و هدایت سلولی جام بینایی با پروتئین‌هایی است که لامینین، فیبرونکتین، هپاران سولفات و کلاژن نوع IV از آن جمله‌اند(۲). به عبارت دیگر بخش عمده‌ای از پیام‌های هدایت کننده روند تکامل شبکیه در واقع اجزایی از ماتریکس خارج سلولی هستند که به‌صورت غشای پایه و گلیکو پروتئین‌های اطراف سلول (ماده خارج سلولی) سازمان‌دهی شده‌اند. برخی از این مولکول‌ها به عنوان مولکول‌های متصل‌کننده سلول به سلول و برخی دیگر به عنوان اتصال‌دهنده سلول به غشای پایه یا غشاهای محدود کننده عمل می‌کنند. به عبارت دیگر، مولکول‌ها و اجزای خاصی از ماتریکس برای تمایز سلولی ضروری است که از بین آنها کلاژن نوع IV اهمیت بسزایی دارد به‌طوری که نقش فعال و پیچیده‌ای در تنظیم رفتار سلول‌ها از قبیل تکامل، مهاجرت، تکثیر، تعیین شکل و متابولیسم آنها ایفا می‌کند(۳و۴). مشخص‌ترین نقش‌های ECM ایجاد سوبسترایی برای مهاجرت سلولی و همچنین اتصال سلول‌های اپی‌تلیوم به یکدیگر است که به کمک کلاژن نوع IV در غشای محدود کننده داخلی شبکیه و نیز سلول‌های جام بینایی بوقوع می‌پیوندد(۷-۵). همچنین، اهمیت دیگر عناصر رشته‌ای ماتریکس خارج سلولی می‌تواند کنترل میزان جریان خون در بافت‌های در حال تکامل چشم باشد(۸ و۹). که زنجیره‌های آلفا ۱ تا آلفا ۳ کلاژن نوع IV از آن جمله است. علاوه بر اهمیت ماتریکس خارج سلولی که به طرز چشمگیری از وجود کلاژن نوع IV سود می‌برد، در فیزیولوژی طبیعی چشم و بینایی نیز تأکید شده‌است به‌طوری که شفاف‌بودن محیط‌های شفاف چشم مثل قرنیه، وابسته به

۱. مشهد، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی ۲. زابل، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

۳. قزوین، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی ۴. زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

تکامل صحیح اجزای ماتریکس خارج سلولی و آرایش ویژه الیاف کلاژن موجود در آن است (۱۰ و ۱۱). این پروتئین خاص که در مورفوژنز، مهاجرت و اتصال‌های سلولی شبکیه در حال تکامل اهمیت دارد می‌تواند بر اساس زمان پیدایش و ساخته‌شدن آن باز گوکننده وقایع تکاملی و تمایز لایه‌های شبکیه محسوب شود(۱۲ و ۱۳). به عبارت دیگر می‌توان گفت که مورفوژنز بافت‌های جنینی از جمله شبکیه، حاصل مجموعه مکانیسم‌های درون سلولی است که سیگنال‌های خارجی تعدیل آن را بر عهده دارند(۱۴ و ۱۵). در حقیقت فاکتورهای رشد و اجزای ماتریکس خارج سلولی که به آنها اشاره شد به عنوان واسطه‌ای عمل می‌کنند که تمایز و تکامل را به دنبال دارد. چون کلاژن نوع IV یکی از مهم‌ترین عناصر تشکیل‌دهنده ماده خارج سلولی و ساختمان‌های غشای پایه در ارگان‌های زنده محسوب می‌شود، هدف این پژوهش رد یابی کلاژن نوع IV در تکامل جام بینایی و شکل گیری شبکیه است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به شیوه تجربی و با آزمایش بر ۲٤ موش ماده نژاد Balb/c انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد محیطی (دمای $^{\circ}$ ۲۵-۲۳، رطوبت ۵۵-۵۰٪ و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته) و غذایی نگهداری شدند. موش‌های ماده در قفس‌های سه تایی با موش نر (دو موش ماده و یک موش نر) قرار داده شده و روز بعد از نظر تشکیل پلاک واژینا بررسی شدند. وجود پلاک واژینا در هریک از آنها به منزله روز صفر حاملگی تلقی شد. سپس، در هریک از روزهای ۱۳ تا ۱۸ حاملگی، سر جنین‌های مربوط به ۲ موش پس از بیهوشی جمع‌آوری و در ثابت‌کننده فرمالین قرار داده شد. مشابه این عمل در نوزادان موش‌های باقیمانده در روزهای ۱ تا ۵ پس از تولد انجام شد. بدین ترتیب که در هر یک از این روزها چشم‌های نوزادان متعلق به ۲ موش مطابق روش‌های یاد شده آماده‌سازی شد. سرانجام از همه نمونه‌های جنینی و نوزادی بلوک‌های پارافینی و برش‌هایی با ضخامت ۸ میکرون تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی و آب‌دهی نمونه‌ها برای اعمال تکنیک ایمونوهیستوشیمی آماده شدند.

تکنیک ایمونوهیستوشیمی در این تحقیق روش آویدین-بیوتین پراکسیداز بود. برش‌هایی که از کره چشم در جنین‌ها و نوزادان بدست آمده به میزان دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر تریس(حاوی ۱/۵٪ کلرور سدیم در۷/٤ pH=) شستشو داده شد. برای بلوک آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی، ابتدا به مدت ۳ ساعت، برش‌ها در مجاورت تریتون۰/۳٪ X100 در بافر تریس و goat serum و پس از آن برای مهار فعالیت آندوژناز پراکسیداز به مدت یک ساعت در محلول ۳٪ آب اکسیژنه در متانول قرار داده شد و در ادامه با پادتن کلاژن IV (کونژوگه با Horse radish peroxidase) با رقت ۱ به ۵۰ به مدت ۲٤ ساعت انکوبه و سپس دوباره در محلول تریس بافر حاوی تریتون ۳٪ و سرم ۲٪ قرار داده شد و ۳ بار، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر تریس شستشو داده شد. پس از این مرحله، برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض Di aminobenzidine حاوی ۰/۰۳٪ آب اکسیژنه قرار گرفتند و در نهایت پس از شستشوی نمونه‌ها برای ایجاد رنگ زمینه از هماتوکسیلین استفاده شد. برش‌ها با ژل گلیسرول تثبیت و با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

آنالیز آماری: داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 13 و آزمون کروسکال والیس و من‌ویتنی با سطح معنی داری P<۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

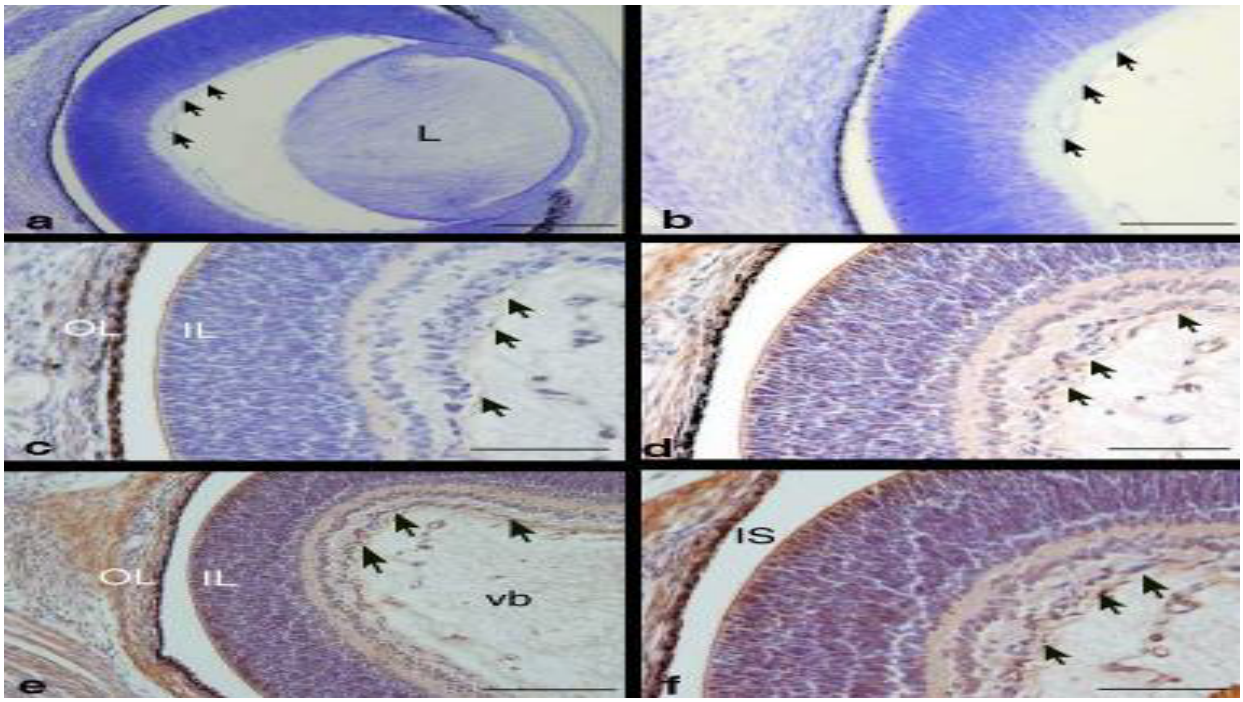
مطالعه ما بر اساس تصویرهای موجود نشان داد که اگر چه تا روز پانزدهم جنینی غشای پایه محدودکننده داخلی شکل می‌گیرد اما تا آن موقع اثری از کلاژن نوع IV در این ناحیه و سایر بخش‌های در حال تکامل شبکیه دیده نمی‌شود. علاوه بر آن در هیچیک از بخش‌های لایه‌های خارجی و داخلی جام بینایی که سازنده شبکیه هستند نیز اثری از این واکنش به چشم نمی‌خورد و سلول‌ها به صورت یکسان با رنگ زمینه آبی در لایه‌های نسبتاً مشخص اما تمایز نیافته دیده می‌شوند(شکل‌های a و b). اولین علائم ظهور کلاژن

از اواخر روز پانزدهم جنینی در ماتریکس خارج سلولی سلول‌های گانگلیونی و جسم زجاجیه بصورت ضعیف بارز شد(شکل c). به‌طوری‌که در روز شانزدهم جنینی واکنش خفیفی در غشای محدود کننده داخلی، غشای محدود کننده خارجی و رگ‌های هیالوئید موجود در جسم زجاجیه به ثبت رسید (شکل d). به‌علاوه، توزیع پراکنده کلاژن نوع IV در اپی‌تلیوم رنگدانـــه‌ای مشـاهده شد. با تکامل چشم، این واکنش در روزهای بعد نیز ادامه یافت و به تدریج شدت آن افزوده شد. به‌گونه‌ای که تا روز سوم پس از تولد به حداکثر رسید ولی پس از آن تغییر نکرد (شکل‌های e و f). علاوه بر این نشان داده شد که از نواحی ذکر شده، بیشترین شدت رنگ‌پذیری مربوط به غشاء محدودکننده داخلی و اپی‌تلیوم رنگدانه‌دار بوده‌است(جدول ۱).

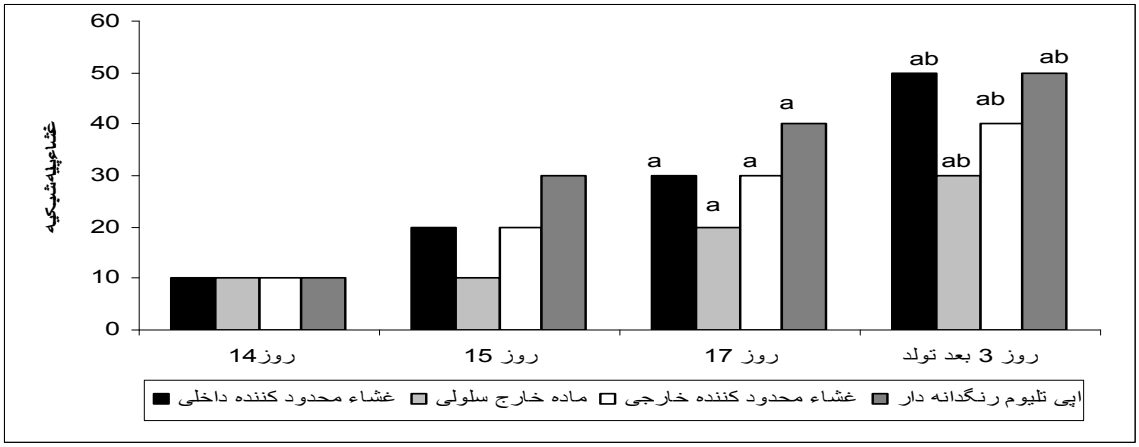
جدول ۱: نحوه توزیع کلاژن نوع IV در تکامل شبکیه موش

روز جنینی	غشای محدودکننده داخلی	ماده خارج سلولی	غشای محدودکننده خارجی	اپی تلیوم رنگدانه دار
۱۴	(–)	(–)	(–)	(–)
۱۵	(+)	(–)	(+)	(++)
۱۷	(++)	(+)	(++)	(+++)
۳ روز پس از تولد	(++++)	(++)	(+++)	(++++)

درجه بندی براساس شدت واکنش کلاژن نوع IV: عدم واکنش (–)، ضعیف (+)، ملایم (++)، شدید (+++) و بسیار شدید (++++) در نظر گرفته شده است.



شکل – شماره a) مقطع مربوط به شبکیه در روز پانزدهم جنینی که عدسی (l) نیز دیده می شود. شماره b) نیز مربوط به همین روز و با درشتنمایی بیشتر که هیچگونه واکنشی نسبت به آنتی بادی کلاژن نوع IV دیده نمی شود (پیکانها). شماره – c) مربوط به روز شانزدهم است که لایه خارجی شبکیه (ol) و لایه داخلی (il) نزدیک به هم قرار دارد. شماره d متعلق به روز هجدهم است که بر واکنش غشای پایه بطور چشمگیری افزوده شده است. شماره های e و f) مربوط به روز سوم پس از تولد است که شدت واکنش در غشاء محدود کننده و اپی تلیوم رنگدانه ای افزایش یافته است. بعلاوه در این مرحله در استرومای زجاجیه نیز واکنش خفیفی مشاهده گردید (Scale bar =۱۰۰μ m)
در این تصاویر L : عدسی، Ol : غشاء محدودکننده خارجی، Il: غشاء محدود کننده داخلی و Vb : ویتروس بادی نشانه گذاری شده است.



شکل ۲: آنالیز ایمونوهیستوشیمیایی کلاژن نوع IV در خلال شکل گیری شبکیه موش a: تفاوت معنی‌دار نسبت به روز چهاردهم جنینی b: تفاوت معنی دار نسبت به روز پانزدهم جنینی ($P \leq 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که اولین واکنش‌های مربوط به ظهور کلاژن از حدود روز شانزدهم جنینی به بعد به‌صورت ضعیف قابل ردیابی است به‌طوری‌که در روز هفدهم در بخش‌های مختلف از جمله غشای محدود کننده داخلی، ماده خارج سلولی سلول‌های گانگلیونی و همچنین غشای پوشاننده خارجی لایه داخلی جام بینایی بروز می‌کند. بیان کلاژن نوع IV در این مرحله نشانگر اهمیت میانکنش‌های خاص سلولی در لایه‌های شبکیه و تمایز آنها به رده‌های مختلف سلولی در این لایه است که نقش تعیین کننده در تکامل شبکیه از خود بروز می دهد (۱۶). با پی‌گیری بروز واکنش‌ها و براساس شدت رنگ‌آمیزی نشان داده شد که دامنه فعالیت میانکنش ها در روزهای بعد نیز ادامه یافته و به تدریج بر شدت آن افزوده می شود به گونه‌ای که تا روز سوم پس از تولد به بالاترین حد خود می‌رسد اما پس از آن تغییر چشمگیری رخ نمی‌دهد. در مطالعه مشابهی نشان داده شد که ظهور کلاژن نوع IV از ۱۵/۵ روزگی شروع و تا روز ۴ پس از تولد ادامه می‌یابد(۱۷). بر اساس تقسیم‌بندی مرحله‌های تکاملی جوندگانی از قبیل موش نشان داده‌شد که تکامل نهایی عضو بینایی و تمایز سلول‌های شبکیه از حالت نابالغ به سمت سلول‌های تخصص یافته در هفته آخر زندگی جنینی و روزهای اولیه پس از تولد بوقوع می‌پیوندد (۱۸). از آنجا که شبکیه به‌صورت یک لایه نورواپی‌تلیال در مراحل اولیه تکامل جنینی شروع به تمایز می‌کند، طبعاً با فرورفتن دو لایه از جام بینایی در یکدیگر و اتصال آنها به هم، ساختار شبکیه کامل می‌شود(۱۹). لایه داخلی جام بینایی از یک غشای پایه محدود کننده داخلی پوشیده شده که با جسم زجاجیه‌ای مجاور است در حالی‌که غشای محدود کننده خارجی این لایه از شبکیه با سطح داخلی لایه خارج جام بینایی مجاور را تشکیل می‌دهد(۲۰). شکل‌گیری غشای پایه چه در سطح داخلی و چه در سطح خارجی لایه داخلی جام بینایی مستلزم بیان پروتئین‌های خاصی است که کلاژن نوع IV از عمده‌ترین آنهاست(۲۱). بنابراین، با در نظر گرفتن این موضوع که حذف کلاژن نوع IV می‌تواند به شکل نگرفتن و نقص غشای پایه منجر شود، می‌توان به اهمیت وجود این پروتئین خاص در غشای پایه پی برد(۲۲). موضوع مهم‌تر این‌که غشای پایه پوشاننده داخلی‌ترین لایه سلول‌های شبکیه (سلول‌های گانگلیونی) مجاورت این لایه را با جسم زجاجیه‌ای در حال تکامل ممکن می‌سازد و از نظر تبادل یون‌ها و مولکول‌ها و سیگنال‌های تکاملی به تمایز این قسمت‌ها کمک می‌کند(۲۳). این موضوع به قدری مهم است که در بعضی از گونه‌های جهش یافته یا ترانس ژنی که کلاژن بخوبی بیان نمی‌شود، نقص بینایی بوجود می‌آورد(۲۴). ردیابی کلاژن در ماده خارج سلولی مربوط به سلول‌های شبکیه خصوصاً

در لایه گانگلیونی و ظهور فراوان آن در بین سلول‌های این لایه نشان داد که تمایز این لایه مهم شبکیه علاوه بر این‌که به غشای محدودکننده داخلی وابسته است، از ماده خارج سلولی سرشار از کلاژن نوع IV نیز بی نیاز نیست. علاوه بر این غشای پوشاننده خارجی که لایه داخلی جام بینایی را با لایه خارجی سازنده اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکیه مجاور می کند تضمین کننده میانکنش‌های سلولی مهم و گسترده‌ای است که به تشکیل و تمایز سلول‌های میله‌ای و مخروطی از یک سو و شکل‌گیری اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای از سوی دیگر منتهی می‌شود(۲۵). بنابراین هر گونه اختلال در بروز کلاژن نوع IV که به روند تکامل طبیعی جام بینایی مربوط باشد غشای پایه این ناحیه را نیز تحت متأثر کرده و به همین دلیل ممکن است، ناهنجاری‌هایی از قبیل نقص در پیدایش طبیعی اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای یا تمایز نادرست سلول‌های میله‌ای و مخروطی شبکیه را به دنبال داشته باشد(۲۶). بنابراین، طبیعی به نظر می‌رسد که وقایع مهم تکاملی شبکیه به بروز تغییر مولکولی گسترده‌ای وابسته باشد که علاوه بر قندها و پروتئین‌های مختلفی از قبیل لامی‌نین و فیبرونکتین نقش انواعی از کلاژن بخصوص کلاژن نوع IV را در این فرایند غیرقابل انکار نماید. به عبارت‌دیگر می‌توان‌گفت که تکامل شبکیه نیاز به اجزای‌مهم خارج سلولی مربوط به آن دارد که غشاهای محدودکننده شبکیه و ماده خارج سلولی از آن جمله‌اند و برای این‌که این اجزا در شبکیه کامل شوند به ترکیب‌های سازنده خود متکی هستند تا بتوانند نقش تعیین‌کننده در تمایز لایه‌های سلولی داشته‌باشند که در میان کلاژن نوع IV نقشی کلیدی دارد.

تشکر قدردانی: این مطالعه در قالب یک طرح پژوهشی بین دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی زابل انجام شد و هزینه‌های آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه زابل تامین شده‌است. لذا، بدین‌وسیله از مساعدت‌های به عمل آمده در این زمینه از طرف هر دو دانشگاه تقدیر می‌شود. همچنین، از خدمات تکنیکی خانم متجدد در آزمایشگاه تخصصی بافت‌شناسی گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می‌شود.

منابع

1. Peterson PE, Pow CS, Wilson DB, Hendrickx AG. Localisation Of Glycoproteins And Glycosaminoglycans During Early Eye Development In The Macaque. J Anat 1995; 186 (1):31-42.

2. Halfter W, Dong S, Schurer B, Osanger A, Schneider W, Ruegg M, Cole GJ.Composition, Synthesis, And Assembly Of The Embryonic Chick Retinal Basal Lamina.Dev Biol 2000; 220(2):111-28.

3. Halfter W, Dong S, Dong A, Eller AW, Nischt R. Origin And Turnover Of ECM Proteins From The Inner Limiting Membrane And Vitreous Body. Eye 2008; 22(10):1207-13.

4. Aisenbrey S, Zhang M, Bacher D, Yee J, Brunken WJ, Hunter DD. Retinal Pigment Epithelial Cells Synthesize Laminins, Including Laminin 5, And Adhere To Them Through Alpha3- And Alpha6-Containing Integrins. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47(12):5537-44.

5. Lin WL. Immunogold Localization Of Extracellular Matrix Molecules In Bruch's Membrane Of The Rat. Curr Eye Res 1989; 8(11):1171-78.

6. Halfter W, Dong S, Balasubramani M, Bier ME. Temporary Disruption Of The Retinal Basal Lamina And Its Effect On Retinal Histogenesis. Dev Biol 2001; 238(1):79-96.

7. Snead DR, Cullen N, James S, Poulson AV, Morris AH, Lukaris A, Scott JD, Richards AJ, Snead MP. Hyperconvolution Of The Inner Limiting Membrane In Vitreomaculopathies. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2004; 242(10): 853-62.

8. Halfter W, Von Boxberg Y. Axonal Growth On Solubilized And Reconstituted Matrix From The Embryonic Chicken Retina Inner Limiting Membrane. Eur J Neurosci 1992; 4(9):840-52.

9. Miceli MV, Newsome DA. Effects Of Extracellular Matrix And Bruch's Membrane On Retinal Outer Segment Phagocytosis By Cultured Human Retinal Pigment Epithelium. Curr Eye Res 1996; 15(1):17-26.

10. Larson A, Kino J, Hayashi T, Kao WW. Distribution Of Collagen IV In Human Ocular Tissues. Ishizaki M, Westerhausen- Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34(9):2680-89.

11. Sarthy V. Collagen IV Mrna Expression During Development Of The Mouse Retina: An In Situ Hybridization Study. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34(1):145-52.

12. Jo N, Ju M, Nishijima K, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT, Mailhos C.Inhibitory Effect Of An Antibody To Cryptic Collagen Type IV Epitopes On Choroidal Neovascularization. Mol Vis 2006; 12:1243-49.

13. Kern P, Laurent M, Lim A, Regnault F, Courtois Y. Interaction Of Bovine Epithelial Lens (BEL) Cells With Extracellular Matrix (ECM) And Eye-Derived Growth Factor (EDGF). II. Partial Re-Expression Of The Differentiated Collagen Distribution And Phenotype. Exp Cell Res 1983; 149(1):85-93.

14. Ponsioen TL, Van Luyn MJ, Van Der Worp RJ, Van Meurs JC, Hooymans JM, Los LI. Collagen Distribution In The Human Vitreoretinal Interface. Invest Ophthalmol Vis Sci 2008; 49 (9):4089-95.

15. Tsilibary EC. Microvascular Basement Membranes In Diabetes Mellitus. J Pathol 2003; 200(4):537-46.

16. Bradshaw AD, Mcnagny KM, Gervin DB, Cann GM, Graf T, Clegg DO. Integrin Alpha 2 Beta 1 Mediates Interactions Between Developing Embryonic Retinal Cells And Collagen. Development 1995; 121(11):3593-602.

17. Xiaoyang B, David J.D, Yi-Chinn W, Douglas BG.Disease Developmental Distribution Of Collagen IV Isoforms And Relevance To Ocular Matrix Biology 2009;28:194- 201.

18. Boot-Handford RP, Kurkinen M, Prockop DJ. Steady-State Levels Of Mrnas Coding For The Type IV Collagen And Laminin Olypeptide Chains Of Basement Membranes Exhibit Marked Tissue-Specific Stoichiometric Variations In The Rat. J Biol Chem 1987; 262(26):12475-78.

19. Uemura A, Kusuhara S, Wiegand SJ, Yu RT, Nishikawa S. Tlx Acts As A Proangiogenic Switch By Regulating Extracellular Assembly Of Fibronectin Matrices In Retinal Astrocytes. J Clin Invest 2006; 116(2):369-77.

20. Das A, Frank RN, Zhang NL, Turczyn TJ. Ultrastructural Localization of Extracellular Matrix Components In Human Retinal Vessels And Bruch's Membrane. Arch Ophthalmol 1990; 108(3):421-29.

21. Scheiffarth OF, Kampik A, Günther H, Von Der Mark K. Proteins Of The Extracellular Matrix In Vitreoretinal Membranes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1988; 226(4):357-61.

22. Okada M, Ogino N, Matsumura M, Honda Y, Nagai Y.Histological and Histochemical Study Of Idiopathic Epiretinal Membrane. Ophthalmic Res 1995; 27(2):118-28.

23. Connolly SE, Hores TA, Smith LE, D'Amore PA. Characterization Of Vascular Development In The Mouse Retina. Microvasc Res 1988; 36(3):275-90.

24. Canfield AE, Schor AM, Schor SL, Grant ME. The Biosynthesis Of Extracellular-Matrix Components By Bovine Retinal Endothelial Cells Displaying Distinctive Morphological Phenotypes. Biochem J 1986; 235(2):375-83.

25. Ito M, Nakashima M, Tsuchida N, Imaki J, Yoshioka M. Histogenesis Of The Intravitreal Membrane And Secondary Vitreous In The Mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48(5):1923-30.

26. Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement Membrane Collagen: Degradation By Migrating Endothelial Cells. Science 1983; 221(4607):281-83.

The Key Role of Type IV Collagen in Developing Retinal Basement Membrane in Mouse

*Nikravesh M.R.(Ph D) [1] -Jalali M.(Ph D)[1] - Moin A.A(Ph D) [2] - Karimfar M.H.(Ph D)[3]- Refighdoost H. (Ph D)[4] - Mohammadi Sh. (MS)[1]

***Corresponding Address:** Department of Anatomy and Cellular biologic, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, IRAN

E-mail: Nikravesh@hotmail.com

Received: 12/May/2009 Accepted: 5/Oct/2009

Abstract

Introduction: Basement membranes are specialized extracellular matrices serve as development, proliferation and substrates for migration. Collagen fibers specially type IV, are the most important part of this area. As retina is one of the target organs in diabetes mellitus and diabetic retinopathy and diabetic nephropathy are major cause of end stage - renal and retinal diseases and resulting in increased in morbidity and mortality of effected individuals, therefore early diagnosis leads to better treatment.

Objective: Investigation the appearance and distribution of collagen IV during gestational days and early postnatal period.

Materials and Methods: 24 intact female Balb/c mice were kept under normal nutrition and environment condition. After mating, vaginal plug was assumed as zero day of pregnancy. From (13th-18th) days, gestation pregnant mice were sacrified and their embryos as well as pups from 1st to 5th days were collected. For histochemichal studies, the head of specimens were fixed, histological preparation was done and by using monocolonal antibody against for tracing of collagen type IV were carried out.

Results: Our finding revealed that amount of collagen IV in internal limiting membrane (ILM) and extra cellular matrix (ECM) of the retina appearance on embryonic 16th day and increase continuously until end stage of embryonic life. In addition, strong labeling was observed until 3rd day of postnatal period but these reactions did not increase significantly after these periods.

Conclusion: These findings indicate that retinal development is dependent on different proteins by special regards specially collagen IV.

Key words: Collagenases/ Evolution/ Extracellular Matrix/ Mice/ Retina

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 72, Pages: 56-62

1. Department of Anatomy and Cellularbiologic, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, IRAN 2. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, IRAN 3. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Ghazvin University of Medical Sciences, Ghazvin, IRAN 4. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, IRAN