

بررسی تغییرات گلیکوپروتئین های سطح سلولی ماکروفاژهای ریه در بیماری های فیروز ریوی

دکتر ابوالفضل برخورداری*، پروفسور جان مک کلور^۱

چکیده

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

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

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

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

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

مقدمه

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

سلول های بیگانه خوار یا ماکروفاژها بیش از ۱۰۰ سال پیش

*- نویسنده مسئول: استادیار گروه بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت
تلفن: ۰۳۵۱ ۸۲۴۵۴۴۶ - نامبر: ۰۳۵۱ ۸۲۴۵۴۴۲

Eamil:abc1340@yahoo.co.uk
- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
- استاد گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه منچستر، انگلستان
تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۴/۹/۳

افراد طبیعی و مبتلا می باشد.

روش بررسی

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

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

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

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

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

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

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

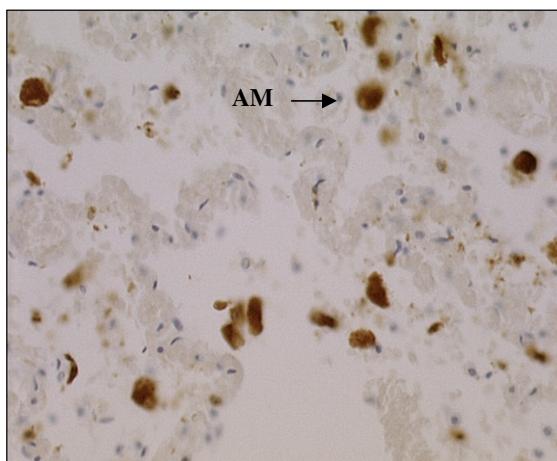
در این مطالعه از روش هیستوشیمی پس از بهینه سازی به روش استاندارد به شرح ذیل استفاده گردید^(۱۸,۱۹) نمونه های قالب گیری شده در پارافین جامد توسط میکروتوم به ضخامت پنج میکرون مقطع گیری شده و سپس بر روی لام های از قبل آماده شده (APES-Coated slides) قرار داده شدند^(۲۰) به طوری که پس از قرار دادن اسلاید ها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

نتایج

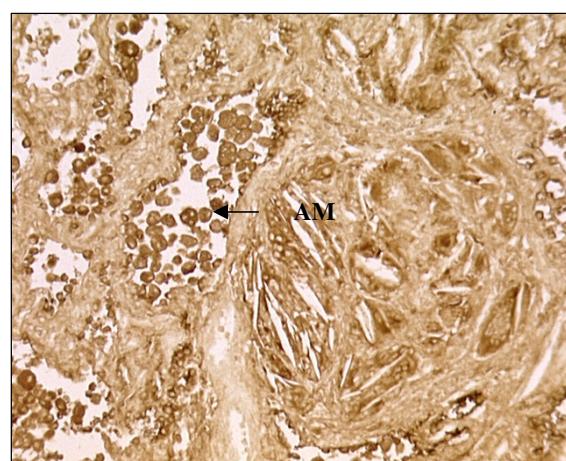
یافته های مطالعه نشان دادند که تعداد سلول های ماکروفاز در ریه افراد طبیعی کم و اندازه آنها کوچک بودند در حالی که در بیماران مبتلا تعداد سلول های ماکروفاز افزایش یافتند. نمونه های کنترل در هر دو روش لکتین هیستوشیمی و ایمنوهیستوشیمی در همه نمونه ها منفی بودند. به منظور افزایش اعتبار و روایی، ابتدا ده درصد از اسلامیدهای مورد پژوهش به روش نمونه گیری تصادفی تعیین و روایی درونی و بیرونی آن مورد بررسی قرار گرفت به منظور تعیین روایی بیرونی ابتدا اسلامیدها توسط محقق و سوپر وایزر به صورت جداگانه با میکروسکوپ مشاهده و نتایج در جداول جداگانه ثبت گردیدند. نتایج حاصله نشان داد که احتمال توافق و ضریب تصحیح در سطح $0/01$ بین نتایج دو مشاهده گر $0/951$ بوده اند بالا بودن ضریب تصحیح یانگر معنی دار بودن روایی بیرونی می باشد به منظور تعیین میزان روایی درونی اسلامیدهای انتخاب شده کدگذاری و در سه زمان متفاوت و به فاصله یک ماه از هم توسط پژوهشگر مشاهده و نتایج در جدول ثبت شدند. پس از مقایسه نتایج با استفاده از تست آماری ضریب همبستگی میزان روایی درونی بسیار بالا بود به طوری که ضریب تصحیح بین دفعه اول و دوم برابر با $0/965$ ، بین دفعه اول و سوم $0/974$ و بین دفعه دوم و سوم $0/984$ بودند.

نتایج نشان دادند که نوع و میزان قند موجود بر روی سطح

می دهیم و بعد از آن اسلامیدها را به آرامی با TBS شسته و آنها در محلول TBS (سه مرحله و هر مرحله ۵ دقیقه) عبور داده شدند. در ادامه اسلامیدها را در محلول DAB (۲۸۰ میلی لیتر TBS و ۲۰ میلی لیتر DAB و ۴۵ میکرولیتر هیدروژن پروکسیداز) برای مدت ۵ دقیقه قرار تا رنگ مربوطه به صورت قهوه ای متمایز گردد. به منظور افتراق هسته سلول با سیتوپلاسم اسلامیدها را با آب شسته و آنها را داخل محلول متیل گرین (۳۰ ثانیه) قرار داده و پس از شستن مجدد با آب آنها را به منظور آبگیری داخل الکل در سه مرحله (الکل 70 درجه و دو مرحله الکل مطلق) قرار داده شدند و در نهایت آنها را از محلول گزینن عبور داده تا الکل آن شسته و جذب گردد. مقطع رنگ شده بافت موجود بر روی لام به وسیله ماده ای به نام XAM پوشانده و بر روی آن لامل قرار میدهیم. اسلامیدهای آماده شده با استفاده از میکروسکوپ نوری (Leit 2 Dalun 20 EB) مشاهده و شدت باند شدن لکتین به صورت ۱ (ضعیف)، ۲ (متوفی)، ۳ (قوی) و ۴ (بسیار قوی) و $+$ (منفی) رتبه بندی گردید. گرچه شکل، اندازه و محل سلول های ماکروفاز مشخص و قابل افتراق با سایر سلول های موجود در فضای آلوئولی می باشد ولی به منظور تشخیص قطعی آنها از مارکر اختصاصی CD-68 استفاده گردید. شمارش سلول های ماکروفاز با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم افزار کامپیوتری و حداقل در ده میدان انجام گردید میانگین تعداد سلول ها توسط کامپیوتر محاسبه می گردید.



شکل ۱: فرد مبتلا به فیروز ریه



شکل ۲: ماکروفازهای ریه در فرد طبیعی

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

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

بحث و نتیجه گیری

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

References

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