مطالعه گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول وترکیبهای مادهٔ خارج سلولی در روند تکامل قرنیه

محمدرضا عرب .Ph.D☆♦، طاهره طلائی خوزانی .Ph.D★، علیرضا فاضل .Ph.D★

☆ دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکدهٔ پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکدهٔ پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکدهٔ پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: زاهدان، صندوق پستی ۳۹۶-۹۸۱۳۵، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** شناسایی قندهای انتهایی سطح سلول و ترکیبهای ماتریکس خارج سلولی در طی روند تکامل قرنیه

* **مواد و روشها:** پنجاه رت باردار انتخاب شده و زمان مشاهده پلاک واژینال به‌عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. نمونه‌های جنینی از روز یازدهم تا بیستم و نوزادان یک تا پانزده روزه جمع‌آوری شدند. بلوکهای پارافینی تهیه شده با ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر بریده شدند و سپس مقاطع با روشهای هیستوشیمی (آلسین بلودر pHهای مختلف به‌همراه روش تغییر بحرانی غلظت یون منیزیم و تری‌کروم ماسون) و لکتینی (S/PNA، BSA1-B4، PNA) رنگ‌آمیزی شدند. سپس مقاطع براساس شدت رنگ‌آمیزی و به صورت مجزا رتبه‌بندی شدند. برای مطالعه آماری از تست Mann-whithney استفاده شد.

* **یافته‌ها:** واکنشهای لکتینی حضور قندهای انتهایی Gal/GalNac و D-Gal را در قرنیه در حال تکامل نشان داد. کاربرد آنزیم سیالیداز تأثیری در واکنش قرنیه به لکتین PNA ایجاد نکرد. مطالعات هیستوشیمی وجود غلظتهای متفاوتی از اسید هیالورونیک، کندروایتین سولفات، ترکیبهای قندی خنثی، گلیکوز آمینوگلیکانهای اسیدی کربوکسیله و سولفاته و عناصر رشته‌ای ماتریکس مثل رشته‌های کلاژن را در قرنیه نشان داد. افزایش ضخامت رشته‌های کلاژن در قرنیه از خلف به قدام بود. با وجود اختلاف شدت رنگ‌آمیزی میان اجزای ماتریکس خارج سلولی، مطالعات آماری تنها برای ترکیبهای قندی خنثی اختلاف معنی‌داری را بین روزهای بررسی نشان داد ($P<0.05$).

* **نتیجه‌گیری:** به‌نظر می‌رسد در قرنیه زمان ظهور ترکیبهای قندی سطح سلول و ترکیبهای مادهٔ خارج سلولی و همین‌طور میزان آنها از یک الگوی مکانی-زمانی تبعیت می‌کند که مجموعه تغییرات هماهنگ فوق زمینه ساز ریخت زائی و وقایع ریخت شناختی مربوط به آن در طی تمایز قرنیه است.

گل واژگان: قرنیه، قند انتهایی، گلیکوکونژوگه، ماتریکس خارج سلولی، گلیکوز آمینوگلیکان

مقدمه

قرنیه یکی از محیطهای شفاف و غیرعروقی کرهٔ چشم است که از اکتودرم سطحی منشأ می‌گیرد (۱، ۲). قرنیه پس از تمایز عدسی شکل می‌گیرد؛ بدین‌ترتیب که اپیتلیوم قرنیه، استرومای اولیه‌ای را ترشح می‌کند که محتوی کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان است. سلولهای ستیغ عصبی در فضای میان حباب عدسی (LV[1]) و استرومای اولیه، اندوتلیوم قرنیه را به‌وجود می‌آورند. این اندوتلیوم هیالورونان را به داخل استرومای اولیه، ترشح می‌کند که موجب اتساع آن شده و استرومای اولیه را برای ورود سلولهای مهاجر ستیغ عصبی آماده می‌سازد. اندوتلیوم پس از استقرار رشته‌های عصبی در قرنیه، تحت تأثیر تیروکسین ترشح شده از غدهٔ تیروئید، آنزیم هیالورونیداز را سنتز و ترشح می‌کند که مسئول تراکم و شفافیت قرنیه است (۳، ۴).

گلیکوزآمینوگلیکانها و اجزای رشته‌ای ماتریکس خارج سلولی نقش بسیار با اهمیتی در سازمان‌بندی استرومای قرنیه و چگونگی تمایز کراتوسیتها دارند (۳). اجزای ماتریکس خارج سلولی نه تنها وظیفهٔ حمایت از سلولها را به‌عهده دارند؛ بلکه برای انجام اعمال اختصاصی آنها نیز بسیار ضروری هستند (۵) و در تعدیل میان کنشهای سلولی به هنگام مورفوژنز بافتی دخالت دارند (۵، ۶، ۷). یکی از مکانیسمهای هیستوژنز بافتی، تماس فیزیکی میان سلولها در طی تکامل جنینی است. واسطه این تماس فیزیکی ترکیبات قندی سطح سلول و مخصوصاً قندهای انتهایی آنها مثل فوکوز و گالاکتوز و اسید سیالیک است (۸، ۹). سلولهای جنینی به هنگام تمایزهای بافتی، تغییراتی در قندهای انتهایی گلیکولیپیدها و گلیکو پروتئینهای خود به‌وجود می‌آورند که این تغییرات همزمان با حادثهٔ تکاملی ویژه‌ای در اعضا همراه است (۱۰). باوجود تحقیقات فراوانی که تاکنون برای شناسایی اجزای ماتریکس خارج سلولی و گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول صورت گرفته است؛ هنوز اطلاعات ما در این زمینه مهم بسیار محدود است (۱۱، ۱۲). آنچه موضوع را جالب توجه می‌کند تغییرهایی است که پس از فرآیندهای پاتولوژیک در ماتریکس خارج سلولی و قندهای انتهایی سطح سلول در بیماریهای چشمی به وجود می‌آید، به طوری که افزایش کندروایتین سولفات و کاهش اسید هیالورونیک در بیماری گلوکوم اولیه با زاویه باز[2] نشان داده شده است. همچنین کاهش میزان بینایی در بیماریهای قرنیه از به هم خوردن اجزای ماتریکس خارج سلولی است (۱۳). از آنجا که لکتینها موادی با دقت و حساسیت بالا برای شناسایی قندهای انتهایی هستند، در این مطالعه توزیع طبیعی گلیکوکونژوگه‌ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی در روند تکامل قرنیه بررسی شد. بدون شک تعیین توزیع طبیعی این ترکیبهای راه را برای درک حالات غیر طبیعی چشم و بیماریهای آن هموار می‌نماید.

مواد و روشها

پنجاه سر رت برای جفت‌گیری انتخاب شدند و زمان مشاهده پلاک واژینال به‌عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. رتها در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی، نور و تاریکی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ساعت تاریکی) و درجه حرارت ۲۴-۲۲° سانتی‌گراد و رطوبت قرار گرفتند. پس از بیهوشی عمیق، نمونه‌های جنینی از روز یازدهم تا بیستم پس از جدا شدن از جفت و پرده‌های جنینی جمع‌آوری شدند. در نوزادان یک تا پانزده روزه، چشم به دقت از سر و گردن جدا شد. نمونه‌ها در B_4G و کارنوی و بوئن تثبیت شدند و سپس مطابق روش معمول در بافت شناسی پاساژ داده شدند. مقاطع ۶-۵ میکرومتری باروشهای هماتوکسیلن ائوزین، پاس-آلسین‌بلو در pH=۲/۵، آلیسن‌بلو در pH=۱، آلسین‌بلودر pH=۵/۸ به روش تغییر بحرانی غلظت منیزیوم، تولوئیدین بلو در بافر وونول با pH=۴/۵ و تری کروم ماسون رنگ آمیزی شدند.

* لکتین هیستوشیمی

لکتینهای PNA[3] و BSA1-B4[4] (سیگما) در بافر فسفات با غلظت ۰/۱ مولار به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شدند. مقاطع پس از آبدهی و حذف پیگمان کلرید جیوه برای خنثی کردن پراکسیداز درون بافتی به مدت ۱۰-۵ دقیقه در محلول آب اکسیژنه یک درصد در متانول و سپس در اتانک مرطوب به‌مدت دو ساعت در مجاورت لکتین فوق قرار گرفتند. پس از آن در محلول بافر فسفات که محتوی ۰/۳ درصد DAB[5] و ۰/۲ درصد آب اکسیژنه بود قرار گرفتند. برای توقف واکنش DAB مقاطع ۱۰-۵ دقیقه در آب جاری شستشو و برای رنگ‌آمیزی زمینه از آلسین بلو با pH=۲/۵ استفاده شد (۸، ۱۴، ۱۵).

* روش هضم آنزیمی سیالیداز و لکتین PNA

آنزیم سیالیداز (سیگما) در pH=۵ به میزان ۰/۱ واحد در میلی‌لیتر رقیق شد. مقاطع به‌مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷° سانتی‌گراد در مجاورت آنزیم قرارگرفتند و سپس مطابق روش اشاره شده در معرض لکتین PNA قرار گرفتند (۱۶).

* روشهای آماری

مقاطع رنگ‌آمیزی شده براساس شدت رنگ‌آمیزی به صورت مجزا رتبه‌بندی (جدول ۱) و سپس جداول مربوط به هر رنگ‌آمیزی تهیه و توسط آزمون Mann-whithney تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: رتبه بندی شدت رنگ آمیزی

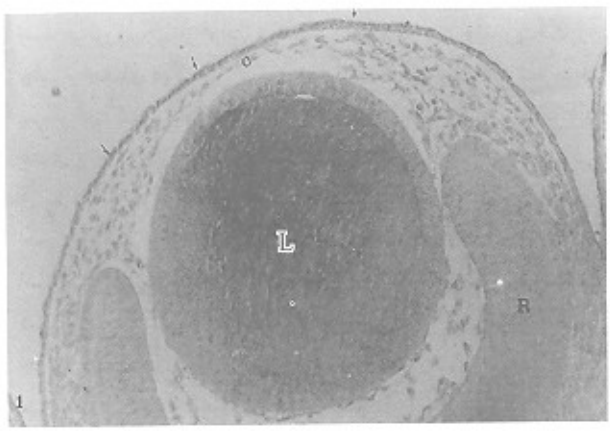
شدت رنگ آمیزی	رتبه
رنگی دیده نشد	-
شدت رنگ بسیارکم	+-
شدت رنگ کم	+
شدت رنگ متوسط	++
شدت رنگ زیاد	+++

1. Lens Vesicle
2. Primary open angle glucoma
3. Peanut aggiutinin
4. Banderia simplicifolia isolectin-B4
5. Diaminabenzidine

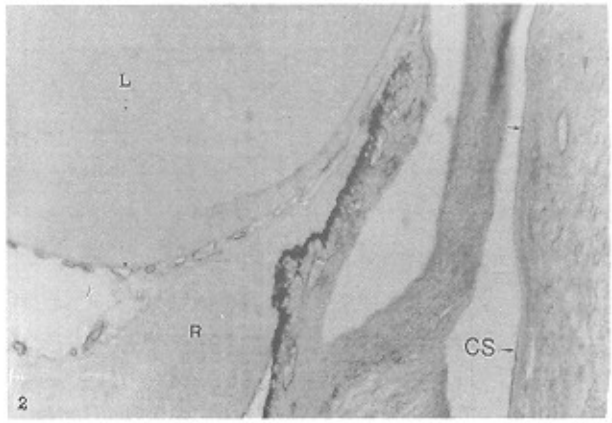
یافته‌ها

تکامل قرنیه از اکتودرم سطحی پس از تشکیل حباب عدسی آغاز می‌شود. سلولهای مهاجر ستیغ عصبی در زیر این اپیتلیوم سطحی به‌صورت سلولهای دوکی شکل به‌نظر می‌رسند که در ابتدا فواصل سلولی نسبتاً زیادی آنها را از هم دیگر جدا می‌کند.

به تدریج با کنار هم قرار گرفتن این سلولها و کاهش فضاهای بین سلولی، استرومای قرنیه تشکیل می‌شود. با تشکیل استرومای قرنیه، اندوتلیوم قرنیه نیز از سلولهای مهاجر ستیغ عصبی شکل می‌گیرد و به این ترتیب لایه‌های بومن و دسمت تشکیل می‌شوند؛ به‌طوری که در روزهای پانزدهم تا هجدهم جنینی ساختمان میکروسکپی قرنیه تکمیل می‌شود و با افزایش سن، ضخامت این لایه‌ها افزایش یافته و ماهیت اپیتلیوم قدامی به سنگفرشی مطبق غیر کراتینیزه تغییر می‌نماید (فتومیکروگرافهای ۶-۱)؛ در حالی که در روز دوازدهم جنینی، سطح راسی اکتودرم سطحی پیش ساز قرنیه به لکتین $BSA1\text{-}B_4$ واکنش نشان می‌دهد و حضور قند انتهایی D-Gal در گلیکوکونژوگه‌های آن مشخص می‌شود (فتومیکروگراف ۱).

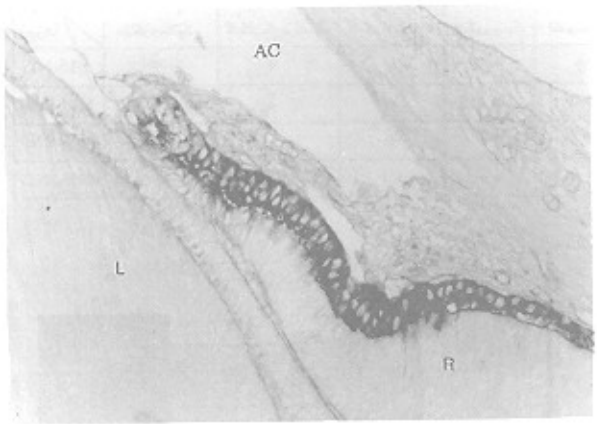


شکل ۱: نمونه روز دوازدهم جنینی: واکنش سطح راسی اکتودرم سطحی به لکتین $BSA1\text{-}B_4$ (پیکان کوچک) نشان داده شده است. (بزرگنمایی: ۲۰۰×)



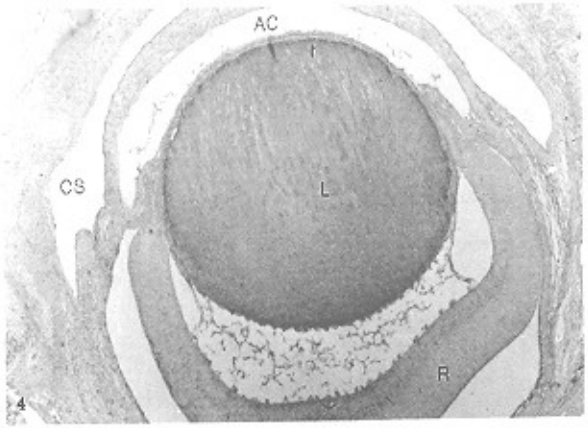
شکل ۲: نمونه روز بیستم جنینی: واکنش اپیتلیوم قدامی قرنیه و کپسهٔ ملتحمه‌ای (پیکان کوچک) به لکتین PNA نشان داده شده است. (بزرگنمایی: ۲۲۵×)

دی‌ساکارید Gal/Gal NAC در سطح رأسی اپیتلیوم قرنیه در روز بیستم جنینی به کمک لکتین PAN نشان داد که کاربرد آنزیم سیالیداز تأثیری در واکنش قرنیه به لکتین PAN ندارد؛ هر چند سینوس وریدی اسکلرا به این لکتین با شدت کمی پاسخ داد (فتومیکروگراف ۲ و ۳).



شکل ۳: نمونه روز نوزدهم جنینی: سینوس وریدی اسکلرا (پیکان کوچک) با شدت کم به لکتین (S/PNA) پس از کاربرد آنزیم سیالیداز پاسخ نشان داده است. (بزرگنمایی ۲۲۵×)

اپیتلیوم قدامی تنهابرای PAN از خود واکنش نشان داده و علاوه بر اپیتلیوم قدامی، استرومای قرنیه نیز در روز بیستم جنینی به لکتین $BSA1\text{-}B_4$ از خود واکنش نشان داد (فتومیکروگراف ۴).



شکل ۴: نمونه روز بیستم جنینی: واکنش منتشر و ضعیفی به لکتین $BSA1\text{-}B_4$ در سراسر استرومای قرنیه نشان داده شده است. (بزرگنمایی ۱۰۰×)

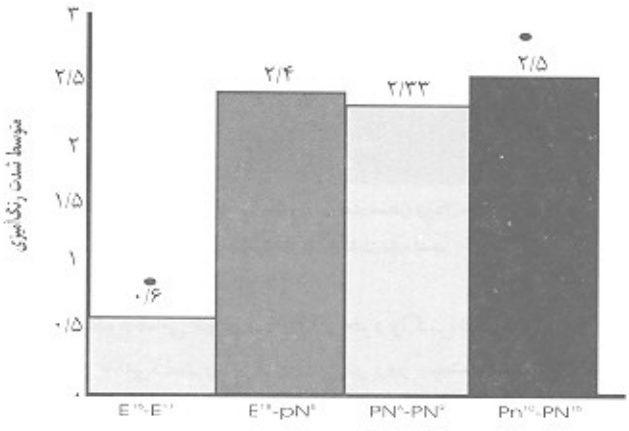
رنگ‌آمیزیهای هیستوشیمی وجود مقادیر متفاوتی از ترکیبهای ماتریکس خارج سلولی مثل اسید هیالورونیک، کندروایتین سولفات، ترکیبهای قندی خنثی، گلیکوز آمینوگلیکانهای سولفاته و کربوکسیله را در قرنیه نشان داد (جدول ۲).

با وجود تفاوت شدت رنگ‌آمیزی برای این ترکیبها، آنالیزهای آماری، تفاوت معنی‌دار در روزهای بررسی برای ترکیبهای قندی خنثی را نشان داد (Mann-whithney, $P<0.05$) (نمودار ۱، جدول ۱). همچنین با وجود گروههای کربوکسیل و سولفات

در گلیکوز- آمینوگلیکانهای قرنیه در تمام روزهای بررسی، هیچ گونه واکنش متاکرومازی در ترکیبهای ماتریکس خارج سلولی مشاهده نشد.

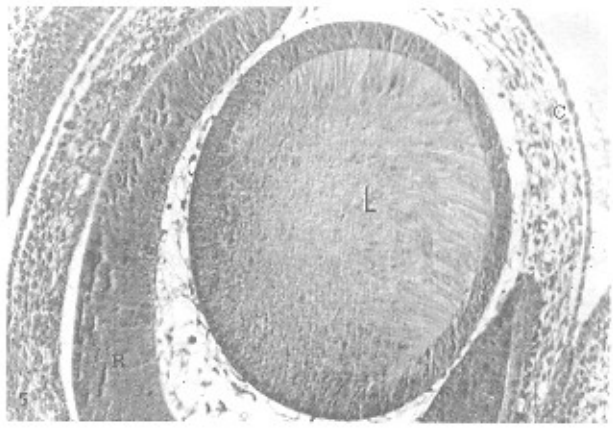
جدول ۲: درجه بندی لامها بر اساس شدت رنگ آمیزی

مواد / روزها	ترکیبات متاکرومانیک	گلیکوزآمینو گلیکان‌کربوکسیله	گلیکوزآمینو گلیکان‌سولفات	اسید هیالورونیک	ترکیبات قندی‌خنثی
E15-E17	+	+	+	++	+
E18-PN5	+	-	+	++	++
PN6-PN9	++	-	+	++	++
PN10-PN15	-	-	++	++	++



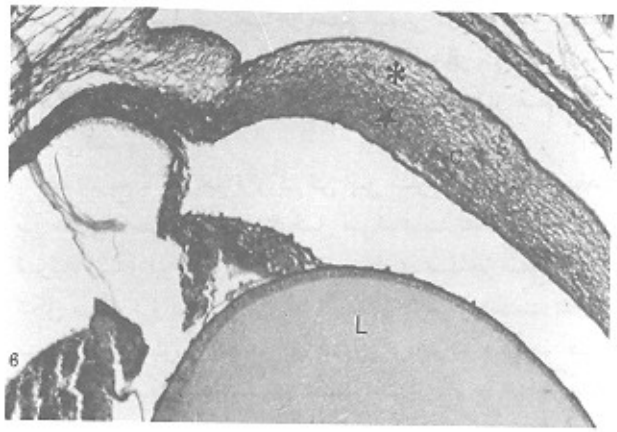
نمودار ۱: مقایسه شدت رنگ آمیزی برای ترکیبات قندی خنثی در قرنیه

رشته‌های کلاژن با رنگ‌آمیزی به روش تری‌کروم‌ماسون از روز نوزدهم جنینی به بعد در قرنیه مشاهده شد. با افزایش سن جنینی، قطر رشته‌های کلاژن نیز افزوده شد و این روند از طرف اندوتلیوم قرنیه به طرف اپیتلیوم قدامی بوده و میزان واکنش در محل لیمبوس از سایر قسمتهای قرنیه بیشتر بود (فتومیکروگراف ۵).



شکل ۵: نمونه روز دوازدهم جنینی: واکنش ضعیفی از استرومای قرنیه برای اسید هیالورونیک در قرنیه نشان داده شده است. (بزرگنمایی ۲۰۰×)

همچنین در رنگ‌آمیزی پاس ـ آلسین‌بلو نیز به نظر می‌رسد بخشهای قدام و خلف قرنیه از نظر گلیکوزآمینوگلیکانها با هم متفاوت هستند (فتومیکروگراف ۶).



شکل ۶: نمونه روز اول پس از شولد: ماهیت دوگانه شرکیبهای استرومای قرنیه در این رنگ‌آمیزی کاملاً مشخص است (l=lens, c=cornea, r=retina). (بزرگنمایی ۱۰۰×)

بحث

میزان ترکیبهای ماتریکس خارج سلولی و زمان سنتز و ترشح آنها دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای در روند کنترل شکل‌زایی در جنین است. اسید هیالورونیک از اولین ترکیبهایی است که در روند ریخت زایی چشم و اعضای دیگر مثل پوست و عروق خونی، سنتز و ترشح می‌شود. پس از آن، کندروایتین سولفات در ماتریکس خارج سلولی ظاهر شده و غشای پایه از اولین بخشهایی است که اجزای ماتریکس خارج سلولی در آن ظاهر می‌شود. کپسول عدسی و غشای بروخ در این زمینه دارای اهمیت اساسی برای تمایز صلبیه و قرنیه هستند (۲، ۶، ۱۸). وجود اسید هیالورونیک در قرنیه زمینه را برای ورود سلولهای ستیغ عصبی و تمایز آنها به کراتوسیتها آماده می‌کند؛ چراکه این مولکول با خاصیت جذب آب به‌عنوان یک بستر هیدرودینامیکی عمل می‌کند و سبب مهاجرت و استقرار سلولهای ستیغ عصبی در قرنیه می‌شود. از طرف دیگر؛ کندروایتین سولفات مولکولی مهاری است که توقف سلولهای ستیغ عصبی و کنار هم قرار گرفتن آنها را پس از رسیدن به قرنیه سبب می‌شود. مطالعه حاضر وجود هر دو ماده فوق را در قرنیه نشان داد. به نظر می‌رسد که با وجود بنیانهای کربوکسیل و سولفات در گلیکوزآمینوگلیکونهای قرنیه، این بنیانها آنقدر به هم نزدیک نیستند که بتوانند با رنگ بازی، آبی تولوئیدین متاکرومازی به وجود آورند.

دخالت گلیکوکونژوگه‌ها در فرآیند اتصال سلولها به هم، مهاجرتهای سلولی و همچنین شکل‌گیری جام بینایی نشان داده شده و از طرف دیگر تغییر قندهای انتهایی این ترکیبها در جریان ریخت زایی بافتی در چشم، قلب و گنادها مورد تأیید قرار گرفته است (۸، ۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۰). مطالعه حاضر ضمن تأکید بر نقش احتمالی این ترکیبها در روند ریخت زایی بافتی، توزیع متفاوتی از این قندها (D-Gal, Gal/GalNac) را در قرنیه نشان داد. قند انتهایی D-Gal از روز دوازدهم جنینی ظاهر شده و با افزایش سن، نه تنها در اکتودرم سطحی بلکه در استرومای قرنیه نیز ردیابی شد؛ در حالی که دی‌ساکارید

قرنیه دیده شد و پس از کاربرد آنزیم سیالیداز در سینوس وریدی اسکلرا نیز ردیابی شد که نشان دهندهٔ نقش احتمالی این دی‌ساکارید در روند تمایز قرنیه و سینوس وریدی اسکلرا است. مطالعه آماری در این تحقیق با وجود اختلاف میان تمام اجزای ماتریکس خارج سلولی، تنها برای ترکیبهای قندی خنثی اختلاف معنی‌داری را بین روزهای پانزدهم تا هفدهم جنینی با روزهای ششم تا نهم پس از تولد نشان داد ($P<0.05$) (نمودار ۱).

به نظر می‌رسد میزان سنتز، زمان سنتز و الگوی توزیع اجزای ماتریکس خارج سلولی به هنگام ریخت زایی بافتی توسط میان‌کنشهای دقیق سلول - سلول و سلول - ماده خارج سلولی تنظیم می‌شود تا مجموعه این مواد به‌صورت یک مجموعه منظم در خدمت ریخت زایی بافتی باشند. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه فرآیند افزایش قطر رشته‌های کلاژن از خلف به قدام است، لذا می‌توان تصور کرد ترکیبهای قندی خنثی نقش با اهمیتی در تشکیل فیبرهای کلاژن و کنار هم قرار گرفتن رشته‌ها داشته باشند. وجود این مواد توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (۲۱) مطالعه Bard و همکاران نیز وجود عناصر رشته‌ای مادهٔ خارج سلولی مثل کلاژن تیپهای I-IV و هپارین سولفات و کندروایتین سولفات را در قرنیه نشان داده است. محققین فوق نیز بر این نکته تأکید دارند که تمام این مواد در چگونگی آرایش رشته‌های کلاژن و تمایز کرانوسیتها نقش مهمی بر عهده دارند (۳، ۲۱).

اجزای تشکیل دهندهٔ کرهٔ چشم دارای منشأ جنینی متفاوتی هستند که طی مکانیسم بسیار حساس و پیچیده‌ای به‌وجود می‌آیند که در این میان نقش اجزای ماتریکس خارج سلولی و گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول بسیار بااهمیت است. به‌نظر می‌رسد تغییرات ماده خارج سلولی و همچنین قندهای انتهایی سطح سلول از یک الگوی ویژهٔ زمانی - مکانی تبعیت می‌کنند که این تغییرات زمینه‌ساز وقایع ریخت شناسی هنگام تمایزهای بافتی هستند. به‌نظر می‌رسد می‌توان پیشنهاد کرد که با مطالعهٔ گلیکوکونژوگه‌ها و مادهٔ خارج سلولی در ناهنجاریهای مادرزادی و مقایسه آن با موارد طبیعی تکامل بتوان به نقش و اهمیت بیشتر این ترکیبها در مسیر تکامل پی برد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بدینوسیله مراتب سپاس خود را از معاونت محترم پژوهشی و ریاست دانشکده پزشکی مشهد که بودجه مالی این طرح پژوهشی را تأمین نمودند، ابراز می‌دارند. همچنین از سازمان هلال احمر جمهوری اسلامی ایران به خاطر سفارش لکتینها و راژین‌های مربوطه تشکر می‌گردد. به علاوه از زحمات پرسنل خانه حیوانات بیمارستان قائم (عج)، گروه علوم تشریح، ژنتیک و کتابخانه دانشکده پزشکی و سرکار خانم متجدد تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Williams PL, Warwick R, DYson M, Bannister LH: Gray's Anatomy, 37ed Norwich, England, 1989, pp 201-204

2. Azuma N, Hirkata A, Hida T, Koshakan S: Histochemical and immunohistochemical studies on keratan sulfate in the anterior segment of the developing human eye. Exp Eye Res 1994; 58: 277-860

3. Bard J, Robbins SG, Wilson DJ: Immunolocalization of Integrins in the human retina. Invest Ophthal Mol Vis Sci 1994; 35(9): 3466-3472

4. Gilbert SF: Developmental biology. 5ed, Sianauer Associated Inc 1997; pp 279, 283, 672, 690

5. Lodish H, Baltimare D, Breck A, Zipursky SL: Molecular cell Biology. 3ed, Scientific American 1995; pp 1123-1200

6-Gullberg D, Ekbolm P: Extracellular matrix and its receptor during development. Int J Dev Biol 1995; 39: 845-854

7. Snow DM, Watanabe M, Letourneau PC: A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. Development 1991; 113: 1473-1485

8. Fazel AR, Schulte BA: Glycoconjugate unique to migrating primordial geam cell differs with genera. Anatom Rec 1990; 228: 177-184

9. Vandenbrule FA, Fernandes PL, Buicau C: Differential expression of galectin-1and galectin-3 during first trimester of human embryogenesis. Dev Dyn 1997; 1209: 1399-1405

10. Griffith CM, Willey MJ: Distribution of cell surface glycoconjugate during secondary neurolation in the chick embryo. Anat Rec 1990; 26: 81-90

11. Knepper PA, Groossens W, Hvizd M, Palmberg PF: Glycosaminoglycans of the human Trabecular moshwork in primary open glucoma. Invest Ophthalmol Visual Sci 1996; 37 (7): 1360-1364

12. Yue BYJ: The extracelluiar matrix and its modulation in the trabecular meshwork. Sur Ophthalmol 1996; 40(5): 379-387

13. Lijbimov AV, Burgson RE, Butkowski RJ: Extracellular martix alteration in human corneas with bullous keratopathy. Invest ophthalmol Visual Sci 1996; 37 (6): 997-1007

14. Drury RAB: Carleton's histological techniques. 5ed Oxford Univ Press, 1980, pp 36-57

15. Fazel AR, schulte BA, Thompson RP, Spicer SS: Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. Cell

Differentiation 1987; 21: 199-211
16. Fazel AR, Sumida M, schulte BA, Thompson RP: Lectin histochemistry of the embryonic heart: Fucose speafic lectin binding sites in deveoping rats and chicks. AM J Anat 1989; 184: 76-84
17. Bland M: An introduction to medical statistics. Oxford medical publication, 1995, pp 60, 212, 250
18. Berm RB, Robbins SG, Wilson DJ: Immunolocalization of integrins in the human retina. Invest Ophthalmol Visual Sci 1994; 35(9): 3466-3472
19. Alles AJ, Fazel AR, Spicer SS: Distribution ofgiycoconjugate in the optic Vesicle and optic cup. Anat Embryol 1990; 182: 611-670
20. Buse B, Seifert H: Glycoconjugate expression during early mouse oculogenesis. Histochem J 1998; 30: 819-826
21. Morris-kay G, Tuckelt F: Immunohistochmical localization of chondritin sulfate proteoglycans and the effects of chondroitinase ABC in 9-11 day rat embrvos. Development 1989; 106: 787-798