

## مطالعه هیستوشیمی و لکتین هیستوشیمی صلبیه و مشیمیه در طی روند تکامل چشم

محمد رضا عرب (Ph.D.) \* طاهره طلایی خوزانی (Ph.D.) \*\* علیرضا  
فاضل (Ph.D.) \*\*\*

### چکیده

سابقه و هدف : صلبیه و مشیمیه به عنوان لایه‌های خارجی و میانی چشم از مزانشیم اطراف جام بینایی منشأ می‌گیرند که در تکامل آن سلول‌های ستیغ عصبی نقش ارزنده‌ای ایفاء می‌کنند. بخش عمده‌ای از سیگنال‌های هدایت‌کننده روند تکامل در چشم، در واقع اجزایی از ماتریکس خارج سلولی و یا گلیکوکونزوگه‌های سطح سلول می‌باشند. هدف از این مطالعه شناسایی اجزا ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات قندی سطح سلول به هنگام تکامل این لایه‌ها در چشم است.

مواد و روش‌ها : جنین‌های روزهای یازدهم تا بیستم تولد و نوزادان یک تا پانزده روزه موش صحرايي (Rat) جمع‌آوری شدند. مقاطع بریده شده توسط رنگ‌آمیزی‌های هیستوشیمی و تکنیک لکتین هیستوشیمی (PNA, BSA1-B4, S/PNA) مورد مطالعه قرار گرفتند و بر اساس شدت رنگ‌آمیزی درجه‌بندی شدند.

یافته‌ها : آزمون آماری Mann-Whitney، اختلاف معنی‌داری را میان روزهای مورد مطالعه تنها برای ترکیبات قندی خنثی و گلیکوزآمینوگلیکان‌های اسیدی کربوکسیله نشان داد ( $P < 0/05$ ). به علاوه مزانشیم اطراف جام بینایی به شدت با لکتین BSA1-B4 واکنش نشان داد و بدین ترتیب حضور قند انتهایی D-Gal در سلول‌های مزانشیمی این ناحیه نشان داده شد. واکنش مزانشیم فوق به لکتین PNA برای قند انتهایی D-Gal منفی بود اما پس از به کارگیری روش هضم آنزیمی سیالیداز، بعضی از سلول‌های مزانشیمی به این لکتین با شدت کم پاسخ دادند. بدین ترتیب وجود اسید سیالیک و قند انتهایی Gal/GalNac در این سلول‌ها نشان داده شد.

استنتاج : به نظر می‌رسد مجموعه تغییرات ماتریکس خارج سلولی و قندهای انتهایی سطح سلول، بخشی از وقایع مسؤوّل کنترل روند ریخت‌زایی در جنین به هنگام تشکیل چشم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : صلبیه، مشیمیه، چشم- رشد و تکامل، لکتین‌ها

### مقدمه

صلبیه و مشیمیه به عنوان لایه‌های میانی و خارجی چشم از مزانشیمی منشأ می‌گیرند که اطراف جام بینایی بسیار ارزنده‌ای دارند (۱). تکامل چشم در مهره داران

✉ زاهدان- دانشکده پزشکی

\* استادیار بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

\*\* استادیار بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

\*\*\* دانشیار آناتومی و بیولوژی سلولی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقاومت فیزیولوژیک چشم برای جذب مایع زلالیه در شبکه ترابکولار (Trabecular meshwork) مورد تأکید قرار گرفته است (۹). از طرف دیگر، تغییرات ماتریکس خارج سلولی و گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول در بعضی از بیماری‌های چشم مثل جداشدگی‌های شبکیه (Retinal detachment) و آب مروارید (Cataract) نشان داده شده است (۱۰).

هدف ما از این تحقیق شناسایی قندهای انتهایی سطح سلول و ماتریکس خارج سلولی با تکنیک فوق‌العاده دقیق لکتین هیستوشیمی و تعیین همزمانی حضور این ترکیبات با وقایع مورفوژنیک تکاملی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی در این دو لایه از چشم بود.

### مواد و روش‌ها

۵۰ سر موش بزرگ از نژاد Whistar انتخاب شدند. پس از جفت‌گیری، مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. حیوانات در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت (۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد)، دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی، رطوبت و نور مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. موش‌های حامله بر اساس روز حاملگی از یازدهم تا بیستم جنینی تحت شرایط بیهوشی عمیق با کلروفورم که منجر به مرگ حیوان می‌شد باز شدند. جنین‌ها با دقت از جفت و پرده‌های جنینی جدا شدند. آنگاه در محلول‌های فیکساتیو B4G، کارنوی و بوئن قرار گرفتند و مطابق روش معمول در بافت‌شناسی پاساژ داده شدند. بلوک‌های پارافینی تهیه شده به صورت فرونتال، سائیتال و عرضی با ضخامت ۵ تا ۶ میکرومتر و به صورت سریال (Serial section) بریده شدند و رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-آئوزین، آلتین بلو در pH=۱، pH=۲/۵ و pH=۵/۸ به روش تغییر بحرانی

محتاج میان کنش‌های (Interactions) کاملاً تنظیم شده‌ای میان اکتودرم سطحی، نوروپای تلیوم پروزنسفالون و مزانشیم میان آنها است. یکی از مولکول‌هایی که هدایت این میان کنش‌ها را به عهده دارد فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد فیروبلستی [Fibroblast Growth Factor (FGF)] و رسپتور مخصوص آن می‌باشد (۲).

بخش عمده‌ای از سیگنال‌های هدایت کننده روند تکامل در چشم به واقع اجزایی از ماتریکس خارج سلولی [Extracellular Matrix (ECM)] هستند که به صورت غشاء پایه و یا گلیکو پروتئین‌های اطراف سلول سازمان‌دهی شده‌اند. برخی از این مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی به عنوان مولکول‌های متصل کننده سلول به ماتریکس خارج سلولی (Adhesive ECM) و برخی به عنوان مولکول‌های دفعی (Repulsive) عمل می‌کنند. کلاژن تیپ I، ترمبوسپوندین و لامینین از مولکول‌های چسباننده و کندروایتین سولفات از مولکول‌های دفعی هستند (۳). به علاوه، گلیکوکونژوگه‌های سطح سلول و مخصوصاً بعضی از قندهای انتهایی آنها مثل فوکوز، اسید سیالیک و گالاکتوز نقش بسیار ارزنده‌ای در هدایت روند وقایع مورفوژنیک به هنگام ریخت زایی دارند (۴، ۵، ۶). همچنین اهمیت دیگر عناصر رشته‌ای ماتریکس خارج سلولی مثل بخش میکروفیبریلار رشته‌های الاستیک در کنترل میزان جریان خون در چشم نشان داده شده است (۷). به علاوه اهمیت ماتریکس خارج سلولی در فیزیولوژی طبیعی چشم و بینایی نیز مورد تأکید قرار گرفته است. آن‌چنان‌که شفافیت محیط‌های شفاف چشم مثل قرنیه وابسته به تکامل صحیح اجزا ماتریکس خارج سلولی و آرایش ویژه رشته‌های کلاژن در آن است (۸). همچنین اهمیت حضور اسید هیالورونیک به عنوان مولکول تنظیم کننده

روش هضم آنزیمی سیالیداز و لکتین PNA . آنزیم سیالیداز (شرکت سیگما) در بافر استات با غلظت ۰/۲ مولار و pH = ۵ به میزان ۰/۱ واحد در میلی‌لیتر رقیق شد. مقاطع به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت آنزیم و سپس مطابق روش گفته شده در معرض لکتین PNA قرار گرفتند(۵).

روش‌های آماری . مقاطع رنگ‌آمیزی شده بر اساس شدت رنگ‌آمیزی به صورت مجزا و دوسوکور (Double blind) توسط دو نفر رتبه‌بندی شدند و آنگاه جدول‌های رنگ‌آمیزی تهیه و توسط آزمون Mann-Whitney تجزیه و تحلیل شدند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: رتبه‌بندی لام‌ها بر اساس شدت رنگ‌آمیزی

رتبه	شدت رنگ‌آمیزی
-	رنگی دیده نشد
+-	شدت رنگ بسیار کم
+	شدت رنگ کم
++	شدت رنگ متوسط
+++	شدت رنگ زیاد

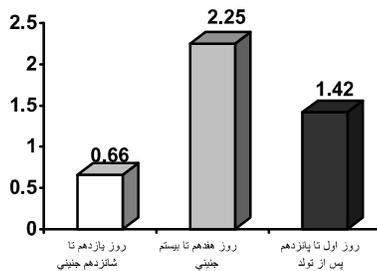
### یافته‌ها

در روزهای ۱۱ تا ۱۴ جنینی، سلول‌های مزانشیمی اطراف جام بینایی دارای اشکال سلولی متفاوت بوده و فاصله سلولی میان آنها نیز زیاد می‌باشد. این فضاها سرشار از ماتریکس خارج سلولی بوده و به‌خوبی قابل تشخیص می‌باشند. با تکامل بیشتر حباب عدسی و شبکه تراکم سلولی در این مزانشیم افزایش می‌یابد و با ایجاد فضاهایی در لابلاهی این سلول‌ها در مزانشیم زیر قرنی، اتافک قدیمی چشم شکل می‌گیرد و فورنیکس‌ها نمایان

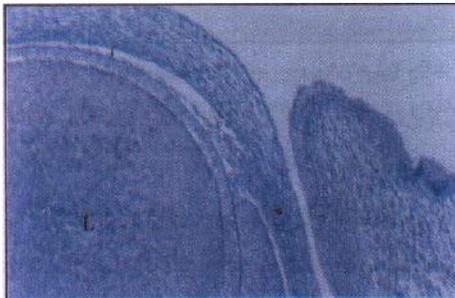
غلظت منیزیم در چهار غلظت، پاس، اورستین، تری‌کروم و تولویدین بلو در بافر ورنول با pH=۴/۵ انجام شد. مقاطع براساس شدت رنگ‌آمیزی درجه‌بندی شدند(۱۲،۱۱) (جدول شماره ۱). در صورت مشاهده هرگونه ناهنجاری‌های ظاهری، نمونه از مسیر مطالعه حذف شد. از آنجا که مطالعه بر اساس درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی لام‌ها بود، لذا روش کار برای تمام نمونه‌ها از نظر محلول‌ها، زمان و شستشوی متعاقب رنگ‌آمیزی یکسان بود. پس از رنگ‌آمیزی، آب‌گیری و شفاف کردن لام‌ها به‌طور یکسان مطابق معمول در بافت‌شناسی انجام شد.

لکتین هیستوشیمی . لکتین PNA و Horseradish Peroxides BSA1-B4 کونژوگه شده با (شرکت سیگما) در بافر فسفات ۰/۱ مولار در (HRP) pH = ۶/۸ برای لکتین BSA1-B4 که محتوی ۰/۰۲ گرم کلرید منیزیم و ۰/۰۲ گرم کلرید منگنز و ۰/۰۵ گرم کلرید کلسیم بود، به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر بافر رقیق گردید. پس از آبدهی مقاطع به روش معمول و حذف پیگمان کلریدجیوه، برای خنثی کردن پراکسیداز درون بافتی به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۰۱ آب اکسیژنه در متانول قرار گرفتند. آنگاه برش‌ها به مدت دو ساعت در اتافک مرطوب با لکتین PNA رنگ‌آمیزی شدند و سپس در محلول Diaminobenzidine (DAB) به میزان ۰/۰۳ گرم DAB و ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه به ازای هر صد میلی‌لیتر بافر به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. برای توقف واکنش DAB مقاطع به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب شستشو شدند. برای رنگ زمینه از آلتین بلو با pH = ۲/۵ استفاده گردید. سپس مقاطع مطابق معمول آبگیری و چسبانده شدند(۱۲،۶،۵،۴).

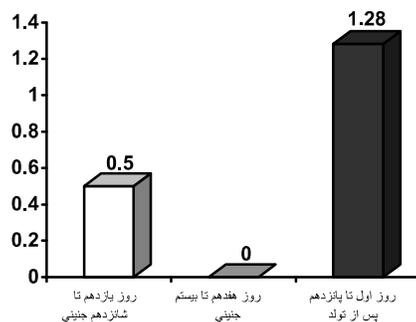
تصویر میکروسکوپی شماره ۱: نمونه روز ۱۱ جنینی. واکنش سلول‌های عمق کیسه ملتحمه‌ای، کپسول عدسی و غشاء بروخ نشان داده شده است. تراکم مزانشیم اطراف جام بینایی به خوبی نمایان است. رنگ آمیزی پاس-آلشین بلو  $\times 400$  شبکه (R) و عدسی (L)



نمودار شماره ۱: مقایسه شدت رنگ آمیزی مقاطع برای لایه میانی چشم در روزهای مورد مطالعه برای ترکیبات قندی خنثی،  $P < 0.05$ \*

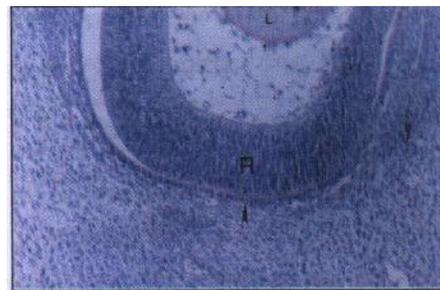


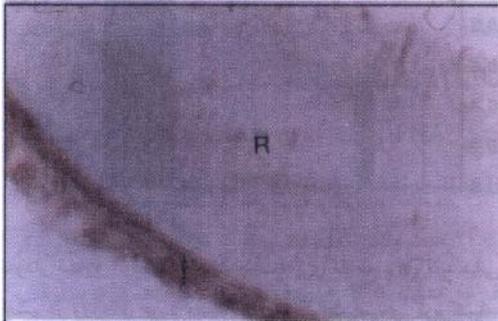
تصویر میکروسکوپی شماره ۲: نمونه روز ۱۶ جنینی واکنش منطقه لمبوس (x) و همچنین کپسول عدسی نشان داده شده است. رنگ آمیزی آلشین بلو  $\times 400$  شبکه (r) و عدسی (L)



نمودار شماره ۲: مقایسه شدت رنگ آمیزی مقاطع برای لایه میانی چشم در روزهای مورد مطالعه برای ترکیبات اسیدی کربوکسیله،  $P < 0.01$ \*\* و  $P < 0.04$ \*

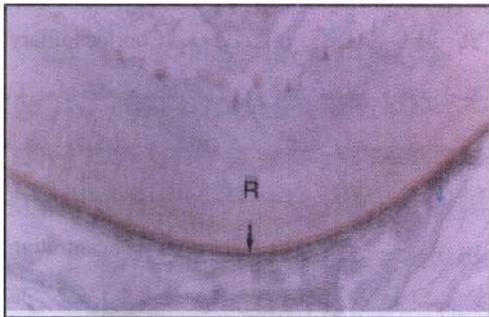
می‌گردند. در روزهای ۱۸ تا ۲۰ جنینی با افزایش بیشتر تراکم مزانشیم و رسوب عناصر رشته‌ای ماتریکس خارج سلولی، صلبیه نمای مشخص تری پیدا می‌کند؛ در این زمان پلک‌ها کاملاً شکل گرفته‌اند. پس از تولد، با رسوب بیشتر عناصر رشته‌ای ماتریکس خارج سلولی که ابتدا در اطراف اپی‌تلیوم پیگمانه مشاهده می‌شدند، صلبیه نمای بالغین را پیدا می‌کند. در این روزها در کوروئید، غشاء بروخ و لایه کوریوکاپیلاری (Choriocapillary) به صورت مویرگ‌هایی با قطر بالا قابل ملاحظه هستند. در روز ۱۱ جنینی وجود اسید هیالورونیک و به میزان کمتر کندروایتین سولفات در مزانشیم با رنگ آمیزی CEC1 و CEC2 (Critical electrolyte concentration) تأیید شد. در حالی که ترکیبات هیارین سولفات در مزانشیم با رنگ آمیزی‌های CEC3 و CEC4 ملاحظه نشد. از روزهای ۱۵ جنینی به بعد نتیجه رنگ آمیزی CEC4 و CEC3 برای ردیابی هیارین و کراتان سولفات در مشیمیه و صلبیه مثبت بود. ترکیبات قندی کربوکسیله و خنثی در این روزها برای صلبیه مثبت بود. در حالی که در این زمان قرنیه برای ترکیبات اسیدی سولفات مثبت بود. نتیجه رنگ آمیزی تولوئیدین بلو برای ردیابی ترکیبات با قابلیت متاکرومازی در روزهای ۱۶ تا ۱۸ جنینی منفی بود (نمودار شماره ۱ و ۲ و تصاویر میکروسکوپی شماره ۱ و ۲).





تصویر میکروسکوپی شماره ۴: نمونه روز ۸ بعد از تولد. واکنش صلبیه و کوروید به لکتین BSA1-B4 نشان داده است (B4-BSA1 X400)

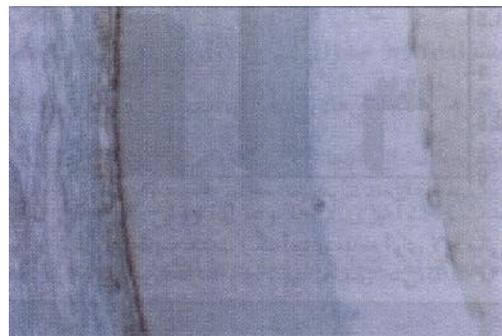
پس از به کارگیری روش S/PNA بعضی از سلول‌های مزانشیمی اطراف جام بینایی به لکتین از خود واکنش نشان دادند. در روز نوزدهم جنینی واکنش سطح پلکی کیسه ملتحمه‌ای نسبت به سطح بولبار آن بسیار شدیدتر بود (تصویر میکروسکوپی شماره ۵).



تصویر میکروسکوپی شماره ۵: نمونه روز ۶ پس از تولد. افزایش در واکنش لایه‌های صلبیه و مشیمیه پس از کاربرد آنزیم سیالیداز مشاهده نشد (S/PNA X200)

در تکامل لایه میانی چشم از نظر ترکیبات قندی خنثی میان گروه‌های مورد مطالعه در روزهای ۱۳ تا ۱۶

در روز ۱۱ جنینی واکنش مزانشیم برای ردیابی قند Gal /Gal Nac با لکتین PNA منفی بود. در روزهای ۱۲ تا ۱۶ جنینی تنها اپی تلیوم فورنیکس‌ها و مزانشیم اطراف آن قدری به لکتین از خود واکنش نشان دادند. در روز ۱۶ جنینی هیچ واکنشی به لکتین در صلبیه و مشیمیه ملاحظه نشد. مجدداً در روز ۲۰ جنینی واکنش ضعیفی به لکتین آن هم در کیسه ملتحمه دیده شد (تصویر میکروسکوپی شماره ۳).



تصویر میکروسکوپی شماره ۳: نمونه روز ۱۹ جنینی. واکنش اندوتلیوم عروق لایه کوریو کاپیلاری به PNA با شدت کم و غشاء بروخ به آلتین بلو نشان داده شده است (لکتین PNA X200).

پس از تولد، واکنش فورنیکس‌ها و کیسه ملتحمه‌ای نیز کاهش پیدا کرد و در کوروید و صلبیه هم هیچ پاسخی مشاهده نگردید. تا روز ۱۱ تا ۱۵ پس از تولد مجدداً واکنش ضعیفی به لکتین در صلبیه و مشیمیه دیده شد. لکتین BSA1-B4 برای ردیابی قند انتهایی D-GaL واکنش شدیدی را با سلول‌های مزانشیمی از خود نشان داد و با افزایش سن جنین از شدت واکنش به این لکتین کاسته شد (تصویر میکروسکوپی شماره ۴).

در تکامل صلبیه از نظر تمام ترکیبات مورد مطالعه اختلاف معنی داری میان روزهای مورد مطالعه دیده نشد.

جنینی و روزهای ۱ تا ۱۵ تولد اختلاف معنی داری مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره ۱).

به علاوه از نظر میزان گلیکوزآمینوگلیکانهای اسیدی کربوکسیله میان روزهای ۱۱ تا ۱۶ جنینی و روزهای ۱ تا ۱۵ پس تولد ( $P < 0/01$ ) و همچنین روزهای ۱۷ تا ۲۰ جنین و روزهای ۱ تا ۱۵ پس از تولد ( $P < 0/04$ ) اختلاف معنی داری دیده شد (نمودار شماره ۲).

### بحث

دارد (۱۳). نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری میان ترکیبات دیگر ماتریکس خارج سلولی در روزهای مورد مطالعه وجود ندارد ولی حضور آنها را تأیید نمود و به نظر می رسد که این ترکیبات نقش خود را از طریق واکنش با دیگر اجزا اعمال می کنند.

ردیابی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی در این تحقیق نشان داد که اسیدهیالورونیک نقش مهمی در پرکردن فضاهای بین سلولی بافت مزانشیم در روزهای ۱۱ تا ۱۴ جنینی داشته و به خصوص غلظت آن در ناحیه لیمبوس بسیار بالا می باشد. به نظر می رسد این ترکیب مهم ماتریکس خارج سلولی به عنوان یک مولکول بزرگ پلی آنیونیک با نگهداری مقدار زیادی آب و املاح بستر مناسبی را برای مهاجرت و تقسیم سلولها که پدیده های مهمی در فرآیند تمایز چشم می باشند، فراهم می آورد (۹۸).

از آنجا که اهمیت ترکیبات خارج سلولی در برخی بیماری های اکتسابی چشم مثل کاتاراکت، گلوکوم و جدا شدگی های شبکیه نشان داده شده است (۱۴، ۱۵) و همچنین اهمیت تکاملی ترکیبات سطح سلول در اعضای مثل تیموس، قلب، چشم و سلول های اولیه جنسی مورد تأکید قرار گرفته است (۱۶، ۱۷، ۱۸)، به نظر می رسد که شناسایی توزیع طبیعی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و ترکیبات قندی سطح سلول از نظر میزان و زمان ظهور آنها در چشم می تواند راه را برای درک نقش احتمالی

میان کنش های (Interactions) سلول- سلول و سلول- ماده خارج سلولی زمینه ساز اطلاعات ضروری و مهمی برای کنترل مورفوژنز، تعیین سرنوشت سلولی، مهاجرت های سلولی، و حتی مرگ سلولی می باشند. واسطه میان کنش های سلولی فوق، اجزایی از ماتریکس خارج سلولی و قندهای انتهایی ترکیبات سطحی سلول هستند که توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است (۱۳). مطالعه حاضر اختلاف میان ترکیبات قندی خنثی و ترکیبات اسیدی سولفات را در روزهای مورد مطالعه نشان داد. به نظر می رسد که این اختلاف غلظت اجزا ماتریکس خارج سلولی، زمینه ساز وقایع ریختزایی تشکیل کورویید و صلبیه در چشم هستند. به علاوه، تغییر در میزان قندهای انتهایی D-Gal و Gal/GalNac در روزهای مورد مطالعه نیز نشان می دهد که حضور یا عدم حضور این قندها انعکاسی از تغییرات مورفولوژیک سلولها در طی تکامل این دو لایه از چشم می باشد و این امر بر همزمانی تغییرات ماتریکس خارج سلولی و پروتئین های سطح سلول تأکید دارد. تغییرات در میزان سلولها و رسوب عناصر رشته ای در صلبیه و ایجاد فضاهای خارج سلولی در مزانشیم برای تشکیل اطاق قدامی چشم در حقیقت انعکاسی از تغییرات فوق می باشد. مطالعه Werb (۱۹۹۷) نشان داده است که تغییر در ماتریکس خارج سلولی هدایت روند مورفوژنز در تکامل را به عهده

بازبینی مقاله و همچنین پرسنل خانه حیوانات بیمارستان قائم (عج) و بخش جستجوی مقالات معاونت پژوهشی و آزمایشگاه هیستوشیمی- جنین شناسی مخصوصاً سرکار خانم دکتر آروند، جناب آقای دکتر جلالی و سرکار خانم متجدد و پرسنل آزمایشگاه ژنتیک دانشکده پزشکی مشهد صمیمانه تشکر نمایند.

بیشتر این ترکیبات در ناهنجاری‌های مادرزادی چشم هموار نماید.

### سپاسگزارى

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ریاست محترم دانشکده پزشکی مشهد، هلال احمر جمهوری اسلامی ایران، دکتر شیراحمد سارانی برای

### فهرست منابع

1. فاضل علیرضا. مطالعات هیستوشیمیایی ترکیبات قندی سطح سلول لنفوسیت‌های T در روند تکامل جنینی. *مجله دانشکده پزشکی مشهد*، ۱۳۷۴؛ سال سی و هشتم، شماره ۴۹: صفحات ۲۲ تا ۲۸.
2. Alles AJ, AR Fazel, S.S Spicer. Distribution of glycoconjugate in the optic vesicle and optic cup. *Anat. Embrol.* 1990; 182(6): 611-16.
3. Buse E,H. Seifert. Glycoconjugate expression during early mouse oculogenesis. *Histochem. J.* 1988; 30(11): 819-27.
4. Drury R.A.B. Carleton histological technique. 5<sup>th</sup> ed. London: Oxford University Press; 1980, P. 221-260, 36-37.
5. Fazel A.R. Schulte B.A, Thompson R.P, Spicer S.S. Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. *Cell differentiation.* 1987; 21(3): 199-211.
6. Fazel A.R, H. Sumida, B.A Schulte, Thompson R.P. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucose specific lectin binding sites in developing rats and chicks. *Am.J.Anat.* 1989; 184(1): 76-84.
7. Fazel A.R, B.A Schulte, S.S Spicer. Glycoconjugate unique to migrating primordial germ cells differs with genera. *Anat.Rec.* 1990; 228(2): 177-84.
8. Gervin D.B, M.C Gordon, D.O Clegg. Temporal and spatial regulation of integrin vitronectin receptor m-RNAs in the embryonic chick retina. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 37(6): 1084- 96.
9. Gong H, Ye W, T.F Freddo, MR Hernandez. Hyaluronic acid in normal and glaucomatous optic nerve. *Exp. Eye. Res.* 1997; 64(4): 587-95.
10. Hahn RA,D.E Birck. B-D Xyloside alters dermatan sulfate proteoglycan synthesis organization of the avian corneal stroma. *Development.* 1993; 115(2): 383-93.
11. Hyer J,T Mima, T Mikawa. FGF1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development.* 1998; 125(5): 869-77.

12. Knepper P.A, W Goossens, M Hvizd, P.F Palmberg. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open angle glaucoma. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996;37(7):1360-66.
13. Korte GE, E Manche. Microfibril-microvessel connection in the uvea and optic nerve of the mammalian eye. *Act. Anat.* 1991; 142(1): 49-56.
14. Lerner LE, JR Polansky, EL Howes, R Stern. Hyaluronan in the human trabecular meshwork. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 38(6): 1222-27.
15. Ljubimov AV, RE Burgeson, RO Butowsk, J.R Couchman, Mu RR. Ninomiya Y, et al. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996; 37(6): 997-1006.
16. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulation of cellular ecology. *Cell.* 1997; 91(4): 439-42.
17. Williams PL, R Warwick, M Dyson. Grays anatomy. 37<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone; 1989.
18. Yue B.Y. The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork. *Surg. Ophthalmol.* 1996; 40(5): 379-89.