

Alkūnės sąnario sklaida persodintose galūnių užuomazgose, stokojančiose priekinės arba užpakalinės nekrozės zonų

Renata Rizgelienė, Janina Žukienė, Violeta Žalgevičienė

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Anatomijos, histologijos ir antropologijos katedra

Raktažodžiai: galūnės sklaida, viščiuko embrionas, apoptozė.

Santrauka. Darbo tikslas. Ištirti alkūnės sąnario sklaidą galūnių transplantatuose, stokojančiuose priekinės ar užpakalinės nekrozės zonų, kuriose genetiškai užprogramuota ląstelių žūtis (apoptozė).

Tyrimo medžiaga ir metodai. Naudotas viščiukų galūnių užuomazgų persodinimo į chorioalantojo membraną metodas. Eksperimentinės grupės galūnės persodintos be priekinės arba užpakalinės nekrozės zonos. Kontrolinę grupę sudarė galūnės, turinčios šias zonas. Fiksuotuose formalinu, standintuose parafinu, pjaustytuose ir dažytuose alciano mėlynuoju ir eozinu transplantatų preparatuose tirta sąnarių sklaida. Abi grupės veikiančios išorinės eksperimentinės sąlygos buvo vienodos, todėl eksperimentinės grupės transplantatų sąnarių sklaidos anomalijas galima buvo sieti su priekinės arba užpakalinės nekrozės zonos stoka šiose galūnėse.

Rezultatai. Eksperimentinės grupės transplantatų alkūnės sąnarį sudarančių kaulų platūs arba visiškai suaugimai pastebėti esant ankstyvoms transplantatų augimo ant chorioalantojo membranos stadijoms. Kontrolinių transplantatų alkūnės sąnario regresija vyko palaipsniui: nuo siaurų tiltelių, jungiančių sąnarinius paviršius ankstyvų stadijų metu, iki plačių suaugimų jau esant vėlyvoms stadijoms.

Išvados. Priekinės ar užpakalinės nekrozės zonos izoliavimas užslopino apoptozę tamsiojoje nekrozės zonoje ir lėmė alkūnės sąnario kaulų suaugimą.

Išvadas

Genetiškai užprogramuota ląstelių žūtis esti daugelyje embriono kūno vietų. Ne išimtis ir besiformuojanti galūnė (1).

Amniotų galūnės užuomazgos mezodermoje yra kelios pagrindinės ląstelių žūties zonos: priekinė nekrozės zona (PNZ), užpakalinė nekrozės zona (UNZ), tamsioji nekrozės zona (TNZ) ir tarppirštinių nekrozės zonos (TpNZ). Nustatyta, kad šių zonų mezodermos ląstelių žūties morfologiniai požymiai būdingi ne nekrozei, bet apoptozei (2). Tačiau iki šiol mokslinėje literatūroje šios zonos tradiciškai vadinamos nekrozės zonomis (3).

Viščiuko sparno užuomazgoje, kuri kaip modelis naudojama žmogaus galūnės sklaidai tirti, PNZ arba UNZ išsidėsto atitinkamai ties priekinio ar užpakalinio galūnės krašto ir šoninės kūno sienos jungtimi ir lemia galūnės formą (1). Pirmieji apoptozės požymiai PNZ atsiranda 23 HH ir UNZ – 24 HH stadijos metu, remiantis Hamburgerio-Hamiltono klasifikacija (4). Užprogramuotos žūties laikrodis paleidžiamas 17 HH sta-

dijos metu, o tarp 17 HH ir 22 HH stadijos, esant tam tikroms eksperimento sąlygoms, dar galima „išgelbėti“ ląsteles nuo apoptozės (5, 6).

TNZ (taip vadinama todėl, kad, apšvietus galūnę transmisine šviesa, ji lieka tamsi ir neskaidri) viščiuko galūnės mezodermos centrinėje srityje susidaro 23 HH stadijos metu ir maksimumą pasiekia 24 HH stadijos metu, padalydama distalinę centrinės mezodermos kondensuatą sritį į dvi šakas – į būsimas alkūnkaulio ir stipinkaulio užuomazgas. Nuo 26 HH stadijos TNZ siaurėja, pasislenka link dilbio kaulų užuomazgų proksimalinių galų (1). Viščiukų mutantų *Talpid*³ galūnių užuomazgose TNZ yra genetiškai užslopinta, todėl alkūnkaulis ir stipinkaulis lieka iš dalies arba visiškai suaugę, o alkūnės sąnarys nesusiformuoja (7). Viščiuko gemalo galūnių, persodintų be PNZ arba UNZ, alkūnkaulio ir stipinkaulio užuomazgos suaugusios į vientisą kremzlę, pasagos ar apskritimo formos struktūrą (8).

TpNZ formuoja galūnės plaštakos išorinį apvadą, atskirdamos pirštus. Genetiškai arba eksperimentiškai užslopinus ląstelių degeneraciją TpNZ, lieka minkštųjų

audinių sindaktilija (9).

Apoptozė, manoma, lemia galūnės sąnarių sklaidą ir yra svarbi sąnariui plyšiui susidaryti (1, 10, 11).

Šio eksperimentinio darbo tikslas – ištirti alkūnės sąnario sklaidą galūnių transplantatuose, stokojančiuose PNZ arba UNZ, bei nustatyti ir įvertinti galimą šių zonų įtaką. Naudojant galūnių užuomazgų persodinimo į chorioalantojo membraną (CAM) metodą (12), galima palyginti skeleto anomalijas, būdingas visos galūnės užuomazgos transplantatams ir anomalijas, būdingas transplantatams, augantiems CAM be PNZ arba UNZ (13). Abiem atvejais transplantatus veikia tos pačios išorinės eksperimento sąlygos, todėl sklaidos anomalijų, būdingų transplantatams be PNZ arba UNZ, buvimą galima būtų sieti su PNZ arba UNZ stoka šiose galūnėse.

Tyrimo medžiaga ir metodas

72 viščiukų donorų sparno užuomazgos buvo persodintos į recipientų CAM. Donorai inkubuoti iki 21–22 HH stadijos, t. y. tol, kol apoptozės procesas PNZ ir UNZ dar neprasidėjęs. Recipientai inkubuoti 8–9 dienas, kol susidarė jų CAM.

Donorų sparno užuomazgos buvo amputuotos trimis būdais. 24 užuomazgos amputuotos be prospektinės PNZ, 23 – be prospektinės UNZ (jos sudarė eksperimentinę grupę). 25 atidalytos galūnės turėjo visą galūnės užuomazgos medžiagą (kontrolinė grupė).

Recipientų kiaušiniuose buvo padaryti langeliai, pro kuriuos galima buvo pasiekti CAM. Kiekviena amputuota donorų galūnės užuomazga arba jos dalis buvo padėta ant recipientų CAM stambesnių kraujagyslių šakojimosi vietose, prieš tai kiek pažeidus aplinkinius kapiliarus. Čia kontrolinių galūnių užuomazgos toliau skleidėsi atskirtos nuo gemalo kūno, o eksperimentinių galūnių užuomazgos – ir nuo PNZ arba UNZ. Po persodinimo recipientų kiaušinių langeliai buvo uždengti stikliuku ir užlydyti šiltu parafinu. Recipientai su transplantatais buvo grąžinti į inkubatorių.

Prigiję transplantatai buvo tikrinami kasdien ir atskiriami nuo CAM 3, 5, 7 ir 9 dienomis.

Tiek kontroliniai, tiek eksperimentiniai transplantatai buvo fiksuoti 10 proc. formalinu, standinti parafinu, supjaustyti 6–8 μm pjūviais ir dažyti alciano mėlynuoju ir eozinu. Šiuose histologiniuose preparatuose tirta sąnarių diferenciacija. Analizuojant duomenis, taikytas matematinės paklaidos metodas.

Rezultatai

Pirmomis dienomis po persodinimo rezorbavosi 15,96% \pm 0,8 transplantatų. Visais eksperimento atvejais prigijusiuose transplantatuose dažniausiai (89,1% \pm 0,3) skleidėsi visi trys galūnės segmentai: stilo-

podiumas, zeugopodiumas ir autopodiumas. Galūnės, kurioms trūko daugiau kaip vieno segmento, toliau nenagrinėtos.

Tiek kontrolinių, tiek eksperimentinių transplantatų autopodiumo delninių pirštų ir savųjų pirštų sąnarių diferenciacija nedaug skyrėsi, todėl šis galūnės segmentas straipsnyje nenagrinėjamas.

Labiausiai buvo pakitęs eksperimentinių transplantatų zeugopodiumo skeletas ir alkūnės sąnarys.

Beveik visų (96,9% \pm 0,2) eksperimentinių transplantatų histologiniuose pjūviuose rasta alkūnės sąnario formavimosi sutrikimų ir žastikaulio (H), alkūnkaulio (U) ir stipinkaulio (R) kremzlinių užuomazgų dalinis ar visiškas suaugimas. Tik dviejų transplantatų be UNZ skeletas buvo be anomalijų.

Anomalija pastebėta tik ankstyvų formavimosi CAM stadijų metu (trečios ir penktos paros po persodinimo) – stilopodiumo ir zeugopodiumo kaulų užuomazgų suaugimai kremzliniais tilteliais. Šią anomaliją turėjo 20% \pm 1,3 transplantatų be PNZ, ir 35,7% \pm 1,2 transplantatų be UNZ. Histologiniuose pjūviuose matėme kremzlinius tiltelius sąnario interzono centre arba poašinėje interzono periferijoje. Juos, sudarytus iš plokščių arba apvalių bazofilinių kremzlinių ląstelių, supo tanki mezenchima, pereinanti į besiformuojančių kaulų antkremzlį (1 pav.). Tilteliai, jungiantys H ir U užuomazgas, buvo platesni negu tilteliai, jungiantys H ir R užuomazgas. O penktos paros transplantatų alkūnės sąnaryje esantys tilteliai buvo platesni negu trečios paros.

Ilgėjant transplantacijos laikui (nuo penktos paros), tiltelius pakeitė ištisiniai kaulų užuomazgų suaugimai. U ir R užuomazgos buvo suaugusios proksimalinių epifizų vidiniais paviršiais ir savo ruožtu suaugusios su H užuomazga. Transplantatai be UNZ, šią anomaliją turėjo 28,6% \pm 1,4 atvejų. Transplantatams be PNZ, ši



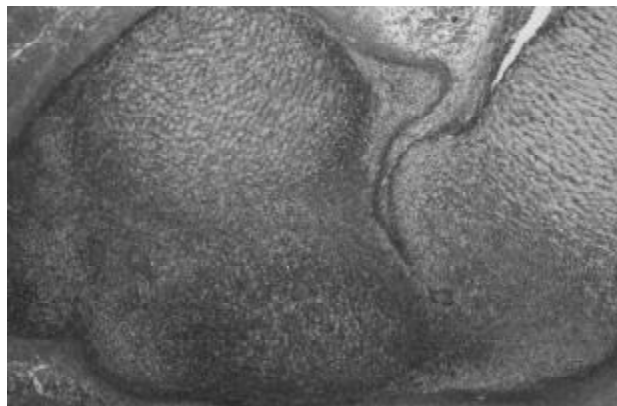
1 pav. Žastikaulio ir alkūnkaulio užuomazgų suaugimas kremzliniu tilteliu transplantate, stokojančiame PNZ, penktąją parą po persodinimo $\times 100$



2 pav. Žastikaulio visiškas suaugimas su alkūnkaulio ir stipinkaulio užuomazgomis transplantate, stokojančiame PNZ, septintąją parą po persodinimo $\times 100$

anomalija buvo būdingesnė – $43,3\% \pm 1,2$. Histologiniuose šių transplantatų pjūviuose visiškai kaulų užuomazgų suaugimas rodė ryškiai alkūnės sąnario regresiją. Penktąją parą po persodinimo interzonų srityse esančios kremzlinės ląstelės buvo arba suplokštėjusios ir išsidėsčiusios keliais sluoksniais, arba apvalios, užimančios visą interzoną, nepalikdamos jokio tarpo (2 pav.). Vėlesnių transplantatų su šia anomalija alkūnės sąnario interzoną užpildė subrendęs kremzlinis audinys, išnyko skaiduliniai sąnario komponentai, U ir R užuomazgos vis labiau suaugo vidiniais paviršiais. Tarp sąnarinio kremzlių dažnai buvo įsiterpę kraujotakiniai kapiliarai, kurie įaugo į regresuojančio sąnario plyšio vietą.

Pati būdingiausia eksperimentinių transplantatų anomalija buvo H, U ir R užuomazgų suaugimas į vientisą kremzlę. Šią anomaliją turėjo $36,7\% \pm 1,2$ transplantatų be PNZ ir $35,7\% \pm 1,2$ transplantatų be UNZ. Įdomu tai, kad tokios plačios apimties suaugimų turėjo ne tik vėlyvų, bet ir pačių ankstyviausių formavimosi CAM stadijų transplantatai. Trečiąją parą po persodinimo tokių transplantatų zeugopodiuose buvo tik viena stora kremzlinė užuomazga. Matyt tai neatsiskyrusios U ir R užuomazgos. Ilgėjant transplantacijos laikui, transplantatų su šia anomalija daugėjo. Jų U ir R užuomazgos buvo suaugusios vidiniais epifizinių ir diafizinių paviršiais, nepalikdamos jokio plyšelio tarp zeugopodiuose kaulų užuomazgų. Proksimaliniai U ir R užuomazgų galai buvo suaugę su H užuomazga į vientisą kremzlę, kurios išplatėjimas arba alkūnės sąnario interzonos likučiai rodė ribą tarp stilopodiuose ir zeugopodiuose. Alkūnės sąnario interzonos buvo užpildytos kelių plokščių ar apvalių kremzlinių ląstelių eilių, tarp kurių vėlyvomis formavimosi stadijomis buvo įaugę kraujotakiniai kapiliarai. Vidiniai U ir R diafizinių paviršiai buvo suaugę arba keliais sluoksniais smulkių



3 pav. Alkūnkaulio ir stipinkaulio užuomazgų suaugimas į vientisą kremzlę transplantate, stokojančiame PNZ, septintąją parą po persodinimo $\times 100$

bazofilinių kremzlinių ląstelių (3 pav.) arba visiškai subrendusiu kremzliniu audiniu.

Transplantatų be PNZ H, U ir R užuomazgų suaugimo ir alkūnės sąnario regresijos apimtis ir dinamika buvo kiek ryškesnė negu transplantatų be UNZ.

Išsiplėtusių ir deformuotų kraujagyslių, kraujosrūvų (3 pav.) arba pūslių, prisipildžiusių kraujo plazmos transudato, galėjusių sutrikdyti dilbio skeleto formavimąsi, rasta $54,8\% \pm 0,9$ transplantatų be PNZ ir $42,9\% \pm 1,1$ transplantatų be UNZ.

Kontrolinės grupės transplantatų alkūnės sąnariui plačios apimties suaugimai nebūdingi. Aukščiau aprašytų zeugopodiuose anomalijų – U ir R epifizinių suaugimų arba suaugimų į vientisą kremzlę – pastebėta tik pavieniais atvejais ($31,1\% \pm 1,6$) ir tik vėlyvomis formavimosi CAM stadijomis (septintąją ir devintąją parą). Daugumos šių transplantatų U ir R užuomazgos buvo atsiskyrusios viena nuo kitos.

Alkūnės sąnario pradinė morfologinė diferenciacija kontroliniuose transplantatuose vyko normaliai. Nuo penktos dienos po persodinimo buvo pastebėta nuosekli alkūnės sąnario regresija: nuo siaurų kremzlinių tiltelių penktąją parą po persodinimo iki galutinio sąnarinio plyšio išnykimo bei kaulinių užuomazgų suaugimo ne tik sąnariniais, bet kartais ir šoniniais paviršiais devintąją parą. Taigi alkūnės sąnario regresija vyko palaipsniui ir ankstyvomis formavimosi CAM stadijomis nebuvo ištisinio sąnarinio paviršių suaugimų, kokie aprašyti eksperimentinėje grupėje.

Kraujo nutekėjimą iš zeugopodiuose sunkinančių kraujosrūvų arba pūslių buvo pastebėta $31,3\% \pm 1,6$ kontrolinės grupės galūnių, t. y. gerokai rečiau negu eksperimentinių transplantatų.

Rezultatų aptarimas

Galūnės užuomazgos skeletogeneze glaudžiai siejasi

su vaskulizacijos kitimais (14, 15). Vienas veiksnių, turinčių įtakos persodintos galūnės skeleto ir sąnarių sklaidai, yra kraujotakos nepakankamumas transplantate (16). Šio eksperimento transplantatų kraujotakos nepakankamumo morfologiniai požymiai: išsiplėtusios kraujagyslės, kraujosrūvos, pūslės – ryškiausi transplantatų be PNZ. Tačiau būdingų skeleto anomalijų atsiradimo šio eksperimento sąlygomis negalima paaiškinti vien kraujotakos sutrikimais zeugopodiuose. Be to, anomalijos formavosi ir gerai vaskulizuotose galūnėse.

Progresuojantį sąnarių paviršių suaugimą nuo siaurų kremzlinių tiltelių iki ankilozų galima iš dalies paaiškinti judėjimo stoka (17). Galūnių imobilizacija nesutrikdo pradinių sąnario sklaidos etapų (nuo interzono susidarymo iki plyšio atsiradimo). Tačiau sąnario plyšiui egzistuoti judėjimas būtinas. Šio eksperimento transplantatai, neturintys motorinės inervacijos, yra nejudrūs, todėl vėlyvų formavimosi CAM stadijų transplantatų dilbio kaulų ir alkūnės sąnario suaugimus galima paaiškinti transplantatų judėjimo stoka. Tačiau visiškai ir platūs H, U ir R užuomazgų suaugimai į vientisą kremzlę ankstyvomis formavimosi CAM stadijomis (trečiąją ir penktąją parą) rodo, kad šių kaulų užuomazgos matyt nebuvo galutinai atsiskyrusios viena nuo kitos. Taigi dilbio kaulų užuomazgų suaugimas transplantatuose be PNZ arba UNZ – pirminis reiškinys. Antrinis kaulų užuomazgų suaugimas, kai jos besiformuodamos atsiskiria viena nuo kitos, o vėliau suauga, buvo būdingas vėlyvų formavimosi CAM stadijų kontrolinės grupės transplantatams. Tačiau jų suaugimai apsiriboja alkūnės sąnario srityje, o U ir R suauga į vieną kremzlę tik pavieniais atvejais ir tik vėlyvomis formavimosi CAM stadijomis. Dauguma kontrolinės grupės transplantatų turi aiškiai atsiskyrusias U ir R užuomazgas.

Intensyvus „pirminis“ U ir R suaugimas sutrikdė pradinius alkūnės sąnario formavimosi etapus, todėl sutriko eksperimentinių galūnių proksimodistalinė sąnarių diferenciacijos seka.

Taigi transplantatų be PNZ arba UNZ alkūnės anomalijų negalima paaiškinti vien judėjimo stoka arba kraujotakos nepakankamumu. Matyt, šių anomalijų priežastys ir susidarymo mechanizmai gerokai sudėtingesni.

Panašius U ir R suaugimus viščiukų mutantų Talpid³ galūnių užuomazgose aprašė J. R. Hinchliffe ir kt. (7). Šių mutantų U ir R kaulų užuomazgos visada yra visiškai arba iš dalies (ties alkūnės sąnariu) suaugusios. Suaugimo priežastis – genetinis ląstelių žūties užslopimas TNZ.

Normaliai augančios galūnės TNZ vyksta mezodermos ląstelių apoptozė, todėl 24 HH stadijos metu

centrinės kondensuotos mezodermos distalinė dalis pasidalija į dvi šakas – būsimas U ir R užuomazgas ir formuoja tipišką Y formos mezodermos kondensaciją galūnėje (1). Genetiškai ar kaip kitaip užslopinus apoptozės procesus TNZ, U ir R užuomazgų šakos kondensuotoje mezodermoje neatsiskiria arba atsiskiria tik iš dalies, U bei R auga visiškai arba proksimaliniais galais suaugę.

Šio eksperimento duomenimis, transplantatų be PNZ arba UNZ tamsiosios nekrozės zonos ląstelių apoptozė taip pat užslopinta. Galima manyti, kad TNZ prislopino vienos iš kitų dviejų nekrozės zonų – PNZ arba UNZ izoliavimas.

Pastaraisiais metais mokslinėje literatūroje pasirodė teiginių, tvirtinančių, kad sąnario interzonoje apoptozė nevyksta, o sąnario plyšio susidarymą skatina hialurono rūgšties sekrecija į interzono centrą (18). Tačiau daugelis autorių pritaria nuomonei, kad kiekvieno sąnario diferenciacijoje vyksta ryškesnis arba silpnesnis ląstelių žūties procesas, padedantis susiformuoti sąnariniam plyšiui (1, 10, 11).

Žmogaus įgimtos radioulnarinės sinostozės diagnostika ir gydymas yra aktualus klinikinėje praktikoje (19, 20), todėl svarbūs ir šio sklaidos sutrikimo susidarymo mechanizmo klausimai. Gali būti, kad ši sutrikimą nulėmė TNZ užslopimas embriogenezėje.

PNZ ir UNZ tyrimai *in vitro* ir *in situ* parodė, kad apoptozės zonos ląsteles gali „išgelbėti“ įvairios eksperimento sąlygotos aplinkybės: ektodermos virš apoptuojančių ląstelių pašalinimas (5), apoptozės zonos ląstelių auginimas vienasluoksnyje kultūroje ir fibroblastų augimo faktoriaus įterpimas į šių ląstelių kultūrą (6). Šio eksperimento duomenys rodo, kad PNZ arba UNZ izoliavimas persodintoje į CAM galūnėje – tai dar viena eksperimento aplinkybė, galinti keisti apoptozę TNZ.

Išvados

1. Galūnės užuomazgose, persodintuose į chorioalantojo membraną ir stokojančiose priekinės ar užpakalinės nekrozės zonų, labiausiai sutriko alkūnės sąnario ir zeugopodiuo kaulų sklaida.

2. Ryškiausi alkūnės sąnario ir dilbio kaulų užuomazgų suaugimai, greičiausia suaugimų dinamika buvo transplantatų, persodintų be priekinės nekrozės zonos.

3. Alkūnkaulio ir stipinkaulio užuomazgų suaugimai rodo, kad eksperimentiniuose transplantatuose buvo užslopinta ląstelių apoptozė tamsiojoje nekrozės zonoje.

4. Mechanizmas, „išjungiantis“ tamsiosios nekrozės zonos veikimą, kol kas neaiškus. Tačiau nėra abejonių, kad galūnės užuomazgoje tarp apoptozės zonų vyksta glaudi sąveika.

Elbow joint formation in grafts of the limbs lacking the anterior or posterior necrotic zones

Renata Rizgeliënė, Janina Žukienė, Violeta Žalgevičienė

Department of Anatomy, Histology and Anthropology, Faculty of Medicine, Vilnius University, Lithuania

Key words: limb development, chick embryo, apoptosis.

Summary. The purpose of this experimental work is to examine the joint formation in limb bud grafts lacking the anterior or posterior necrotic zones where programmed cell death (apoptosis) occurs.

Methods. The embryonic chick limbs were transplanted onto the chorioallantoic membrane. The limbs of experimental group were transplanted without the prospective anterior or posterior necrotic zones. Transplants containing all limb bud material served as the control group.

Results. Most experimental grafts showed wide or complete fusions of the bones forming the elbow joint in the early developmental stages. The regression of the elbow joint in the control grafts was gradually progressive: from the narrow cartilaginous bridges between articular surfaces in early stages to extensive fusion of bone primordia in late developmental stages.

Conclusions. The elimination of the anterior or posterior necrotic zones suppressed apoptosis in the “opaque patch” and caused the fusion of the bones in elbow joint.

Correspondence to R. Rizgeliënė, Department of Anatomy, Histology and Anthropology, Faculty of Medicine, Vilnius University, M. K. Čiurlionio 21, 2000 Vilnius, Lithuania. E-mail: renata.rizgeliene@mf.vu.lt

Literatūra

1. Zuzarte-Luis V, Hurle JM. Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* 2002;46:871-6.
2. Garcia-Martinez V, Macias D, Ganan Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandes-Taran MA et al. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic leg bud. *J Cell Sci* 1993;106:201-8.
3. Farber E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 1994;7:605-9.
4. Hamburger V, Hamilton LH. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951;88:49-92.
5. Brewton RG, MacCabe JA. Ectodermal influence on physiological cell death in the posterior necrotic zone of the wing bud. *Dev Biol* 1988;125:327-30.
6. MacCabe JA, Blaylock RL. Fibroblast growth factor and culture in monolayer rescue mesoderm cells to die in the developing avian wing. *J Exp Zool* 1991;257:208-13.
7. Hinchliffe JR, Thorogood PV. Genetic inhibition of mesenchymal cell death and development of the form and skeletal pattern in the limbs of talpid-3 (ta-3) mutant chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1974;31:747-60.
8. Rizgeliene R. Skeleton pattern and joint formation in the chorioallantoic grafts lacking the anterior or posterior necrotic zones. *J Anat* 1996;189:601-8.
9. Salas-Vidal E, Valencia C, Covarrubias L. Differential tissue growth and pattern of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Biol* 2001;220:295-306.
10. Mori C, Nakamura N, Kimura S, Irie H, Takigawa T, Shiota K. Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat Rec* 1995;242:103-10.
11. Abu-Hijleh G, Reid O, Scothorne RJ. Cell death in the developing chick knee joint: I. Spatial and temporal pattern. *Clin Anat* 1997;10:183-200.
12. Rugh R. The method of Chorio-allantoic grafting. In: *Experimental embryology*. 3rd ed. Minnesota: Burgess Publishing Press; 1962. p. 437-42.
13. Slavėnienė L, Rizgeliënė R. Galūnių, transplantuotų ant chorioalantojaus, formavimasis. (Formation of chorioallantoic limb grafts.) *Medicina (Kaunas)* 1993;39:28-31.
14. Yin M, Pacifici M. Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev Dyn* 2001;222:522-33.
15. Vergesson N. Vascularization of the developing chick limb bud: role of the TGFβ signalling pathway. *J Anat* 2003;202:93-103.
16. Rizgeliënė R, Slavėnienė L. Pradinės vaskuliarizacijos svarba transplantuotų galūnių formavimuisi (eksperimentinis tyrimas). (Significance of initial vascularization to the formation of limb grafts (experimental study).) *Medicina (Kaunas)* 1994;30:70-2.
17. Mikic G, Johnson TL, Chhabra AB, Schalet BJ, Wong M, Hunziker EB. Differential effects of embryonic immobilization on the development of fibrocartilaginous skeletal elements. *J Rehabil Res Dev* 2000;37:127-33.
18. Ito MM, Kida MY. Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat* 2000;197:659-79.
19. Yamine K, Salon A, Pouliquen JC. Congenital radioulnar synostosis. Study of a series of 37 children and adolescents. *Chir Main* 1998;17:300-8.
20. Murase T, Tada K, Yoshida T, Moritomo H. Derotational osteotomy at the shafts of the radius and ulna for congenital radioulnar synostosis. *J Hand Surg* 2003;28:133-7.

Straipsnis gautas 2003 05 14, priimtas 2003 09 15
Received 14 May 2003, accepted 15 September 2003