بررسی نقش مرگ سلولی در شکل‌گیری انگشتان آزاد

طاهره مازوچی [*] ، دکتر مجتبی رضازاده [**] ، دکتر احمد حسینی [***]

خلاصه:

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت مطالعه سیستم‌های در حال تکامل و از جمله شکل‌گیری انگشتان و وجود گزارش‌هایی در مورد نقش مرگ سلولی در تکامل آن و به‌منظور تعیین نقش مرگ سلولی در شکل‌گیری انگشتان آزاد، این تحقیق بر روی جنین جوجه با انگشتان آزاد به عنوان گروه مورد و جنین اردک با انگشتان پرده‌دار به عنوان گروه شاهد انجام گرفت.

مواد و روشها: پژوهش حاضر با روش تحلیلی از نوع هم گروهی (cohort) بر روی تخم‌مرغ‌های نطفه دار نژاد White Leghorn و تخم اردکهای نطفه‌دار نژاد Royal Pekin صورت پذیرفت. جنین‌های جوجه از روز ششم تا نهم انکوباسیون (Stage 29-35) و جنین‌های اردک از روز هشت و نیم تا یازدهم انکوباسیون در فواصل ۱۲ ساعتی برای این مطالعه انتخاب شدند. در این تحقیق ، قرمز خنثی (Neutral red) به عنوان رنگ حیاتی و با روش Hinchiffe&Ede به کار رفت. این رنگ به طور انتخابی در لیزوزوم‌های ثانویه بزرگ که‌هم در سلول‌های در حال‌مرگ وهم در ماکروفاژها پیدامی‌شود متمرکز می‌گردد. از پای جنین‌ها با استریومیکروسکوپ دوربین دار عکس گرفته شد و در نهایت الگوی مرگ سلولی بین انگشتی رسم گردید.

یافته‌ها: مرگ سلولی بین انگشتی هم در جوجه و هم در اردک دیده شد. در جوجه مرگ سلولی بین انگشتی در روز ۶/۵ جنینی شروع ، در روز ۷/۵ جنینی به‌طور ویژه شدیدگردیدودر روز ۸/۵ جنینی خاتمه پیداکرد و این درست زمانی است که بافت بین‌انگشتی به‌طورکامل پسروی پیدا می‌کند. دراردک هم‌مثل جوجه، مرگ سلولی در بافت بین انگشتی چهار انگشت پا دیده شد امّا شدت و وسعت مناطق اشغال شده‌اش کمتر از جوجه بود. مرگ سلولی بین انگشتی در اردک از روز ۹ جنینی شروع و در روز ۹/۵ جنینی ادامه یافت و بالاخره در روز ۱۱ جنینی خاتمه پیداکرد. غشای بین انگشتی اول و سوم اردک منطقه نکروتیک مشابهی را نشان دادند در صورتی که شکل نهایی انگشتان در این مناطق متفاوت است.

نتیجه گیری: مقایسه طرح مرگ سلولی بین انگشتی در جوجه و اردک نشان داد که مرگ سلولی با برداشتن مزانشیم بین انگشتی در جداکردن و شکل دادن انگشتان (Sculpturing) نقش دارد. همچنین مقایسه شدت مرگ سلولی با شکل نهایی انگشتان بیانگر آن است که احتمالاً علاوه بر مرگ سلولی، عوامل دیگری هم در جدا شدن انگشتان دخیل هستند. توصیه می‌شود مطالعات گسترده‌تری در زمینه مکانیسم فرآیند پسروی غشای بین انگشتی در سطح سلول و ژنتیکی بودن این نوع مرگ سلولی انجام گیرد.

واژگان کلیدی: مرگ سلولی، غشای بین انگشتی، جنین جوجه، جنین اردک

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان، گروه آسیب‌شناسی و بافت‌شناسی
** دانشگاه تربیت مدرس ، گروه علوم تشریح
*** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی تهران، گروه علوم تشریح

مقدمه

مرگ سلولی یک رویداد ضروری در تکامل موجودات پرسلولی است. در بعضی از موارد روند مرگ سلولی به سختی قابل مشاهده است و سلولهای منحصر به فردی درون یک بافت دچار مرگ می‌شوند. در موارد دیگر، تعداد زیادی از سلولها یا حتی تمام ترکیبات سلولی یک عضو در مراحل تکاملی مشخصی می‌میرند. این نوع اخیر مرگ سلولی به دلیل نقش احتمالی آن به عنوان یک مکانیسم تعیین کنندهٔ شکل طبیعی و یا غیر طبیعی موجودات در حال تکامل، توجه جنین شناسان را به خود جلب کرده است (۱،۲،۳،۴).

یکی از بهترین مدل‌های مطالعه نقش مرگ سلولی در سیستم‌های در حال تکامل، غشای بین انگشتی و ایجاد انگشتان آزاد است (۵،۶). تکامل انگشتان بیشتر مهره‌داران به وسیله جدا شدن از یک صفحهٔ دست یا پای اولیه به وقوع می‌پیوندد. طی تکامل سلولهای مزانشیمی که منشأ انگشتان هستند شروع به غضروفی شدن می‌کنند و انگشتان را به وجود می‌آورند و غشای مزانشیمی که در بین انگشتان قرار دارند به شدت تحلیل می‌روند و بدین تریتب سبب جدا شدن انگشتان می‌گردند. مرگ سلولی به عنوان عامل اصلی این فرآیند گزارش شده است (۱۰، ۹، ۸، ۷). در صورت عدم وقوع مرگ سلولی که می‌تواند با منشأ ژنتیکی و یا با استفاده از داروی مانع کننده مرگ سلولی بین انگشتی (INZ)باشد، انگشتان به هم چسبیده (Syndactyly) ایجاد می‌شود که دلیلی برای نقش مرگ سلولی در جدا شدن انگشتان است (۱۲ ، ۱۱).

هم‌چنین مطالعات زیادی وجود دارد که نقش مهم بافت اکتودرمی را در جدا شدن انگشتان نشان می‌دهد (۱۴، ۱۳).

در دوزیستان تکامل انگشتان آزاد در غیاب مرگ سلولی صورت می‌گیرد و حدس زده می‌شود که اختلاف رشد انگشتان با فضاهای بین انگشتی در تکامل انگشتان آزاد دخیل باشد (۱۵).

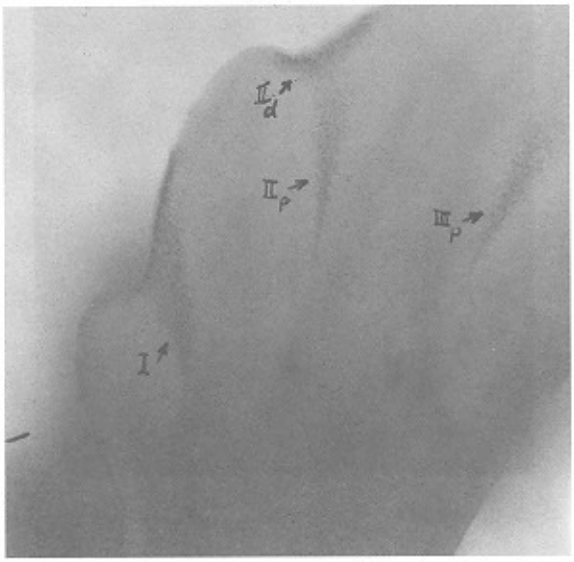
مطالعات بعدی نشان می‌دهد که تغییر شکل لایه قاعده‌ای در محل ممکن است در ناپدید شدن بافت نقش داشته باشد (۱۶).

با توجه به مطالعات مذکور به منظور تعیین نقش مورفوژنتیک مرگ سلولی در شکل‌گیری انگشتان زاید، این مطالعه بر روی غشای بین انگشتی جنین جوجه با انگشت آزاد (گروه مورد) و جنین اردک با پای پرده دار (گروه شاهد) در دانشگاه تربیت مدرس طی سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روشها

پژوهش حاضر با روش تحلیلی از نوع هم‌گروهی (Cohort) صورت پذیرفت. تخم مرغ‌های نژاد White Leghom و تخم اردک‌های نژاد Royal pekin نطفه دار در حرارت ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت انکوبه شدند. جنین‌های جوجه از روز ششم تا نهم انکوباسیون (Stage 29-35) و جنین‌های اردک از روز هشت و نیم تا یازدهم انکوباسیون در فواصل ۱۲ ساعتی برای مطالعه انتخاب گردیدند. در این تحقیق ، (Neutral red) به عنوان رنگ حیاتی و با روش Hinchliffe& Ede (۱۴) به کار رفت. این رنگ در لیزوزوم‌های ثانویه بزرگ که هم در سلول‌های در حال مرگ و هم در ماکروفاژها که قطعات سلولهای مرده را می‌بلعند متمرکز می‌شود. با این رنگ‌آمیزی به راحتی می‌توان روند شروع، گسترش و خاتمه مرگ سلولی را مشخص کرد و بدین وسیله الگوی مرگ سلولی (Patterns of cell death) را در بافت بین انگشتی رسم کرد. در این رنگ آمیزی سلولهای مرده، قطعات آنها و

ماکروفاژها از همدیگر تشخیص داده نمی‌شوند. بعد از باز کردن پنجره بر روی تخم، ۰/۵ سی‌سی محلول قرمز خنثی ($\frac{1}{10000}$ در سالین) به داخل کیسه آمنیون تزریق گردید. سپس دوباره جنین‌ها برای ۳۰ دقیقه انکوبه شدند تا رنگ در محلهای انتخابی خاص متمرکز گردد. بعد از برداشتن جنینها از تخم، پای آنها را قطع کرده در یک ظرف محتوی سرم فیزیولوژی قرار داده شد و بلافاصله با استریومیکروسکوپ دوربین دار از آن عکس گرفته شد و در نهایت، الگوی مرگ سلولی بین انگشتی رسم گردید تا مرگ سلولی و شدت آن در دو غشای بین انگشتی جوجه (گروه مورد) و اردک (گروه شاهد) تعیین و مقایسه شد.



شکل ۱ـ پای جوجه در روز هفتم جنینی در مرحله پیشرفته، در web بین انگشتی اول یک منطقه نکروتیک وسیع از پروگزیمال تا دیستال غشای وجود دارد(I) در web بین انگشتی دوم دو منطقه نکروتیک یکی در پروگزیمال (IIp) و دیگری در دیستال (IId) دیده می‌شود. در web بین انگشتی سوم تنها در قسمت پروگزیمال غشای (IIIp) یک منطقه نکروتیک مشاهده می‌گردد. (رنگ آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۵۰ x)

یافته‌ها

در جوجه شروع مرگ سلولی بین انگشتی در مرحله ۳۰ یعنی روز ۶/۵ جنینی بود. در این مرحله مرگ سلولی در web بین انگشتی اول (بین انگشت ۱ و ۲) در ناحیه دیستال و در web بین انگشتی سوم (بین انگشت ۳ و ۴) در ناحیه پروگزیمال مشاهده می‌گردد.

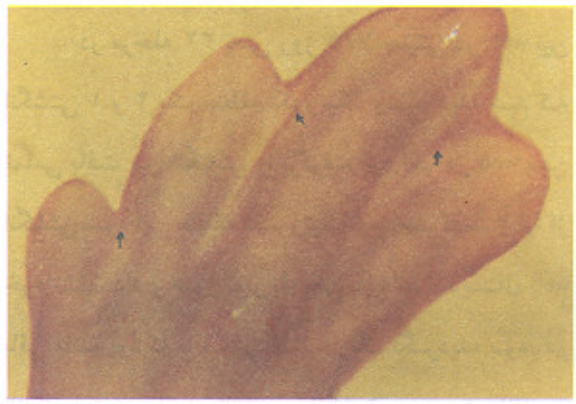
در روز ۷ جنینی (مرحله ۳۱)، مرگ سلولی گسترش پیدا کرده و در همه فضاهای بین انگشتی دیده می‌شود. در اولین فضای بین انگشتی دو منطقه نکروتیک یکی در پروگزیمال و دیگری در دیستال ملاحظه می‌گردد که در نهایت، در انتهای روز ۷ یعنی مرحله ۳۱ این دو ناحیه به هم متصل می‌شود. در web بین انگشتی دوم در ابتدا یک منطقه نکروتیک در پروگزیمال و سپس در دیستال مشاهده می‌گردد و خلاصه در web بین انگشتی سوم تنها مرگ سلولی در ناحیه پروگزیمال webدیده می‌شود. شکل (۱) پای جوجه در روز هفتم جنینی در مرحله پیشرفته را نشان می‌دهد.

در مرحله ۳۲ یعنی روز ۷/۵ جنینی در web بین انگشتی ۱ و ۲ یک منطقه نکروتیک وسیع دیده شد که تمامی بافت بین انگشتی را برگرفته بود امّا در web بین انگشتی سوم این منطقه نکروتیک وسعت کمتری را از خود نشان داد و هنوز نوار باریکی در ناحیه دیستال web باقی مانده بود که با قرمز خنثی رنگ نگردیده بود. در انتهای این مرحله در web بین انگشتی سوم همانند دو غشای بین انگشتی دیگر مرگ سلولی هم در ناحیه پروگزیمال و هم در دیستال ملاحظه شد.

شکل (۲) پای جوجه در این روز را نشان می دهد.

شکل ۲ـ پای جوجه در روز ۷/۵ جنینی (Stage 32)، مرگ سلولی (پیکانها) در هر سه غشای بین انگشتی به طور گسترده وجود دارد. (رنگ آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۵۵ x)

در روز ۸-۷/۵ جنینی (مرحله ۳۳) هم‌چنان که مرگ سلولی در تمامی نقاط web چهار انگشت گسترش پیدا می‌کند، از وسعت بافت بین انگشتی کم می‌شود. در اواخر این مرحله، همراه با شکل‌گیری نهایی انگشتان از شدت مرگ سلولی کاسته می‌گردد. شکل (۳) پای جوجه در این روز را نشان می‌دهد.



شکل ۳ـ پای جوجه در روز ۸ ـ ۷/۵ جنینی (Stage 33)، شدت مرگ (پیکانها) در هر سه غشای بین انگشتی نسبت به مرحله قبل کاهش یافته است. (رنگ آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۴۰ x)

در روز ۸ جنینی (مرحله ۳۴) تنها کمی مرگ سلولی در اطراف چهار انگشت دیده می‌شد که در مرحله ۳۵ یعنی روز ۹-۸ جنینی از مقدار آن هم کاسته و تنها در نوک باقیمانده غشای بین انگشتی دیده می‌شد. بدین طریق مرگ سلولی در انتهای این مرحله در ناحیه web ، خاتمه پیدا می‌کند و پا شکل نهایی خود را با انگشتان آزاد پیدا می‌کند. شکل (۴) پای جوجه در این روز را نشان می دهد.

شکل ۴ـ پای جوجه در روز ۸ جنینی (Stage 34)، مرگ سلولی در قسمت قدامی و خلفی انگشتان (پیکانها) دیده می‌شود تا مزانشیم تمایز نیافته اضافی را بردارد(رنگ آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۴۰ x)

در اردک هم مثل جوجه، مرگ سلولی در بافت بین انگشتی چهار انگشت پا دیده می‌شود اما شدت و وسعت مناطق اشغال گردیده‌اش کمتر است.

تا روز ۸/۵ جنینی مرگ سلولی بین انگشتی ملاحظه نمی‌شود. شروع مرگ سلولی بین انگشتی از روز ۹ جنینی است. در این روز غشای بین انگشتی اول (بین

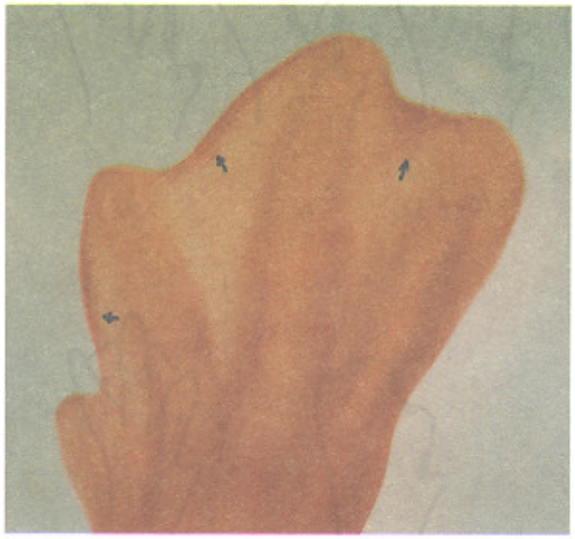
انگشت ۱ و ۲) یک منطقه نکروتیک وسیعی را نشان می‌دهد که از دیستال تا پروگزیمال کشیده شده است، در حالی که‌در غشای بین انگشتی دوم و سوم مرگ سلولی تنها در قسمت کوچکی از پروگزیمال مشاهده می‌گردد. شکل (۵) پای اردک در این روز را نشان می‌دهد.

شکل ۵ـ پای اردک در روز ۹ جنینی، مرگ سلولی در web بین انگشتی اول I و دوم II دیده می‌شود (پیکانها)، اما شدت آن در اولی بیشتر است. (رنگ آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۴۰ x)

در روز ۹/۵ جنینی شدت مرگ سلولی در غشا بین انگشتی اول و سوم زیاد است، در حالی که‌در غشای بین انگشتی دوم مرگ سلولی در منطقه کوچکی از دیستال غشا دیده می‌شود. شکل (۶) پای اردک در این روز را نشان می‌دهد.

در روز ۱۰ جنینی، شدت مرگ سلولی در غشای بین انگشتی تقلیل می‌یابد. مرگ سلولی در غشا بین انگشتی ۱و۲ به مقدار کم فقط در حاشیه غشا مشاهده می‌گردد، در حالی که‌در غشا بین انگشتی سوم گسترش بیشتری دارد.

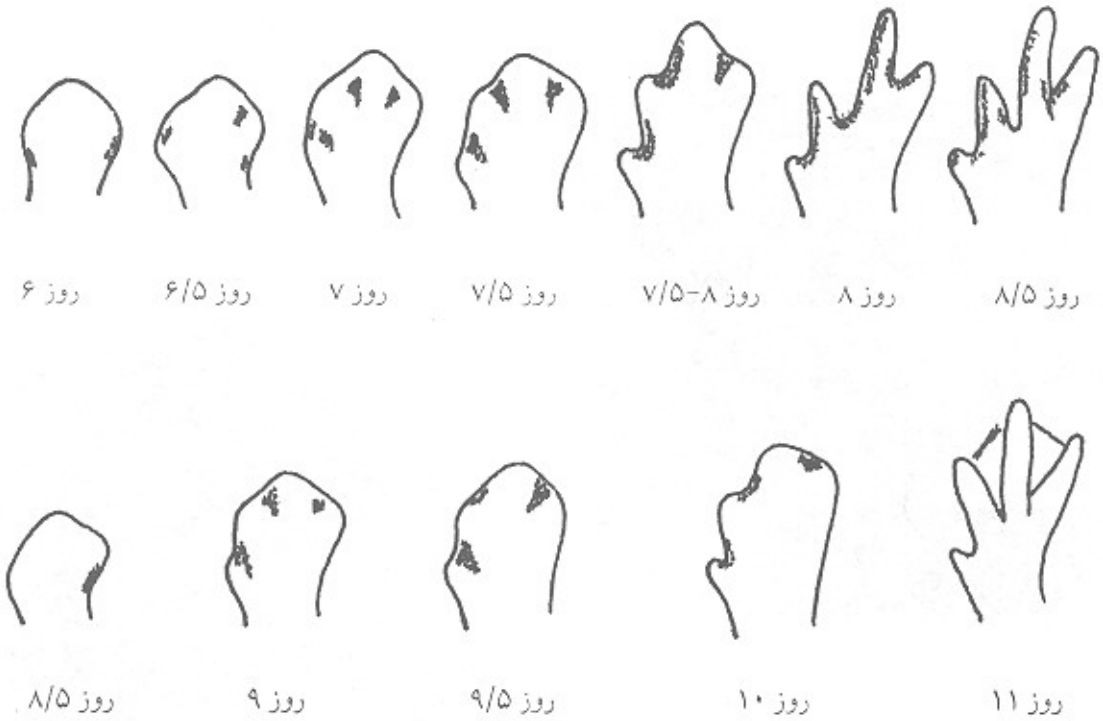
در روز ۱۱ جنینی، پا شکل بالغ خود را پیدا کرده است بدین ترتیب که غشا بین انگشتی اول تقریباً به طور کامل از بین رفته است اما غشا بین انگشتی دوم و سوم پسروی محدود و کمی تا زیر سطح قله‌های انگشتان پیدا کرده است. شکل (۷) پای اردک در انتهای روز ۱۱ جنینی را نشان می‌دهد.



شکل ۶ـ پای اردک در روز ۹/۵ جنینی ، مرگ سلولی (پیکان‌ها) در هر سه غشای بین انگشتی وجود دارد.
(رنگ آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۳۵ x)

شکل ۷ـ پای اردک در روز ۱۱ جنینی شکل بالغ خود را پیدا کرده و مرگ سلولی بین انگشتی خاتمه یافته است. web بین انگشتی اول تقریباً به طور کامل از بین رفته اما web بین انگشتی دوم و سوم فقط اندکی پسروی داشته است. (رنگ‌آمیزی قرمز خنثی، درشت نمایی ۳۰ x)

در شکل ۸ الگوی مرگ سلولی بین انگشتی در جوجه و اردک خلاصه شده است.



شکل ۸ـ الگوی مرگ سلولی در بافت بین انگشتی پای جوجه (بالا) و پای اردک (پایین)

بحث

تحقیق نشان داد که مرگ سلولی بین انگشتی هم در جوجه و هم در اردک وجود دارد اما شدت و گسترش مناطق اشغال شده‌اش در اردک کمتر از جوجه است. این تفاوت را می‌توان با آزاد بودن انگشتان در جوجه و وجود پرده در پای اردک تفسیر کرد. Hinchliffe نیز در سال ۱۹۸۲ با مطالعه گونه‌های با پای پرده دار نشان داد که شدت و گسترش مناطق نکروتیک بین انگشتی در آنها کاهش یافته است (۱۸). در تحقیق، مرگ سلولی بین انگشتی در جوجه در روز ۶/۵ جنینی (مرحله ۳۰) شروع، درروز ۷/۵ جنینی (مرحله ۳۲) به اوج خود رسید و سپس در روز ۸/۵ جنینی (مرحله ۳۵) خاتمه پیدا کرد و این درست زمانی است که بافت بین انگشتی به طور کامل پسروی و پا شکل بالغ خود را با انگشتان آزاد پیدا کرده است. الگوی مرگ سلولی بین انگشتی اولین بار توسط Hinchliffe در سال ۱۹۷۴ رسم شد. او اظهار داشت که مرگ سلولی ابتدا در ناحیه پروگزیمال بافت بین انگشتی شروع و سپس به یک منطقه دیستال مرگ سلولی که بعداً بروز یافته است، متصل می‌شود (۱۹). در این تحقیق الگوی مذکور تنها در web بین انگشتی دوم مشاهده گردید. در web بین انگشتی اول این حالت بر عکس بود و در web بین انگشتی سوم ابتدا یک منطقه نکروتیک در ناحیه پروگزیمال غشا دیده شد که به طرف دیستال گسترش پیدا کرد تا این که‌سراسر غشا را دربرگرفت. بنابراین، سه غشای بین انگشتی جوجه الگوی مرگ سلولی متفاوتی را پیروی می‌کنند که با یافته‌های Hinchliffe متفاوت است. این تفاوت شاید به دلیل اختلاف در گونه باشد.

در اردک اولین و سومین فضای بین انگشتی بزرگ‌ترین منطقه نکروتیک را از خود نشان دادند، در حالی که در دومین فضای بین انگشتی منطقه نکروتیک فقط در قسمت دیستال استقرار یافته بود. الگوی مرگ سلولی بین انگشتی در اردک توسط Hurle& Colvee در سال ۱۹۸۲

رسم شد (۱۴)، آنها اظهار داشته‌اند که اولین فضای بین انگشتی اردک بزرگترین منطقه نکروتیک را از خود نشان می‌دهد و در دومین و سومین فضا تنها در قسمت حاشیه‌ای غشا مرگ سلولی مشاهده می‌گردد. آنها شکل نهایی انگشتان را به تفاوت در شدت گسترش مرگ سلولی در فضاهای بین انگشتی وابسته دانستند، زیرا در اردک web بین انگشتی اول کاملاً از بین رفته است و web بین انگشتی دوم و سوم تنها کمی تا زیر نوک قله‌های انگشتان پسروی پیدا کرده است. بدین ترتیب مرگ سلولی پروگزیمال احتمالاً برای نازک شدن پرده بین انگشتی و مرگ سلولی مارژینال برای پسروی محدود و موضعی غشای زیر سطح قله‌های انگشتان انجام می‌گیرد. نتایج ما در مورد اولین و دومین فضای بین انگشتی مشابه نتایج قبلی بود اما در مورد فضای بین انگشتی سوم متفاوت بود. یعنی با وجود این که انگشت ۳ و ۴ با یک پرده بین انگشتی بزرگی به هم اتصال یافته‌اند یک منطقه نکروتیک برجسته مشابه با فضای بین انگشتی اول در این محل دیده می‌شود و این در حالی است که انگشت ۱ و ۲ کاملاً از هم جدا شده‌اند. شاید مرگ سلولی در web بین انگشتی سوم بیشتر سبب نازک شدن غشای بین انگشتی شود و نه پسروی کامل آن و در web بین انگشتی اول هم که شدت مرگ سلولی مشابه web بین انگشتی سوم است احتمالاً علاوه بر مرگ سلولی پدیده‌های دیگری مثل اختلاف رشد انگشتان و یا تغییرات اجزای سلولی نیز توانسته است در شکل‌گیری انگشتان نقش داشته باشد. بنابراین، می‌توان گفت تفاوت در شدت و گسترش مرگ سلولی در سلولهای بین انگشتی به شکل نهایی انگشتان بستگی دارد امّا رابطهٔ بین مرگ سلولی و مورفولوژی انگشت به اندازه‌ای نیست که بتوان از الگوی مرگ سلولی به مورفولوژی انگشت پی برد. Cameron و همکاران نیز در سال ۱۹۷۷ با مطالعه غشای بین انگشتی در حال پسرفت دوزیستان و عدم مشاهده مرگ سلولی اختلاف رشد انگشتان با فضاهای بین انگشتی را در تکامل انگشتان آزاد دخیل دانستند (۱۵). Hurle &Colvee با مشاهده پای جوجه و اردک توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)نشان دادند علاوه بر شدت زیادتر مرگ سلولی بین انگشتی، لایه‌ای اپی‌تلیال فضای بین انگشتی جوجه تغییرات مهمی را تحمل می‌کند که در اردک وجود ندارد و بدین وسیله دخالت اکتودرم را در تفکیک انگشتان نشان دادند(۱۴). بررسی ما نشان داد موقعی که مرگ سلولی در غشای بین انگشتی تمام می‌شود (مرحله ۳۴). در طول حاشیه قدامی (Anterior) و خلفی (Posterior) انگشتان ادامه پیدا می‌کند تا مزانشیم تمایز نیافته اضافی را بردارد. می‌توان گفت مرگ سلولی بین انگشتی نقش تراشکاری (Sculpturing) را در تکامل اندام به عهده دارد. Hurle در سال ۱۹۸۸ نقش مرگ سلولی بین انگشتی را شکل دادن به انگشتان و کنترل تعداد آنها بیان می‌کند (۱).

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که حذف غشای بین انگشتی یک فرآیند پیچیده‌ای است که مرگ سلولی فقط یکی از عوامل درگیر در آن است و پیشنهاد می‌شود مطالعات تجربی در زمینه تأخیر مرگ سلولی و تأثیر آن بر روی web بین انگشتی و همچنین در مورد نقش عوامل مختلف در سطح سلولی در از بین رفتن web و ژنتیکی بودن مرگ سلولی انجام گیرد.

References:

1. Hurle JM. Cell death in developing systems. Meth Arch Exp Pathol. 1988; 13:55-86.

2. Barinaga L. Forgoing a path to cell death. Science. 1996; 273: 9.
3. Gregory CD. Apoptosis. Cell. 1996; 84: 517-519.
4. Cummings MC. Apoptosis. Am J Surg Pathol. 1997; 21: 88-101.
5. Hurle JM. Fernandez- Teran MA. Fine structure of the regressing interdigital membranes during the formation of the chick embryo leg bud. J Embryol Exp Morph. 1983; 78: 195-209.
6. Hurle JM. Fernandez- Teran MA. Fine structure of the interdigital membranes during the morphogenesis of the digit of the webbed foot of the duck embryo. J Embryol Exp Morph. 1984; 79: 201-210.
7. Saunders JW. Fallon JF. Cell death in morphogenesis in Lock, Major problems in development biology. 1st ed. New york: Academic press; 1967: 289-314.
8. Ballard JK. Holt SJ. Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the Foetal rat foot, the role of macrophages and hydrolytic enzymes. J Cell Sci. 1968; 3: 245-61.
9. Fallon JF. Cameron J. Interdigital cell during limb development of the turtle and lizard with an interpretaton of evolutionary significance. J Embryol Exp Morph. 1977; 40: 485-489.
10. Bowen ML. Cell death in biology and pathology. 1st ed. St Louis: Chapman and Hall; 1981: 137-153.
11. Hinchliffe JR. Thorogood PV. Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid mutant chick embryo. J Embryol Exp Morph. 1974; 31: 747-760.
12. Menkes B. Deleanu M. Leg differention and experimental syndactyly in chick embryo. Embryol Cytol. 1964; 1: 69-77.
13. Kelley RO. Fallon JF. A Freeze fracture and morphometric analysis of gap junctions on limb bud cell, Limb development and Regeneration. 1983: 119-130.
14. Hurle JM. Colvee E. Surface change in the embryonic interdigital epithelium during the formation of the free digits. J Embryol Exp Morph. 1982; 69: 251-263.
15. Cameron JF. The absence of cell death during development of free digits in amphibians. 1977; 55: 331-338.
16. Trelstda RL. The epithelial mesenchymal interface of the male rat mullerian duct: Loss of basment membrane integrity and ductal regression. Devl Biol. 1982; 92: 27-40.
17. Hinchliffe JR. Ede DA. Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless chick. Embryos. 1973; 30: 753-772.
18. Hinchliffe JR. Cell death invertebrate limb morphogenesis, Harrison Navaration progress in anatomy. 1982; 2: 1-19 .
19. Hinchliffe JR. Cell death invertebrate limb morphogenesis. Libyan J Sci. 1974: 4-A.