

Semmelweis Egyetem
Általános Orvostudományi Kar

SZAKDOLGOZAT

**A körömperc csontosodása a fejlődő humán
embryóban**

Készítette: Molnár Attila, VI. évf. H/3

Témavezető: Dr. habil. Nagy Nándor, egyetemi adjunktus

Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet



1. Bevezetés

"Miképpen hogy nem tudod, melyik a szélnek útja, és miképpen vannak a csontok a terhes asszony méhében..."

(A prédikátor Salamon könyve 12. fejezet)

A végtagok csontosodása igen bonyolult, többféle morphogenetikai mechanizmus által irányított folyamat, s mikor és hogyan zajlik az, nemcsak a hétköznapi embereket, hanem a kutatókat is régóta foglalkoztatja.

A humán regenerációs orvoslás számára kiemelt jelentőséggel bírnak azok a fejlődésbiológiai kutatások, amelyeknek célja a vázrendszer fejlődésének megismerése. A gerinctelenek és az alacsonyabb rendű gerincesek képesek teljesen újat növesztetni az elvesztett végtag helyére. Az emlősök, és köztük az ember nem ennyire szerencsés, mégis elmondható, hogy az ember is képes valamilyen szinten a végtagot regenerálni: újra tudjuk növesztetni ujjunk hegyét, amennyiben a köröm egy része megmarad a sérülés során. Feltételezik, hogy az amputációt követő regeneráció a meglévő, helyi sejtek átalakulásával történik, amelyek úgy programozódnak át, hogy a szövetkialakítás embryonális menetrendjébe újra beléphessenek. A regeneráció másik lehetséges forrása differenciálatlan, ún. felnőtt őssejtekből indulhat ki, amelyek, ha megfelelő jelet kapnak aktiválódnak és képesek számos különböző szöveti sejttypussá átalakulni. Egérembryokat vizsgálva 2013-ban leírtak egy olyan őssejtpopulációt, amely a körömlemez alatt, az úgynevezett körömmátrixban található. A kutatók szerint ezek az őssejtek és a köröm alatt található hámréteg együttesen teszik lehetővé az ujjbegy regenerációját.

A végtagok fejlődését irányító fejlődésbiológiai folyamatok karakterizálása, és az őssejtek differenciálódását nyomon követő kutatások, reményt adhatnak arra, hogy a végtagok fejlődését érintő rendellenességek, illetve baleset vagy betegség miatt elvesztett emberi végtagok is gyógyíthatók, újránöveszthetők legyenek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1.Végtagok korai fejlődése :

21.1.Végtagbimbó megjelenése:

Humán embryo esetében a végtagok kezdeményének tekinthető ún. végtagbimbó a felső végtag helyén megközelítőleg a 26. napon, míg az alsó végtagnál a 28. napon jelenik meg. Az utóbbi évek vizsgálati eredményei ugyanakkor lehetővé tették, hogy megismerjük az ezt megelőző fejlődési folyamatokat is.

A végtagbimbók az embryo ventrolateralis részén a test jól meghatározott területein jelennek meg. Ebben a régióban az oldallemez mesoderlát alkotó sejtek HOX génjeinek expressziója (különös tekintettel a HOXC és HOXB génekre) jelentősen eltér a törzs egyéb szakaszaira jellemző HOX kódtól. Emlős és csirke embryokon végzett vizsgálatok szerint a HOX C9 gének jelenléte szükséges a végtagbimbók leendő helyének meghatározásában. A HOX gének működésében és a végtagokat létrehozó mesenchyma sejtjeinek proliferációjában növekedési faktorok kulcs szereppel bírnak különös tekintettel a fibroblast növekedési faktorokra (FGF), amelyeket részben a végtagbimbót alkotó oldallemez mesoderma részben pedig az intermedier mesoderma termel. Ezen molekuláris kölcsönhatások eredményeként jön létre négy darab ectodermával borított bimbószerű mesoderma kiemelkedés az embryo testének jól meghatározott pontjain; a felső végtag esetében a 6.-8. nyaki szelvények szintjén míg az alsó végtag esetén a 3.-5. lumbális szelvény magasságában (Zeller és mtsai., 2009; Johnson és mtsai., 1997).

2.1.2.Végtag fejlődés szimmetria viszonyai:

A végtag bimbók növekedése szimmetria tengelyek mentén történik, amelynek egyik kulcstényezője az ectoderma–mesoderma kölcsönhatás. A mesoderma indukáló hatására a végtagbimbó csúcsi részén egy ectodermális megvastagodás az ún. Apicalis Ectoderma Redő (AER) jelenik meg. Az AER régió szerepe főként a végtag **proximo-distalis irányú** fejlődésében, illetve a terület alatti mesoderma proliferációjában van, amely terület növekedési zónának tekinthető. Ezen terület mesenchyma sejtjeire nem csak a felettük elhelyezkedő apicális ectoderma gyakorol hatást, hanem olyan pozicionális szignált is kapnak, amely a zónában való tartózkodásuk ideje során meghatározza, hogy később milyen vázelemet alakítanak ki. A zónát elsőként elhagyó sejtek a törzshöz közeli

(proximalis), míg a zónából később távozó sejtek a törzstől távolabbi (distalis) struktúrákat hozzák létre (Zeller és mtsai., 2009).

A **dorso-ventralis** tengely mentén történő fejlődés szintén ecto-mesodermális kölcsönhatáson alapszik, ugyanis a végtagmező szomszédságában elhelyezkedő oldallemez mesoderma ventralizáló ingereket küld a hozzá közeli ectoderma felé. A somiták felől pedig dorsalizáló ingerek érik a közelében elhelyezkedő ectodermát. Így viszonylag a korai fejlődési stádiumban már meghatározottá válik, hogy a végtag mely részén fognak helyet foglalni az exetensor izmok és melyik részén a flexor izmok, illetve az is, hogy a dorsális oldalra csoportosuljanak a körmöt termelő sejtcsoportok. A dorso-ventralis orientáció a Wnt7a és Engrail-1 gének expressziójával hozható kapcsolatba. A végtagbimbó dorzális ectodermájában a Wnt7a, a ventrális ectodermában az engrail-1 gén fejeződik ki (Logan és mtsai., 1997). Az ectoderma génexpressziós eltérése mellett fontos a mesodermális „asszimetria” is, amely az Lmx1 gén kifejeződésével hozható összefüggésbe. Az LMX1 gén a Wnt7a hatására jelenik meg a mesodermában (Holmes és mtsai, 2003).

Az **antero-posterior tengely** (Hüvelykujj-kisujj tengely) mentén történő fejlődés idején a végtagbimbó caudo-medialis helyzetű mesenchyma sejtcsoportjának meghatározó szerepe van az ujjak mintázatának kifejlődésében. Ezen kiemelt szerepe miatt a területet polarizáló zónának nevezik (ZPA). A ZPA sejtek Retinsavat illetve Sonic Hedgehog-ot (SHH) termelnek. Ezek a morfogének a koncentráció grádiens szerint fejtik ki hatásukat a környező szövetekre: a legmagasabb jelmolekula koncentráció mellett a hüvelyk, míg a legkisebb koncentráció mellett a kisujj fejlődik ki. A ZPA területén lokalizálódó mesenchyma sejtek BMP-2-t és BMP-4-t termelnek, ami elindítja a mesenchyma porccá és csonttá történő differenciálódását (Tickle és mtsai., 2013).

2.2. A végtagváz kialakulása:

2.2.1. A porcos váz kialakulása:

A végtagfejlődés következő nagy állomása a végtagbimbó úszószerű kiszélesedése, majd lapátszerű megvastagodása. Ezekkel a külső változásokkal párhuzamosan belső átrendeződés is megfigyelhetővé válik. A fejlődő végtag középső zónájában mesenchymalis tömörülés észlelhető intenzív sejtosztódásokkal, s ezt a sűrűn elhelyezkedő sejtcsoportosulást egy lazább szerkezetű mesenchymális köpeny veszi körül. Ennek eredményeként a felső végtag esetében az embryonális fejlődés 4. míg az alsó végtag esetén az 5. héten, a fejlődő végtag középső részén az úgynevezett scleroblastema jelenik

meg. A scleroblastemán kívül elhelyezkedő mesenchyma sejtek kiemelkedő szerepet játszanak a Hepatocytá Növekedési Factor(HGF) termelésében, ami a somita eredetű myoblastok által expresszált c-met tyrozin kináz receptor ligandja. A HGF termelés egy koncentráció grádiens hoz létre, amelynek irányába a somiták ventrális szögletéből származó myoblastok vándorolnak létrehozva a végtagok izomelemeinek telepét (Scaal és mtsai., 1999; Carlson, 2006)

A mesenchymalis tömörülést követően a scleroblastema sejtekben BMP-2 és BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein) növekedési factor termelődik. Ezek a növekedési faktorok a mesenchyma előporc irányú átalakulást segítik elő(Oberlender és Turan,1994). A BMP molekuláknak nem pusztán a porc irányba differenciálódó sejtek összekapcsolásában, hanem a SOX9 gén kifejeződésének elindításában is szerepet játszanak. Ez a gén, amely transzkripciós faktorként működik és a porcsejtek differenciálódásának genetikai programját indítja be (Hargus és mtsai., 2008). BMP-4 és SOX9 szükséges a porcra jellemző **II típusú kollagén** és aggrecan tartalmú extracellularis mátrix létrehozatalához. Mindezen molekuláris változások hatására az előporcból porc jön létre,ezzel kialakítva a végtagok porcos vázát és egyben előkészítve a következő folyamatot, ami a porcos vázelemek növekedése. A porcos váz létrejövedele a végtagok függesztő övének szintjén figyelhető meg először, majd innen halad proximo-disztális irányban, így a végtagok porcos vázának fejlődése a kéz és a láb porctelepeinek megjelenésével fejeződik be. Ugyanekkor megfigyelhetővé válik az apoptosis folyamata is, mint végtagformáló jelenség. A porcos ujjak kezdetben egy lapos mesenchyma lemezben jelennek meg, amelyen belül a porcos előtelepként megfigyelhető ujjugarakat apoptotikus interdigitális zónák választják el egymástól. Apoptosis következtében az ujjak közötti mesenchyma állomány fokozatosan csökken, majd eltűnik, az ujjak porcos telepei elkülönülnek egymástól és végül kialakul a kéz végleges alap formája. Molekuláris biológiai vizsgálatok szerint az apoptosis zónáinak kijelölésében a BMP fehérjéknek tulajdonítanak fontos szerepet. BMP-2, -4, és-7 molekulák mindegyike kifejeződik az interdigitális mesenchyma sejtekben. Embernél a BMP-4 jelátviteli útvonal hibája tehető felelőssé a syndactilia kialakulásáért (Bandyopadhyay és mtsai., 2006). A BMP molekulák tehát többféle szerepet is játszanak a végtagfejlődés során; kezdetben porcképződést szabályozó molekulák, majd néhány nap elteltével az embryonális fejlődés során ugyanaz a molekuláris mintázat sejtpusztulást okoz. Apoptosist indukáló tulajdonságuk mellett a BMP-k chondrogenézisben betöltött szerepe továbbra is megmarad. A végtagbimbók kialakulása

során tehát a sejtsztódások, differenciálódás és az apoptotikus folyamatok finoman szabályozott egyensúlya figyelhető meg.

2.2.2. A csontos váz kialakulása:

Következő lépést a végtagváz fejlődésében a végtagok csontos vázának kialakulása jelenti, amely diaphysealis (elsődleges csontosodási centrum) illetve epiphysisben lokalizálódó (másodlagos csontosodási centrum) csontmagokból történik. A diaphysisben lévő csontosodási magok intrauterin korban jelennek meg, míg az epiphysealis csontosodási magok többsége a születést követően. Továbbá, annak alapján, hogy a csont egy már meglévő úgynevezett porcos elő telepből fejlődik-e vagy differenciálatlan mesenchymasejtből közvetlen módon jön létre, jól megkülönböztethetünk elsődleges (primaer angiogen) vagy másodlagos (secunder) csontosodást. Primaer angiogen csontosodás jelenlétére a végtagok fejlődése során nem utalnak irodalmi adatok, ennek a csontosodásnak inkább a koponya és a csigolyák fejlődésében van szerepe. Secundaer csontosodás viszont nagy szerepet kap a végtagfejlődésben. A secundaer csontosodás esetén attól függően, hogy az milyen szöveti elő telepből képződik, kötőszöveti telepből kiinduló (desmalis) és porcos telepből induló (chondralis) csontosodást különböztetünk meg. A végtagok fejlődésében elsősorban a chondralis csontosodásnak van szerepe. A chondrális csontosodás kétirányú folyamatnak tekinthető, amelyben a két aspektus időben elkülönül. Az elsőként zajló folyamat a porc külső felszínéről indul meg, a porcos elő telepet borító porchártya felől veszi kezdetét. Ez a folyamat az úgynevezett perichondralis csontosodás, ami a humán embrionális fejlődés 7. hetében figyelhető meg először. A porchártya alatt lévő belső sejtrétegek átalakulnak osteoblastokká. Ez a differenciálódási lépés azt eredményezi, hogy ezek a sejtek a porc körül egy csontos tokot hoznak létre az ún. csontos mandzsettát. Az így átalakult előtelepet kívülről beborító tok periosteummá alakul, ami az elő telep végrészeinek megfelelően elvékonyodik, hisz itt a fejlett csontvégeken a későbbiekben ízületi porcot találunk, és amelynek nincs periosteális borítéka. A periosteum alatt a pusztuló porcsejtek helyén szöveti felritkulások jönnek létre, amelyek elemi velőüregként ismeretesek. Ezekbe az üregekbe a periosteum felől erek törnek be a porc belseje felé, lehetővé téve az időben második fázisként következő úgynevezett enchondrális csontosodást (Rölich, 2006).

Az enchondrális csontosodás esetén a porcos elő telep csontos átépülése nem a porc külső felszínéhez közel, hanem annak belsejében zajlik, amelyben szövettanilag 5 zónát

lehet elkülöníteni. A jellegzetes szövettani kép egyben a porc csont átmenet szakaszait mutatja, melyben a különböző fejlődési állomásokon más-más morfológiájú sejtekkel találkozhatunk.

Az első zóna sejtei normál nagyságú porcsejtek, melyek kisebb csoportokban helyezkednek el porcra jellemző mátrixtól körülveve, aminek egyik legkarakterisztikusabb molekulája a **II. típusú kollagén**. A második zóna (proliferációs zóna), sejteit tekintve kissé sűrűbb porcszövetet alkot. Ezekre a sejtekre a fokozott proliferáció jellemző. A harmadik zóna a praehypertrófiás vagy érési zóna, ahol az IHH (Indian Hedgehog) és PthrP (Parathyroid hormon-related Protein) növekedési faktorok termelésének eredményeként a porcsejtek megduzzadnak. A negyedik zóna a hipertrófiás vagy elfajulási zóna, sorokban ülő kukoricaszemekre emlékeztető megduzzadt porcsejtekből épül fel, mely sorok között porcos alapállomány van. A hipertrófiás zóna molekuláris mintázatára a VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) termelés jellemző. Ez a növekedési faktor lehetővé teszi az érkező elemek benövését ezen zóna felé. A molekuláris változások mellett a porcsejtek itt erősen degenerálódnak és későbbi pusztulásukkal átvezetnek a következő zónába. Az ötödik zóna az úgynevezett mesenchymalis invázió zónája vagy csontosodási zóna, ahol az elhalt porcsejtek helyén elemi velőüreg képződik és ebben a velőüregben a kapillárisok által ideszállított mesenchyma sejtek, haemopoeticus sejtek és osteoclastok lesznek megtalálhatóak. A mesenchyma sejtek osteoblastokká alakulnak és többek között Ca^{2+} kötő glicoproteineket (**osteonectint, osteopontint**) secretálnak, amelyek részt vesznek a csontra jellemző mátrix kialakításában a „korábbi” porcos alapállomány helyén (Mundlos és mtsai., 1992). Így az átalakuló porcos mátrixot irányító gerendaként vagy más néven spikulumként szokás emlegetni. Mindezen folyamatok eredményeképpen a porcos elő telep belsejében egy elsődleges csontszövet kialakulása veszi kezdetét, amely a primaer csontmagokat hozza létre. Ez a csontmag a fejlődés korai stádiumában expandál és lassan a diaphysis nagy részét kitölti.

A végtagváz elsődleges csontosodási centrumai jól meghatározott tér és időrendi sorrendben jelennek meg. A függesztő övek esetén a sorrend a következő: a felső végtagból (1.) clavicula, (2.) scapula, (3.), míg az alsó végtag esetében os ilium, (4.) os ischiadicum, (5.) os pubis. Összefoglalva lásd az 1. Táblázatban

A felső végtagban: először a humerus, majd a radius és az ulna kezd el csontosodni. Ezután nem a metacarpus csontok következnek, hanem a distalis phalanx, majd a metacarpus, később a proximalis phalanx végül a phalanx media lesz a sorrend.

Alsó végtag esetén a sorrend a következő: elsőként a femur ezt követően a tibia majd a fibula . A láb csontjainak fejlődésében elsőként a metatarsusokban jelenik meg csontosodás ezt követi a phalanx distalis , majd a phalanx proximalis végül pedig a phalanx media (Mall, 1906; O’Rahilly és mtsai.,1972; Patton és mtsai.,1995; Bareggi és mtsai.,1994).

Elsődleges csontosodási centrumok helye a Felső végtagban	Embryonalis kor napokban megadva	Elsődleges csontosodási centrumok helye az Alsó végtagban	Embryonalis kor napokban megadva
Clavicula, scapula	38., 55.	os ilium, os ischii, os pubis	56, kb 150, kb 180
Humerus	42.	Femur	42.
Radius	44.	Tibia	44.
Ulna	45.-49.	Fibula	55.
I.Metacarpus	58.	I.Metatarsus	58.
II.Metacarpus	57.	II.Metatarsus	58.
III.Metacarpus	57.	III.Metatarsus	58.
IV.Metacarpus	58.	IV.Metatarsus	58.
V.Metacarpus	58.	V.Metatarsus	58.
I.Proximalis Phalanx	64.	I.Proximalis Phalanx	83.
II.Proximalis Phalanx	58.	II.Proximalis Phalanx	83.
III.Proximalis Phalanx	58.	III.Proximalis Phalanx	83.
IV.Proximalis Phalanx	64.	IV.Proximalis Phalanx	83.
V.Proximalis Phalanx	64.	V.Proximalis Phalanx	83.
II.Phalanx Media	75.	II.Phalanx Media	120.-270.
III.Phalanx Media	75.	III.Phalanx Media	120.-270.
IV.Phalanx Media	75.	IV.Phalanx Media	120.-270.
V.Phalanx Media	83.	V.Phalanx Media	120.-270.
I.Phalanx Distalis	56.	I.Phalanx Distalis	58.
II.Phalanx Distalis	56.	II.Phalanx Distalis	58.

III.Phalanx Distalis	56.	III.Phalanx Distalis	58.
IV.Phalanx Distalis	56.	IV.Phalanx Distalis	58.
V.Phalanx Distalis	56.	V.Phalanx Distalis	65.

1. Táblázat: Primer Csontosodási magok megjelenése embryonalis napokban Kifejezve (Mall,1906; Törő,1964)

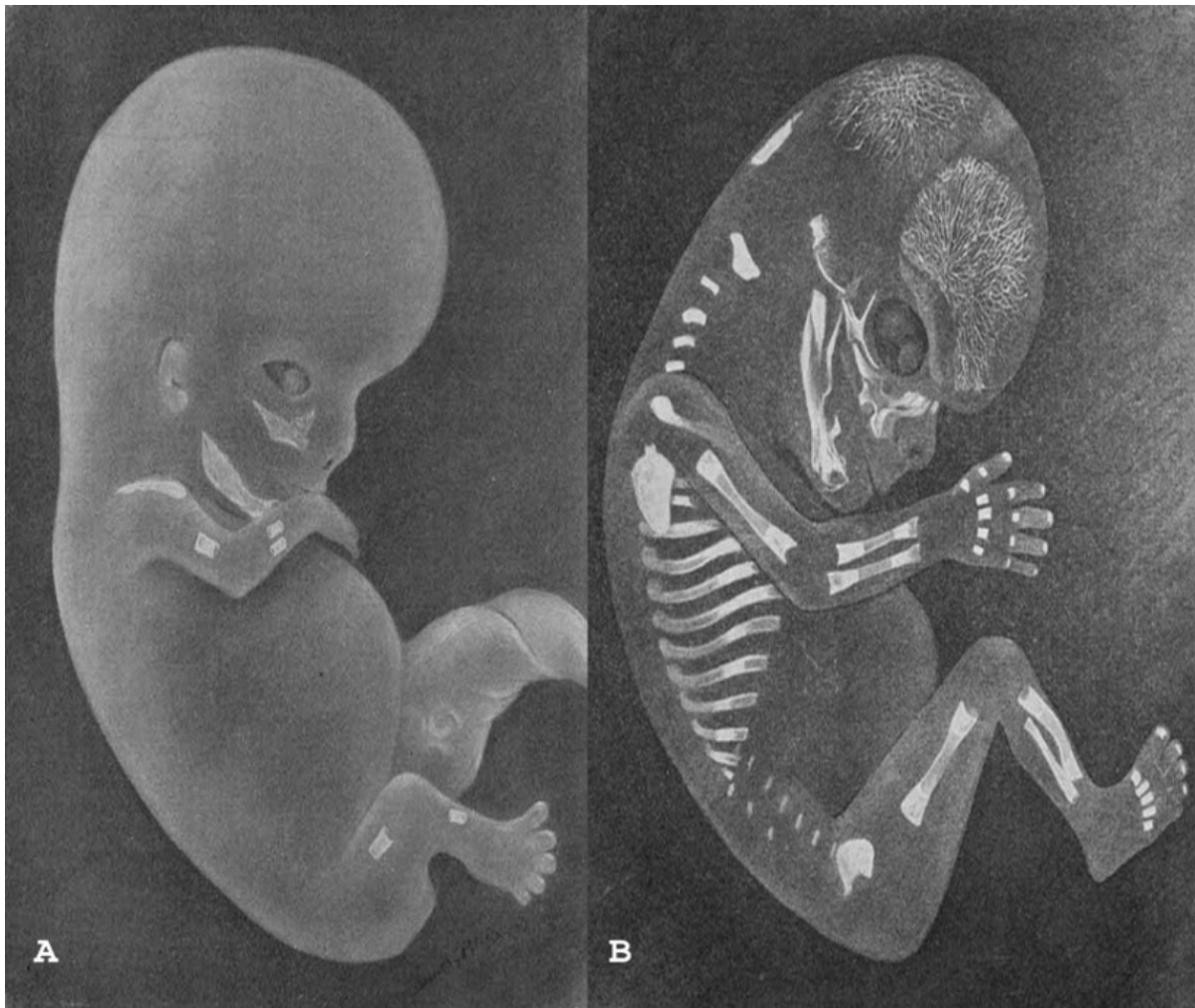
Míg a 7. héten csupán a maxillában, mandibulában illetve végtagok esetén a függesztő övben és a végtagok hosszú csöves csontjainak előtelepeiben lehet megfigyelni csontosodási magok jelenlétét, addig 3 héttel később a vázelemek szinte minden tagjában megjelenik a csontosodás (Mall,1906), (1. Ábra).

A Secunder (epiphysis) csontosodási magok megjelenése fontos a kormeghatározásban, illetve a magzati érettség egyik mutatója lehet.

A felső végtag esetén a humerus proximalis epiphysisében 3 csontosodási mag jelenik meg a születés utáni 2. héten, disztális epiphysisében 4 csontosodási mag a 12. évben. Radius proximalis epiphysisében 1 darab csontosodási mag a 4.-7. évben, disztális epiphysisében 2 darab csontosodási mag az 1.-12. évben. Az ulna proximalis epiphysisében 2 darab csontosodási mag 9.-11. évben, disztális epiphysisében 2 darab csontosodási mag 4.-8. évben. A kéztő csontokban egy-egy csontmag megjelenése figyelhető meg; az os hamatum, os capitatum esetén 1. évben. Os triquetrum esetén 2.-3. évben. Os lunatum, os trapezium és az os trapezoideum esetén 3.-6. évben. Os scaphoideum esetén 4.-6. évben. Os phisiphorme esetén a 8.-12. évben. A metacarpusok és az ujjpercek esetén csak egy végrészen figyelhetőek meg csontosodási magok. Kéztőcsontok esetén csak disztálisan, kivéve az I. metacarpust, ahol ez proximálisan jelenik meg 2.-3. évben. Az ujjpercek esetén pedig csak proximális megjelenés tapasztalható.

Az alsó végtag esetében a femur proximalis epiphysisében 3 darab csontosodási mag jelenik meg 1.-3. éves korig, míg a disztális epiphysisben a 10. magzati hónapban. A patellában egy csontosodási mag található, ami a 3.-4. évben jelenik meg. Tibia proximalis epiphysisében a 10. magzati hónapban illetve az 1. évben, disztális epiphysisében 1 darab a 2. évben. A fibula proximalis epiphysisében a 4. évben, disztális epiphysisében a 2. évben. A Talusban 7.-8. magzati hónapban, a calcaneusban 4.-7. magzati hónapban, az os naviculare esetén 3.-4. évben, az os cuboideum esetén a 10. magzati hónapban, az os cuneiforme medialeban 2.-3. évben, az intermediumban 3. évben és a lateralisban az 1.-2. évben. A metatarsusok és a lábujjpercek esetén csak egy végrészen jelenik meg

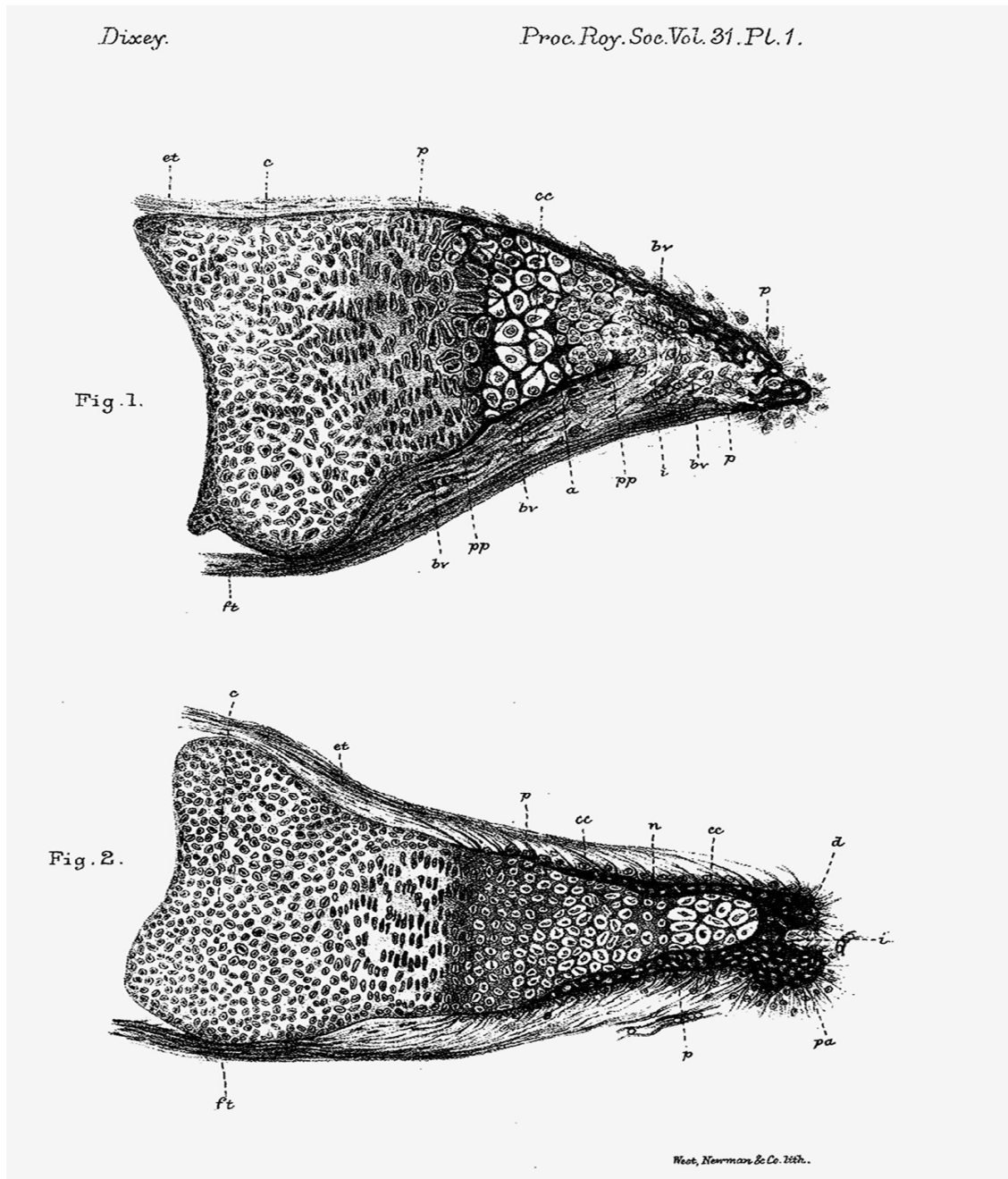
csontosodási mag. A metatarsusoknál csak disztálisan kivéve az I.-t, ahol proximálisan, ezek megjelenési ideje 2.-4. évre tehető. Az ujjpercekben csak proximálisan jelenik meg epiphysis mag 1.-5. évben (Cardoso, 2008; Werner és mtsai., 1996).



1.Ábra: Franklin P. Mall. 1906. *American Journal of Anatomy* után. A: Kb. 49 napos human embryo primaer csontosodási centrumai fehér krétával jelölve. B: Kb. 73 napos human embryo primaer csontosodási centrumai fehér krétával jelölve.

Ugyanakkor a kéz váz elemeinek csontosodása során a körömperc porcós részének fejlődése különbözik a többi ujjperc csontosodásától, hiszen itt a csontosodás a diaphysis területén nem laterális hanem disztális irányból az apicalis területek felől indul meg. Ezt a jelenséget először 1880-ban F.A. Dixey figyelte meg (2. Ábra). Emlős embryok összehasonlító szövettani vizsgálata alapján megfigyelte, hogy 16 hetes humán embryokban, illetve macska és disznó embryokban a körömperc porcós telepének disztális részénél csontszövet képződik. Munkájában felveti annak lehetőségét, hogy ez a terület desmalisan csontosodik. Habár később humán, bárány, egér és csirke embryok hisztológiai

és röntgen vizsgálatokon alapuló kísérleteiben mások is megfigyeltek hasonló jelenséget, mégis az anatómia tankönyvek egy részében még mindig az áll, hogy valamennyi phalanx csontosodása a diaphysisből indul ki (Werner és mtsai., 1996). 10-12 hetes humán embryok végtagjának Alizarin-Alcián kettősfestési technikával történő jelölése során mi is a porcos körömpercnek a disztális telepe előtt jól elkülönülő csontos képletet találtunk.



2.Ábra A): Körömperc csontosodása az emlős embryokban. Forrás: Dixey F.A. (1880). On the Ossification of the Terminal Phalanges of the Digits. Proc. R. Soc. London. 31:63-71. Fig.1.:4cm-es macska embryo láb, terminalis phalanx saggitális metszete, Chromsav Magenta festés utáni rajz. a; a későbbi mesenchymalis invázió betörési pontja. bv; erek. c; residuális porcszövet. cc; degenerálódott porcsejtek zónája. et; extensor digitorum ina. ft; Flexor digitorum profundus ina; a befelé terjeszkedő csont, amely a

porcos telexel összeszövődik. p; desmalis sapka csontszöve. pp; a desmalis csontos sapka és a porc határa. Fig.2.: 16. hét körüli human embryo 5. ujj körömpercének saggitális metszete. Picrinsav Magenta festés utáni rajz. d; a desmális sapka dorsalis része kevés lacunával. I; Mesenchymalis invázió betörési pontja. n; primer csont. pa; a desmalis sapka palmaris oldala több lacunával. Egyébb jelzésekben az előzővel azonos.



2.Ábra B): Körömperc csontosodása 17 hetes humán embryóban. Forrás: Nemeskéri Ágnes és mtsai. Szövetteni jegyzet I. Kiadó: Apáthy István Alapítvány, Budapest., 2013. A körömperc csontosodás apikálisan veszi kezdetét. .Kiemelt kép a nyíllal jelölt ujjpercről készült felvétel

3. Célkitűzés

A csontosodás nyomon követése humán embrionális végtagok csontos vázelemeinek fejlődése során, illetve a csontosodás időbeni különbségeinek összehasonlítása a felső és alsó végtagokon.

A körömperc fejlődésében jelenlévő csontosodási folyamatok hisztológiai karakterizálása.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Human embryok

Vizsgálatom során humán embryokat használtam, amelyek embryonális korát hetekben fejeztem ki. Az embryok korának hozzávetőleges megállapításakor a klinikusok által számított kort vettem össze azokkal a publikációkkal, amelyek a primaer csontosodási központok megjelenésén alapszanak (Mall, 1906; O’Rahilly,1972). A human embryokat a Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika biztosította a vizsgálatokhoz. Az embryok terhesség megszakításokból származnak. A beavatkozások előtt minden alkalommal megtörtént a résztvevők tájékoztatása azaz, hogy a terhesség megszakítást követően az embryokból mintavételezés történik és ezeket a mintákat a “Mesenchyma differenciálódása és a körömperc csontosodása a fejlődő human embryóban” című kutatásban használok fel. A tájékoztatás utolsó lépéseként a résztvevők egy „Tájékoztatáson alapuló beleegyező nyilatkozatot” írtak alá, amelyben a fentebb említett kritériumokat írásban megfogalmaztam (**3. Ábra**). Vizsgálataink a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatás Etikai Bizottságának Engedélyével történtek. (TUKEB engedély: 70/2012)

TÁJÉKOZTATÁSON ALAPULÓ BELEEGYZŐ NYILATKOZAT

"Mesenchyma differenciálódása és a körömperc csontosodása a fejlődő humán embryóban" című kutatáshoz

A tájékoztatást végző személy neve:.....
beosztása:.....
A résztvevő neve:.....
anyja neve:.....
születési helye és ideje:.....
TAJ száma.....
lakcíme:.....

Alulírott kijelentem, hogy önkéntesen vállalkozom arra, hogy a terhesség megszakítást követően a fent nevezett kutatáshoz az embryóból szövettani mintát vegyenek és vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetében elvégezzék. Tudomásul veszem, hogy a tőlem vett mintákat bármikor írásbeli kérésemre megsemmisítik. A laboratóriumok fenntartásában részt vevő orvosok gondoskodnak róla, hogy ezt az anyagot csak a velem közölt tudományos vizsgálat céljára használják fel. Saját és gyermekem adatairól és arról, hogy a vizsgálatban részt veszünk, akaratomon kívül senkit nem tudatnak.

Budapest, 2012.....

.....
A terhes aláírása

.....
A tájékoztatást végző orvos aláírása

.....
Tanú aláírása

3. Ábra: Tájékoztatóson alapuló beleegyző nyilatkozat.

4.2. A minták feldolgozása

A minták szövettani vizsgálatához első lépésben sztereomikroszkóp (Carl Zeiss Stemi SV 6) alatt az abortumokat megtisztítottam. Ebben a fázisban különböző, a mikropreparációs technikára alkalmas eszközöket használtam, úgymint mikro olló, csipesz, embryo spatula, szűrő. A tisztítás folyamatos PBS (foszfáttal puffereelt sóoldat) átmosás mellett zajlott. Az így kinyert humán emryonalis vázelemeket macroscopos Alizarin-Alcián festéshez, félvékony technikához, immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokhoz fixáltam. A szerveket tervezett immun hisztokémiai és immun fluoreszcens vizsgálatok esetén zselatinba, Félvékony metszés esetén araldit műgyantába ágyaztam be.

4.2.1. Fixáláshoz és beágyazáshoz használt oldatok:

1 liter PBS összetétele:

8g NaCl, 0,2g KCl, 1,42g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2g KH₂PO₄, desztillált víz

4%-os Glutáraldehid oldat:

4ml 25%-os Glutáraldehid (EMS 16220) oldathoz 21 ml Milloning puffert kevertünk.

Milloning puffer:

A puffer elegy egy "A" és egy "B" oldatból áll.

A oldat készítése: 11,3 gr NaH₂PO₄ x H₂O + 500 ml Desztillált víz összekeverése.

B oldat készítése: 5,04 gr NaOH + 500ml Desztillált víz összekeverése.

41,5 ml "A" oldat és 8,5 ml "B" oldat elegyítésével 50 ml Milloning puffert kapunk.

1%-os OsO₄ oldat:

Elektromikroszkópos célra történő utófixálásban használatos. 1gr. OsO₄-et (Polysciences 0972C-20) 50 ml desztillált vízzel összekeverünk majd csiszolt üvegben 1 napra sötétben állni hagyjuk. Az utófixáláshoz ezt az oldatot Milloning pufferrel 1:1 arányban összekeverjük és az anyagot ebben 2 órára állni hagyjuk.

Propilén-oxid intermedium:

ARALDIT polimerizátor komponensei:

50ml DMP30 (Diethyl-amino-etil-fenol) (EMS 13600)

50ml Poly/Bed 812 (EMS 14900)

50ml DDSA (Dodeceny succinic Anhydride) (EMS 13710)

30ml NMA (Nadic Methyl Anhydride) (EMS 19000)

4%-os pufferelt paraformaldehid (PFA, pH=7,4):

Egy lombikban 800ml desztillált vizet 70C^o-ra melegítettünk fel. Ezután 40g paraformaldehydet adtunk hozzá, majd az egészet mágneses keverőre helyeztük. A keletkezett oldathoz cseppenként hozzáadunk 200µl 1-5 M NaOH-ot (Reanal 14-052-1-38) a megfelelő pH eléréséig, majd 100ml 10X PBS-t mérünk az oldathoz. A lombikot továbbra is a mágneses keverőn tartva homogenizáljuk az oldatot, majd egy 1000ml-es mérőhengerbe átöntve, a térfogatát desztillált vízzel 1000ml-re állítottuk. Végül 15ml csövekbe szétosztva -20C^o-on tároltuk.

15%-os szacharóz oldat készítése:

75gr D-szacharózt (Reanal 07140-1-08-38) oldottunk fel 500ml PBS-ben. Az oldatot 4 °C -on hűtőben tároltuk.

(15%) Szacharóz (7,5%) Zselatin puffer:

500ml 15% -os szacharóz oldatot melegítettünk vigyázva, hogy nehegy elérjük az oldat forráspontját. A meleg oldatba 37,5 gr zselatint (Fluka 04055) keverünk annak teljes feloldódásáig. Az így kapott puffert 50 ml-es zárható csövekbe helyeztem és -20°C -on tároltam.

4.2.2. Félvékony blokk készítés és beágyazás:

Az abortumok PBS-vel történő átmosása és a humán embryok végtagjainak izolálását követően a végtagokat 4%-os glutáraldehydben fixáltuk 10 órán át. Majd 3x5 percig a preparátumot átmostuk Milloning pufferben. A mosást az utófixálás követte, amely OsO₄:Milloning puffer 1:1 arányú keverékében történt, sötét üvegben, fénytől védve és 2 órán át. Ismételt mosás következett 3x5 percig Milloning pufferben. Mosás utáni lépés a dehidráció volt. Ezt felszálló alkohol sorozatban végeztük. 30-50-70-80-90-96 % -os alkohololdatokban 10-10 percig illetve abszolút alkoholban 3x 20 percig. Majd az intermédium alkalmazása következett, amely propilén oxidos atmoszával kezdődött 2x15 percig majd ARALDIT hozzáadása volt a következő lépés, így az izolátum propilén oxid illetve ARALDIT keverékében 1x40 percig inkubálódott. Az inkubációt követően

megkezdődött a műanyag kapszulába töltés, úgy hogy egy végtagrészlet egy kapszulába került pontosan meghatározott orientációban. Az utolsó lépés a polymerizáltatás volt, ami 56 °C-on történt 24-48 órán át.

4.2.3. Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokkok készítése:

A kipreparált szerveket 1 órán keresztül fixáltuk pufferelt 4%-os paraformaldehidben (PFA), ezután foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, pH 7,2) háromszor 5 percig mostuk. A fixálást követően egy éjszakán keresztül 15%-os szacharóz PBS oldatában 4 °C -on inkubáltuk. A beágyazást megelőzően 37 °C -on 1 órán keresztül 15% szacharózt (Renal puris, M:342,30) és 7,5% zselatint (Fluka, 04055) tartalmazó PBS elegyében inkubáltuk. Ezután a szerveket a tálkákba kiöntött és megdermedt zselatinágyra helyeztük, majd öt percig szobahőn tartottuk, hogy a zselatinhoz tapadjanak. Ezt követően a még meleg és folyékony zselatinnal egy újabb réteget képezve befedtük a preparátumokat és 4 °C -on 10 percig hagytuk, hogy a zselatin megszilárduljon. 1x1 cm-es méretűre vágott zselatinos blokkokat Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology IND., 67690006) a jelölt kartonpapírokra rögzítettük. Utolsó lépésként a blokkot folyékony nitrogén segítségével -50 °C -ra hűtött izopentánban (2-metilbután, Sigma-Aldrich, M32631) körülbelül 1 perc alatt lefagyasztottuk és -80 °C -on tároltuk.

4.2.4. Makroszkópos technikák:

ALIZARIN-ALCIAN festés:

Az izolált embryokat 95%-os etanolban fixáltuk 3-4 napig. A lágy részeket a vázelemek szakadása nélkül eltávolítottuk, majd az embryokat 24 óráig acetone oldatba helyeztük zsírtalanítás céljából. A kettős fixálás után a preparátumokat Alizarin-Alcián festék oldatában 48 óráig kevertető gépen szobahőn inkubáltuk. Az Alizarin-Alcián oldat összetétele: 10ml 0,3% Alzian Blue 8GX (C174240, Chroma) tartalmú 70%-os etanol+10ml 0,1% Alizarin Red S (C158005, Merck) tartalmú 95%-os Etanol+10ml Jégecet+170 ml 70%-os etanol keveréke.

Festés során körülbelül 10-10 ml festék oldatot használtunk készítményenként.

A festést gyors desztillált vizes öblítés követte. Majd a következő lépés a derítés volt.

Mely során különböző koncentrációban alkalmaztuk a KOH–ot (Reanal) illetve a glicerin:

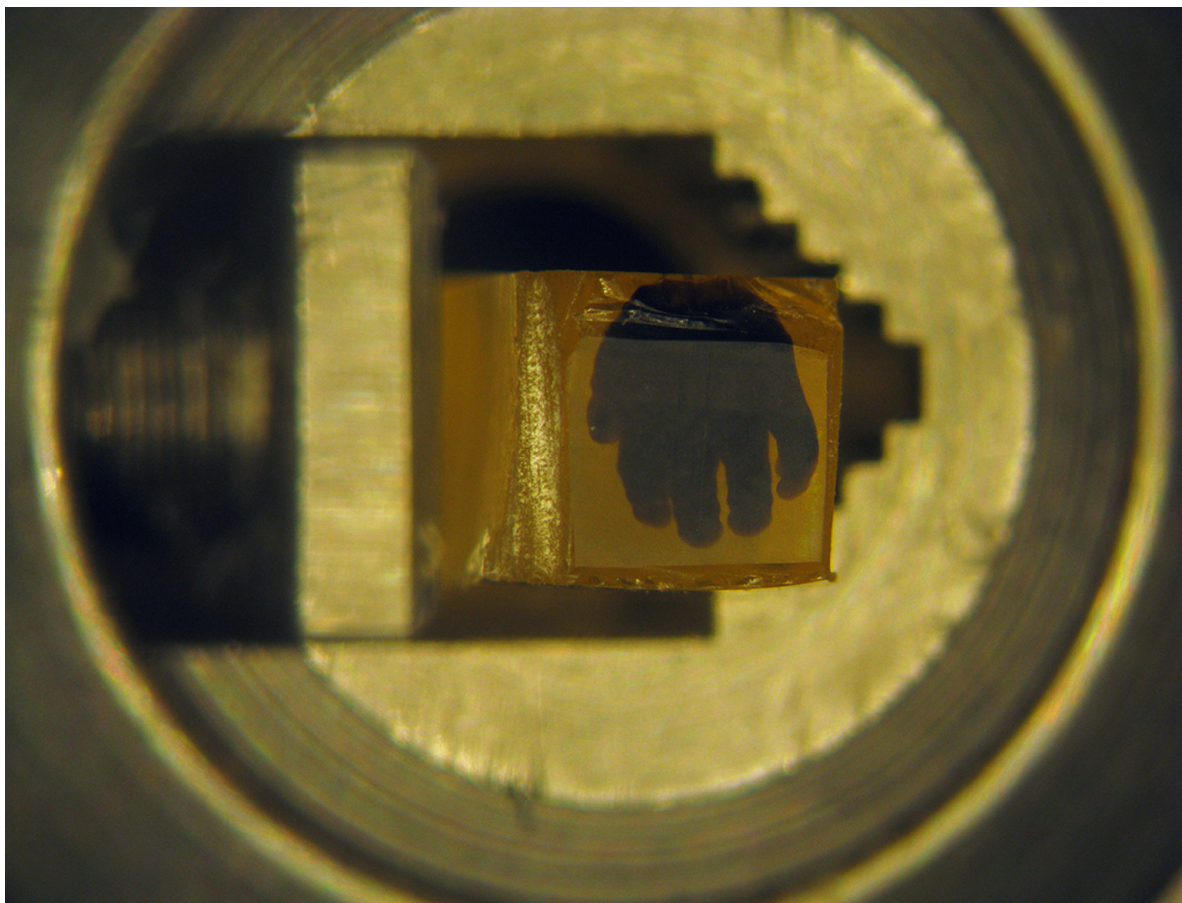
1. 1%-os vizes KOH oldat 24 óráig.
2. 20%-os glicerin oldat+1% KOH 1-5 napig.
3. 50% glicerin oldat 24 óráig.
4. 80%-os glicerin oldat 24 óráig.

A derítés végén a porcos területek kéken, míg a csontosodó régiók pirosan festődtek. Ezt követően az embryok tárolására 100% -os glicerin oldatot használtunk.

4.3. Metszetek készítése:

4.3.1. Félvékony technika:

Az araldit műgyantába ágyazott végtagokból borotvapengével történő befaragás után 1-1,5 mikrométeres félvékony metszeteket készítettünk Reichter-Jung Ultracut típusú mikrotómmal (4. Ábra). A festés toluidin kékkel történt. Az így elkészült metszeteket poly-L-lysine-nel bevont tárgylemezre vittük fel (Sigma, P8920).



4. Ábra: Kb. 10 hetes humán embryonális végtag műgyantába ágyazva. Polimerizált gyantás blokk befaragás után, félvékony metszésre előkészítve.

4.3.1. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia:

A zselatinos blokkokat -24C° -os munkahőmérsékleten Shadon gyártmányú cryotommal metsztük le. Metszés előtt a blokkokat a kriosztátba helyeztük, hogy felvegye annak hőmérsékletét. A metszetek vastagságát $11-13\ \mu\text{m}$ -re állítottuk és ezeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettük fel. Az elkészített metszeteket felhasználásig -20C° -on tároltuk.

4.4. Hisztokémia, immunhisztokémia és immunfluoreszcencia:

4.4.1. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat fagyasztott metszeteken végeztük. A metszeteket 10 percnyi időtartamra rehidráltuk PBS-ben, szobahőn körülbelül 60 másodpercre előre felmelegített PBS-be helyeztük a metszeteinket, ezután a PBS-et szobahőmérsékletűre cserélve folytattuk a rehidrációt. Ezt követően $50-80\ \mu\text{l}$ /metszet primer ellenanyagot anti humán kollagén II. (II-4C11;cég:ICN Company) ráértük a készítményeinkre, ami előzetesen betitrált hígítású ellenanyagoldat volt. Az esetleges hígítást 1%-os BSA-t (Bovine Serum Albumin,Sigma A9647) és Na-azidot tartalmazó PBS-ben (PBS-BSA) végeztük. Ezután a metszeteket szobahőn, nedves kamrában 45 percig inkubáltuk, majd 3X5 percen át PBS-ben mostuk. A következő lépésben szekunder ellenanyagot anti humán osteonectin (klón: 15G12; cég: Leica) mértünk a metszetekre és további 45 percig szobahőn és nedves kamrában inkubáltuk. Újabb PBS-ben történő (3x5 perc) mosást követően a szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása céljából a metszeteket 10 percre PBS-el 3%-ra hígított H_2O_2 -ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztük, majd újból PBS-ben történő mosás (3x5 perc) következett. A mosás után ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) rétegeztünk fel a metszetekre és újabb fél órán át inkubáltuk őket. Az ABC oldatot az előírásoknak megfelelő paraméterek szerint hígítottuk (1:100 arányban, PBS-ben). Elsőként PBS-be kimértük az avidin oldatot, majd a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét adtuk hozzá, ezután alaposan felkevertük, majd az így készült oldatot fél óra elteltével használtuk fel. 3x5 perc PBS-ben történő mosás után a kötődött

peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltuk (Sigma; C8890). A kloronaftolt előzetesen PBS-ben oldottuk (100µl 4-chloro-1-naftol törzsoldat 100ml PBS-ben oldva), majd 300µl 3%-os H₂O₂-ot adtunk hozzá, amelyet fénytől elzárva sötétben mágneses keverőn, legalább fél órát kevertünk és a felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrjük. A metszeteket sötét helyen 30 percig inkubáltuk ebben az oldatban. Az utolsó 3X5 perces PBS-ben történő mosást követően vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) lefedtük a metszeteket, melyeket ezután 4C^o-on hűtőben tároltunk.

Chloronaftol törzsoldat készítése: 500 mg 4-chloro-1-naftol (Sigma, C8890) feloldottunk 2 ml abszolút etanolban (Molar Chemicals Kft, 02910-101-340) majd -20 °C-on és sötétben tároltuk. Előhíváskor a törzsoldatból készítettünk hígítást, oly módon, hogy a végkoncentráció 25 mg/100 ml PBS lett. Hígítások készítésekor mindvégig figyelemmel voltunk a sötétben történő tárolásra az oldat fényérzékenysége miatt.

4.4.2. Immunfluoreszcencia

4.4.2.1. Kettős immunfluoreszcens festés:

Az ellenanyag karakterizálásához illetve annak más fehérjékhez viszonyított kollokalizáció meghatározásához kettős immun fluoreszcens festést használtunk. A kettős immunfestés első lépéseként a metszetekre ráértük az első primer ellenanyagot, melyet 45 percig inkubáltunk, majd 3x5 perces PBS-ben történő mosást követően közvetlenül fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot vittünk fel a metszetekre, mely a primer ellenanyagnak megfelelő izotípus specifikus volt. A további lépéseket a fluorokróm fényérzékenysége miatt fénytől védetten végeztük. 45 perces, nedves kamrában történő inkubálást követően PBS-mosást végeztünk (3x5 perc). Ezután a metszetekre ráértük a második primer ellenanyagot, amit szintén 45 perces inkubálás követett majd PBS-ben történő mosás következett 3x5 perces időtartammal. A második szekunder ellenanyagot (amely a második primer ellenanyaghoz volt fajspecifikus) úgy választottuk meg, hogy a vele konjugáltatott fluorokróm színe eltérjen az előzőleg használt szekunder ellenanyag színétől. A metszetekre való felvitelt a 45 perces inkubációs lépés követte. A sejtmagok kimutatását DAPI-val (4-6-Diamino-2-Phenilindol, Invitrogen B1306) végeztük, amit a 45 perces inkubáció utolsó 15 percében adtunk a metszetekhez. A PBS-ben történő mosás után a tárgylemezeket vízdékony fedőanyaggal (Aqua-Poly/Mount, Polysciences, 18606) fedtük le, majd hűtőben 4C^o-on tároltuk.

4.4.5. Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás

Alizarin Alcián festés: Az alizarin-alción festés esetén a megfestett végtagokat Carl Zeiss Semi SV6 típusú sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk és a hozzá csatlakoztatott Canon Powershot A650 is típusú digitális fényképezőgéppel fotóztuk. A metszeteket Zeiss AxioPhot mikroszkóppal értékeltük, és a hozzácsatlakoztatott kamerával (Zeiss AxioCam HCR) különböző nagyításokon digitális képeket készítettünk. A digitális képek későbbi tanulmányozását, szerkesztését Adobe Photoshop CS 7.01 típusú programmal végeztük.

5. Eredmények

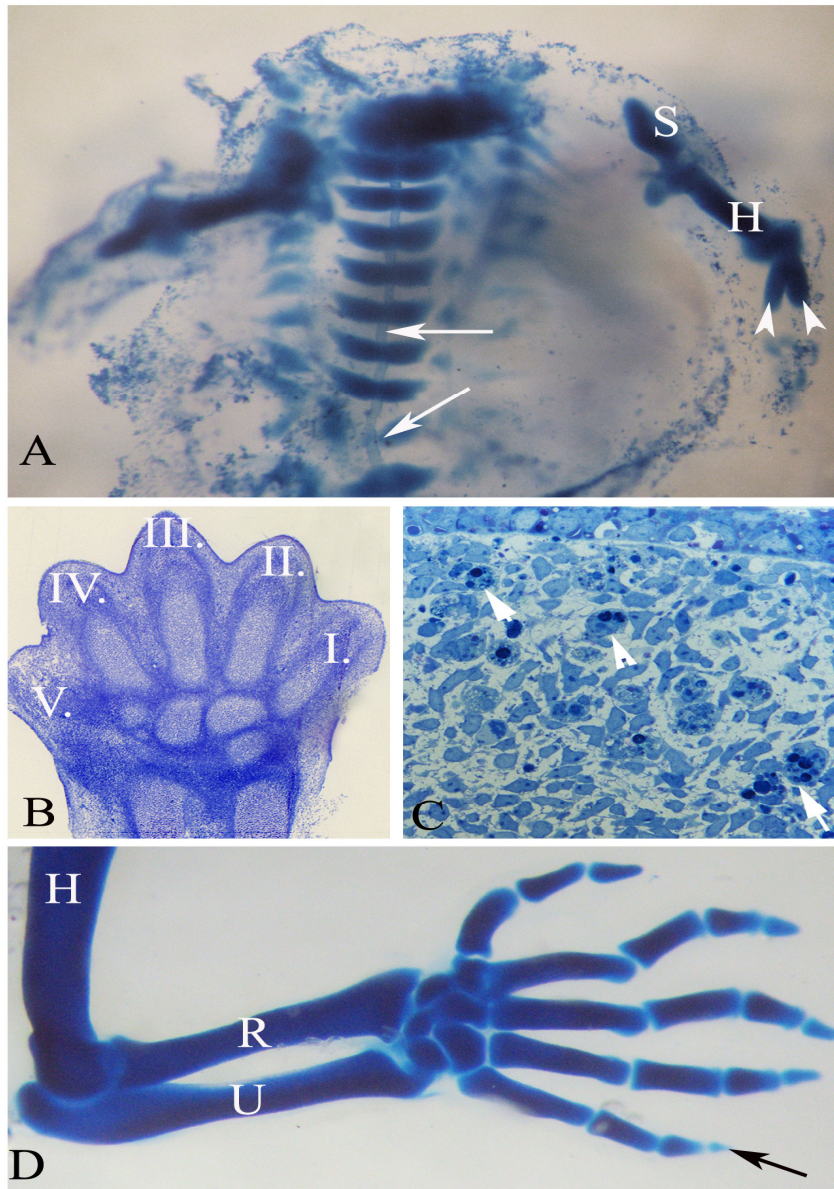
Mivel a humán embryokat célzó vizsgálatainkhoz az etikai engedélyek beszerzése különösen hosszú időt vett igénybe, ezért kísérleteimhez összesen csak 14 darab, 6-12 hetes korú abortum szövettani feldolgozását sikerült elvégezni. 11-ből sikerült embryokat kiperarálni, ahol az esetek többségében csak a gerincoszlop és az egyik oldali végtagot lehetett épségben megtalálni. Abban az esetben, ahol mindkét végtag megvolt, ott az egyik oldalit acetona fixáltam és Alizarin-Alcián festéssel követtem a porcok fejlődését, a csontosodás megjelenését. A másik oldali végtagról leválasztottuk a kézfejet és fagyasztott metszésre zselatinba ágyazva immuncytokémiával vagy aralditos műgyantába ágyazva félvékony technikával vizsgáltuk. A 10 hetesnél idősebb embryok esetében a fixáló és festékkoldatok jobb penetrációja végett, még a fixálás előtt igyekeztem a lágyrészeket (bőr, izom, inak) eltávolítani.

Az embriók korának meghatározásához figyelembe vettük a nőgyógyászok által megállapított kort (utolsó menstruációtól számított hét), melynek értékéből két hetet levontunk, illetve az 1.sz. táblázatban rögzített és más szerzők (Mall, 1906; O'Rahilly, 1972; Gardner, 1959; Gray, 1957) által megfigyelt adatokkal is összehasonlítást végeztünk.

A végtagok korai csontosodásának vizsgálatához az Alizarin-Alcián festési technikát használtuk, amely az egész végtag megfestését teszi lehetővé illetve metszés nélkül általános képet ad a csontosodás megjelenéséről. Ezen eljárás segítségével a csontosodó szövet piros színnel festődik a megkötött Alizarin miatt, míg a porcok területek kékre festődnek a porcszövetre nagy affinitást mutató Alcián kötődése miatt.

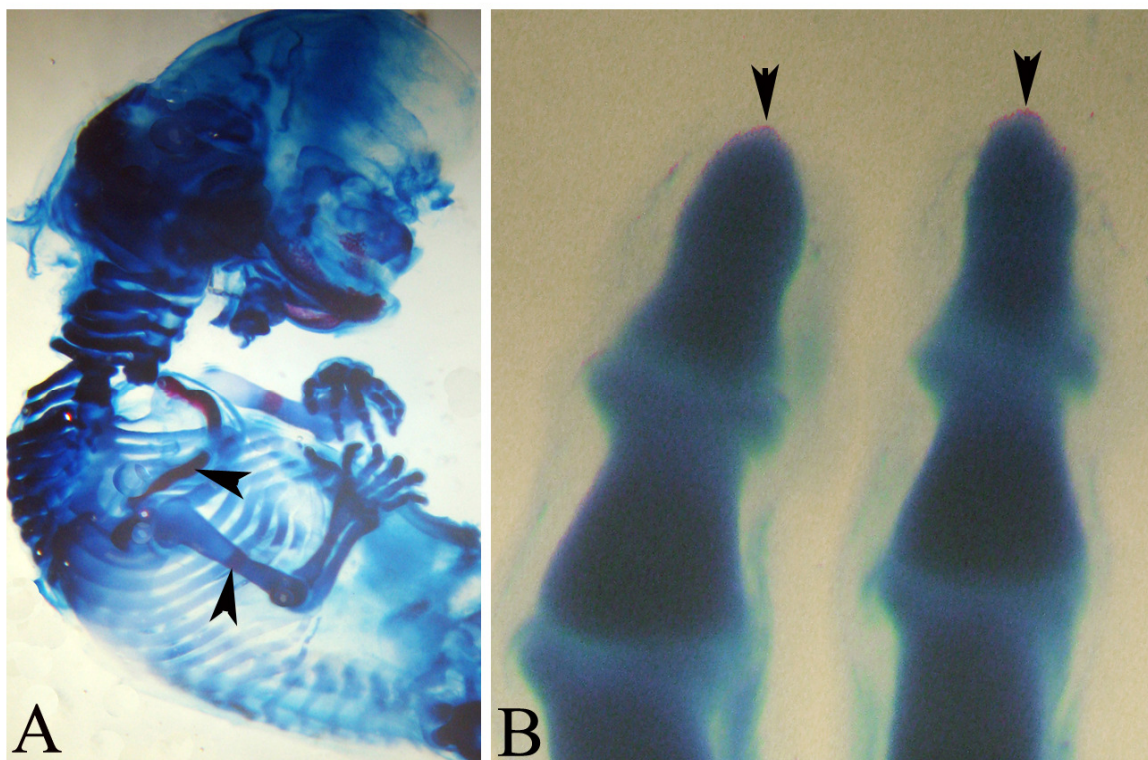
Legkorábbi mintánk öt hetes embryóból származott. Ebből az embryóból a törzs és a felső végtagok maradtak meg. Az Alizarin-Alcián festése jól mutatja, hogy a törzs porcok váza (csigolyák, borda) mellett a scapula, humerus, illetve radius és ulna proximális része különíthető el (5.Ábra:A Kép). Ez a porcok váza tehát már pontosan kijelöli a későbbi csontok helyét, ezért porcok modellnek is nevezik. A porcok vázelemek kialakulása disztális irányban történik: a humerus, radius és ulna után a kéztőcsontok, kézközépcsontok és az ujjperceknek megfelelő helyeken lépnek fel. A 6. hetes embryóban a kéztőcsontok porcok telepei mellett az ujjak telepei, mint a perifériára szétsugárzó porcok rudak jelennek meg (5.Ábra:B Kép). A porcok ujjugarak között található differenciálatlan mesenchyma sejtek fokozatosan apoptózissal elpusztulnak, amelyet a nagy számban előforduló makrofágok jelenléte igazol (5.Ábra: C Kép). A porcok ujjugarakat elválasztó

mesenchyma apoptoticus eltávolítása hozza létre az egymástól különálló ujjakat. A 7. hét végére az ujjpercek porcos telepei is kialakulnak. Ebben a stádiumban az I.-IV. ujjak körömpercei jól elkülönülnek a középső ujjpercek telepétől, míg a kisujj körömpercének porcos telepe a kialakulás kezdeténél tart (5.Ábra:D Kép). Az egyes végtag váztelepek csontosodása a porcos differenciálódáshoz hasonlóan disztális irányt mutatnak. A clavicula az egész csontváz legkorábban csontosodó eleme. Középső része nem porcos, hanem kötőszövetes telepből csontosodik.



5.Ábra: **A):** 5 hetes embryo Alizarin Alcian festése S; Scapula telepe, H; Humerus, Nyílhegyek; radius és ulna telepei, Nyílak; Chorda dorsalis. **B):** 6 hetes embryo bal kezének félvékony metszete toluidin késsel festve a római számok az ujjak sorrendjét jelölik. **C):**B ábra III. és IV. ujjak közötti területének nagy nagyítással készült felvétele. Nyílhegyek; macrophagokat jelölik. **D):**7 hetes embryo felső végtagja. H; humerus, R; radius telepe, U; ulna telepe Nyíl; Kisujj körömpercének porcos telepe, amely még nem teljesen különült el.

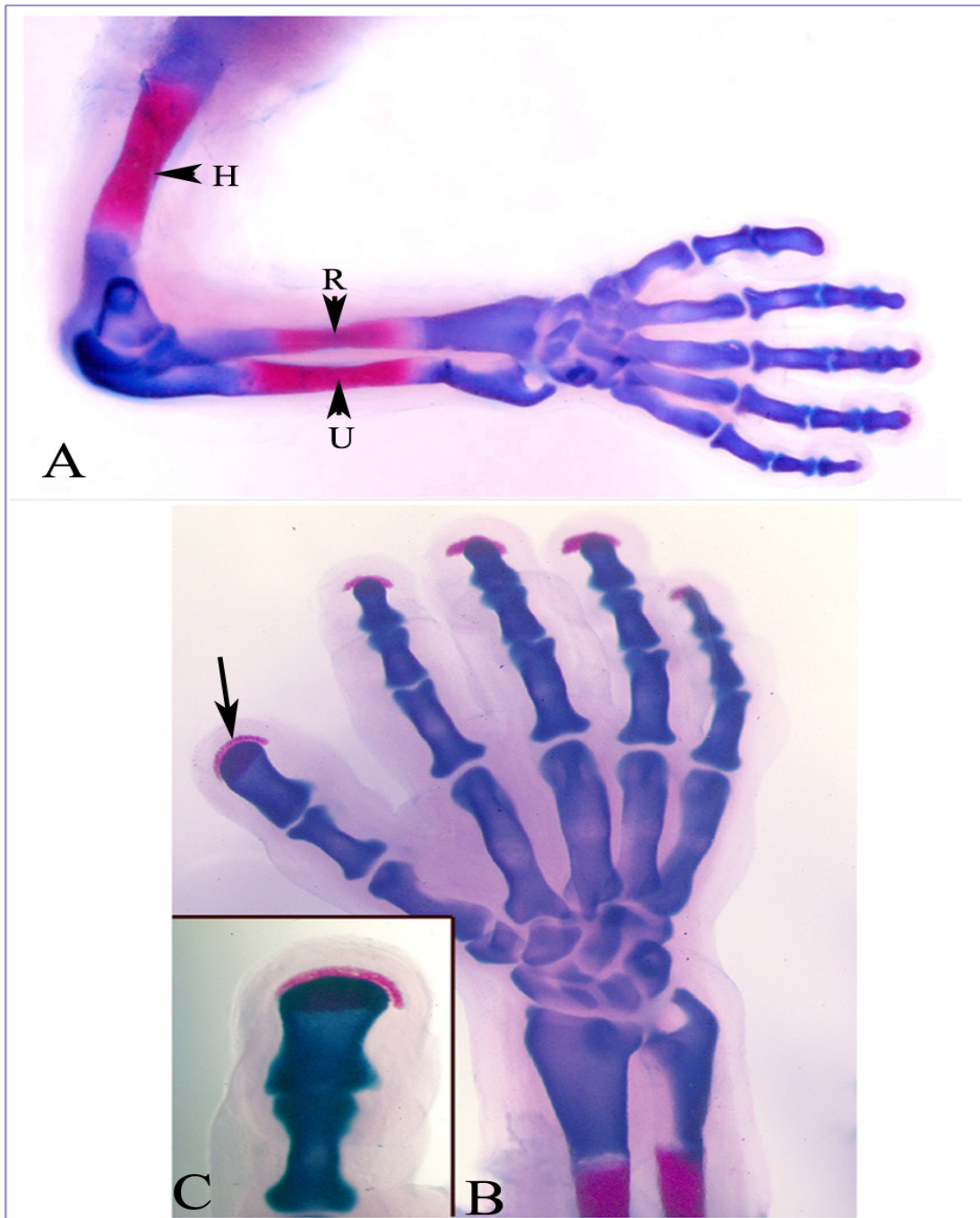
Az egyes végtag váztelepek csontosodása a porcos differenciálódáshoz hasonlóan proximo-disztális irányba halad. A clavícula az egész csontváz legkorábban csontosodó eleme. Középső része nem porcos, hanem kötőszövetes telepből csontosodik. A 8. hetes embrióban Alizarin-Alcián festési technika alkalmazásával a clavícula csontosodó kötőszöve mellett a humerus diaphysisének csontosodási folyamata is felismerhető (6. Ábra:A Kép) Az Alizarin-Alcián festéskor megfigyeltük, hogy a felső végtag porcos vázában zajló disztális irányú csontosodás a humerust követően nem a radius és az ulna telepében folytatódik, hanem a harmadik ujjperc disztális területén figyelhető meg a következő csontosodási hely (6. Ábra:B Kép).



6. Ábra: 8 hetes humán embryo vázrendszere Alizarin- Alcián festés után. A): Ebben a stádiumban a csontosodási magok először a claviculában és a humerusban jelennek meg (nyílhegyek) B): Nagy nagyítású felvétel a kéz körömperceiről. A porcos körömperc (kék szín) disztális végénél Alizarinnal pirosra festődő csontos hártya különül el (nyílhegyek).

Két héttel később a 9.-10. hetes embryo Alizarin-Alcián festése a radius és ulna diaphysisét is jelöli, és emellett kifejezett csontosodásra utaló Alizarin festést kapunk valamennyi körömperc disztális részénél. Az Alizarin pozitív terület szinte sapkaszerűen borítja a hüvelykujj disztális végét, míg a többi ujj esetében a kék színűre festett porcos

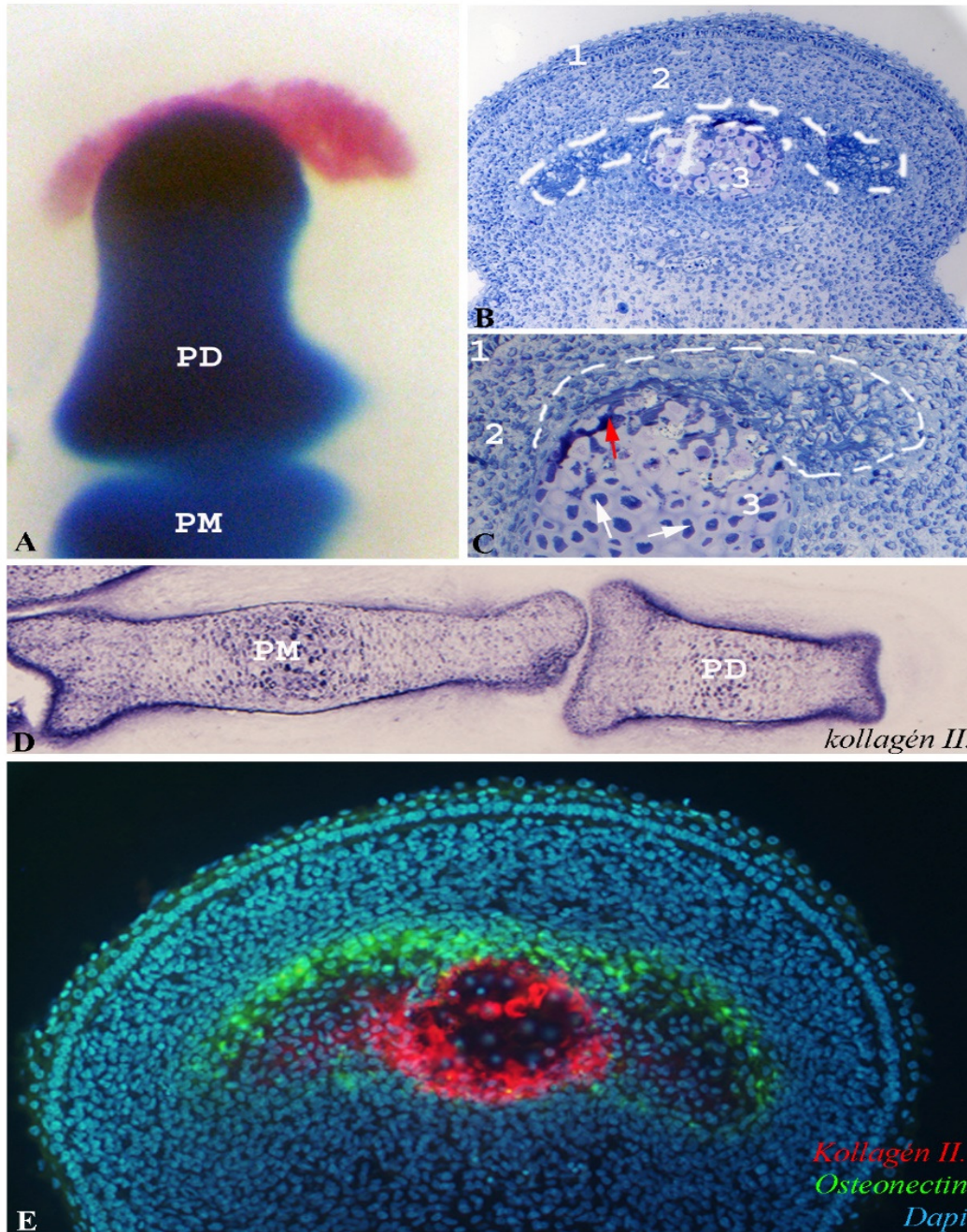
ujjperc hossz tengelyére merőlegesen, sarló alakban borul rá a pirosra festett csontszövet (7. Ábra: A, B, és C Képek).



7. Ábra: Alizarin- Alcian festés 10 hetes embryo felső végtagjáról. A): teljes jobb felső végtag H; humerus, R; radius, U; ulna. **B):** Kézzől készült nagyított felvétel. Alizarin vörösön megfestett csontos képződmény figyelhető meg a valamennyi körömperc disztális végénél. **C):** A B kép nyíllal jelzett területéről készült nagyobb nagyítású felvétel. A hüvelykujj porcos körömpercének disztális végét (kék) csontos sapka (piros) borítja.

A 10. hetes embryo jobb oldali kezéről a mutató és középső ujjakat együtt megtartva műgyantába ágyztuk és ezekből félvékony metszeteket készítettünk. A szövettani képen jól felismerhető a porcszövet. A disztálisan elhelyezkedő porcsejtek elfajulást mutatnak és a sejtközötti tér alapállománya csontosodásra utaló festést adott. Ugyanakkor az Alizarin-Alciánnal festett preparátumon a pirosra festődő taréjszerű képletnek megfelelő helyen a félvékony preparátumon a mesenchyma sejtek tömörülése figyelhető meg és közöttük található élénken festődő extracelluláris mátrix az elfajult porcsejtek körüli mátrixal egybefolyt képet mutat (8. Ábra A,B,C Képek).

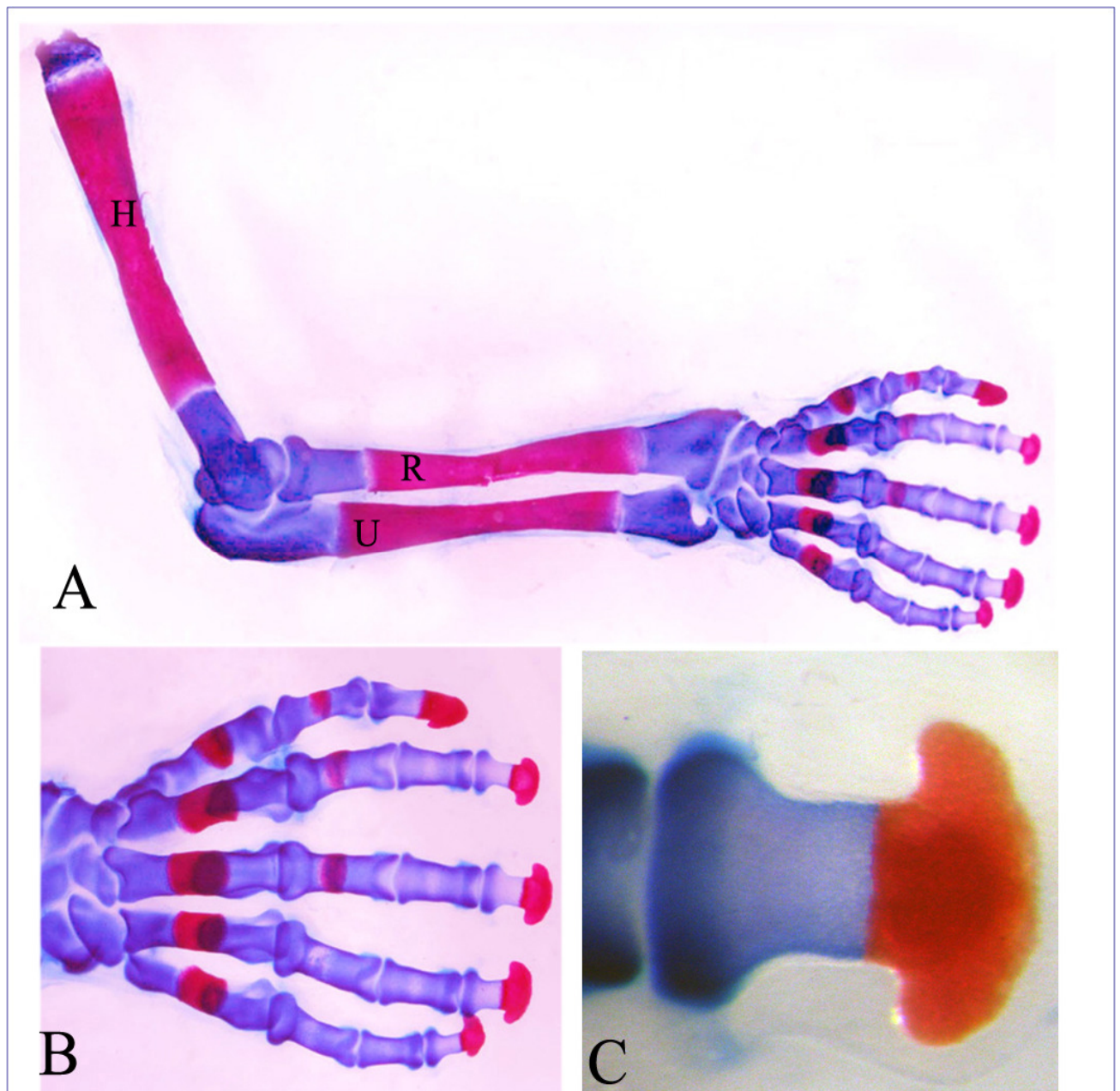
A körömperc disztális részének területére eső mesenchyma sejtek differenciálódásának meghatározására a porcszövetre jellemző kollagén II. specifikus ellenanyagot és a korai csontosodási markerként osteonectin specifikus ellenanyagokat használtuk. Immunfestéskor a félvékony technikához már felhasznált kézről leválasztottuk gyűrűs és kisujjat, majd zselatinba ágyztuk és fagyasztva lemetsztük. A II. típusú kollagén immunfestése alapján csak a disztális és a középső phalanx porcos váza jelölődött, míg az Alizarin-Alcián festett és a félvékony metszeten megfigyelt „csontos taréj”, nem festődött (8.Ábra D Kép). Osteonectin és Kollagén II. kettős immunfluoreszcens festése azt mutatja, hogy a mesenchymában differenciálódó „taréj”, osteonectin pozitív, azaz porcos előtelep nélkül, a kötőszövetből csontosodó képlet, ami a kollagén II. pozitív porcos vázhoz asszociáltan fejlődik (8. Ábra E Kép).



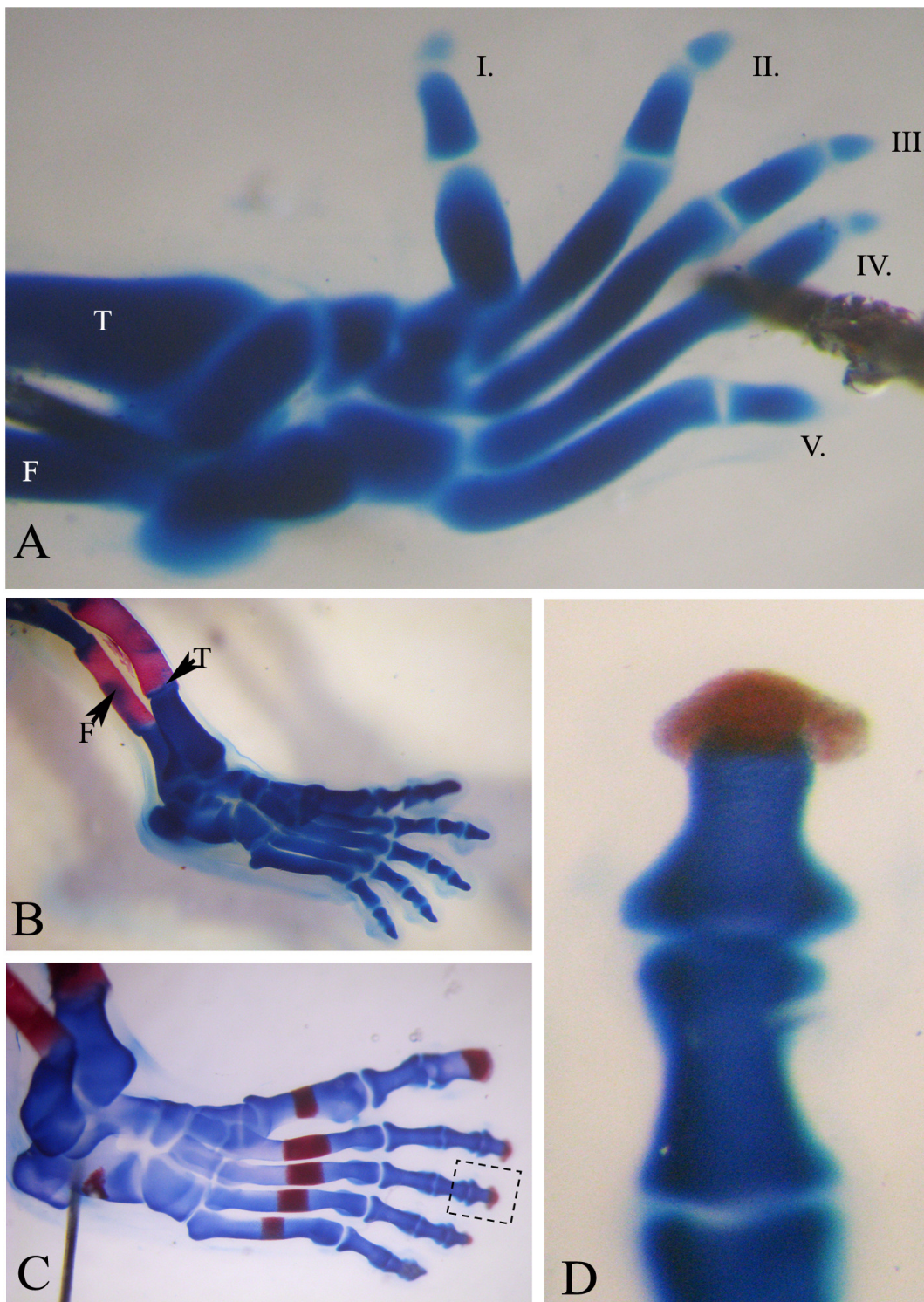
8. ábra: Kb. 10 hetes humán embryo felső végtagjáról készült metszetek. A): Alizarin-Alcián festéssel készült sztereomikroszkópos kép az ujjpercekről. PD: phalanx distalis. PM: phalanx media. B): Félvékony technikával készült frontális állású metszet a körömperc disztális részének magasságában. 1; Ectoderma. 2; Mesenchyma 3; Körömperc porcos része. A körömperc csúcsán fehér szaggatott vonallal jelzett terület a csontosodó sapkaszerű képződményt mutatja. C): Nagyobb nagyítású felvétel a B képről, ahol a csontos sapka és a körömperc porcos részének fúziója figyelhető meg. A fehér nyílak hipertrófiásan degenerált porcsejtekre mutatnak. A piros nyíl az elmeszesedett mátrixot jelöli. D): II. típusú kollagén ellenes antitesttel festett készítmény, amely ugyanezen embryo felső végtagjának körömperc hosszmetsetéből származik. Az ellenanyag a porcos területek mátrixát jelöli de a csontos sapkának megfelelő terület nem festődött. PM; Phalanx media. PD; Phalanx distalis. E): Kettős immunfestés illetve DAPI háttérfestés a B) képnek megfelelő területről: Kollagén II. a porcszövetben piros fluoreszcencia, Osteonectin a csontmátrixban zöld fluoreszcencia.

A 12. hétre a felkar és az alkar csontosodási magjainak expanzióján (9. Ábra A Kép) kívül azt észleltük, hogy ebben a korban csontosodási magok jelentek meg a metacarpusok és a proximális phalanxok diaphysiseiben. Ebben a stádiumban a hüvelykujj és a középső ujj proximális phalanxa mutat csontosodást, míg a gyűrűs és kisujj porcos proximális phalanxa nem tartalmaz csontosodó szövetet (9.Ábra B Kép). A körömpercek Alizarin festett csontos telepe teljesen összeolvadt az alciánkéssel jelölt porctelep disztális részével (9. Ábra C Kép).

Összehasonlítva az embryok felső és alsó végtagjában zajló csontosodás folyamatát, azt találtuk, hogy a 8. hetes embryo felső végtagjának körömpercei felett már megjelenik csontosodás, de ugyanezen embryo alsó végtagjának körömpercei felett pirosan festődő terület nem figyelhető meg (10. ábra A Kép). Ebben a stádiumban a láb porcos vázelemei jól elkülönültek egymástól, a tarsusokat és metatarsusokat ízületek választják el egymástól. Ugyanakkor a középső és a proximális phalanxok elkülönülését jelző ízületi telep még nem figyelhető meg. 10 hetes embryóban csak a femur, tibia illetve a fibula és a hallux körömpercének disztális régiója mutat csontosodási folyamatot (10. Ábra B Kép). A 12. Hetes humán embryóban azonban az alsó végtag körömperceiben, azok apicalis részén egyértelmű csontosodás volt látható, továbbá ebben a stádiumban már a metatarsusok diaphysisében is megjelentek a csontosodási magok (10. Ábra C Kép). Nagyobb nagyítással vizsgálva a 12. hetes embryo jobb alsó végtagjának III. ujján jól látható, hogy az Alizarinnal festett csontszövet a porcállománytól külön jelenik meg (10. Ábra D Kép).



9. Ábra: 12 hetes embryo Alizarin-Alcián festés. A): Teljes felső végtag H; humerus, R; radius, U; ulna
B): Jobb kézről készült nagyított felvétel **C):** III. ujj körömpercének nagyított felvétele: a sarlószerűen kiszélesedő csontos rész (piros) fuzionált a körömperc porcos telepével (kék).



10. Ábra: Különböző korú Alizarin-Alcián festett humán embriók alsó végtagjáról készült felvételek. A): 8 hetes embrió jobb alsó végtagja. Római számok az ujjak sorrendjét mutatják. T; Tibia F; Fibula B): 10 hetes embrió jobb alsó végtagja. T; Tibia F; Fibula C): 12 hetes embrió jobb alsó végtagja. Csontosodás (piros szín) a calcaneus és a metatarsusok vázlemeinek porcos telepeiben figyelhető meg. D): Nagyított felvétel a C) Kép bekeretezett területéről.

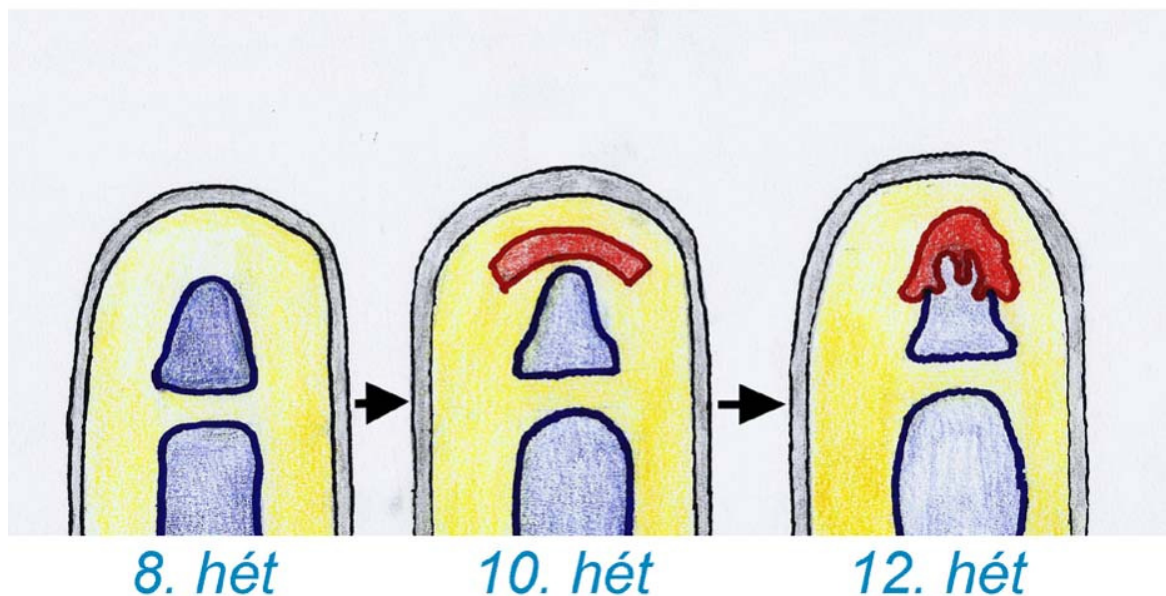
Vizsgálati eredményeinket összefoglalva azt tapasztaltuk, hogy teljes végtagokra vonatkoztatva először proximalis vázelemekben jelennek meg csontosodási magok, majd ezek megjelenése disztális irányban folytatódik. A disztális végtagterületeken, a kéz és a láb esetében ez a csontosodási irány nem érzékelhető. Itt először a körömpercek csúcsi részén jelenik meg csontosodás, majd kronológiailag a következő lépés a metacarpusok, a láb esetén a metatarsusok csontosodásának megjelenése. Végül a többi ujjpercben jelenik meg csontosodási mag, közülük elsőként a proximálisban majd a középpercben. Valamennyi esetben igaz, hogy a körömpercek csontosodása, hasonlóan a később bekövetkező ujjpercek csontosodásához, anterior-posterior tengely mentén történik, azaz először a pollex, illetve a hallux körömperceinek disztális végének, majd a második, harmadik ujjak körömperceinek, végül a negyedik és a kisujj körömperceinek csontosodása következett. Az alsó és felső végtag fejlődésének időbeliségét összehasonlítva megállapítható, hogy a felső végtag körömperceinek csontosodását megközelítőleg egy hét késéssel követi az alsó végtag körömperceinek csontosodása.

6. Eredmények megvitatása és következtetések

A szakdolgozati munkám elsődleges célkitűzése a körömperc humán embryóban történő csontosodásának karakterizálása volt hisztológiai és makroszkópos festési technikák segítségével.

A csontosodás vizsgálata humán embryóban egészen régre nyúlik vissza. A korai közlemények főleg a csontosodás időbeni megjelenését és a csontosodás típusát vizsgálják. 1880-ban, Dixey munkája utal először arra, hogy macska, sertés és humán embryokban a körömpercek csontosodása eltér a többi ujjperc és a hosszú csöves csontok csontosodásától. Munkájában leírja, hogy eltérően a hosszú csöves csontoktól, ideértve a proximális és a középső ujjperceket is, ahol a csontosodási központ a diaphysis közepén jelenik meg, majd a csontosodás fokozatosan terjed a végrészek felé, a körömpercek esetén ez a folyamat a porc disztális végén lép fel először és a csontosodás a bázis felé terjed tovább. A körömperc csontosodásának megjelenését egy csontos sapkaként írta le a disztális phalanx csúcsi részén. Következtetéseit a szövetek picrinsavas decalcifikálással és magentafestéssel előkészített metszetek fénymikroszkópos vizsgálataira alapozta. Dixey közleménye után is szép számmal vannak olyan cikkek, amelyek a körömperc fejlődésével foglalkoznak (Bareggi és mtsai. , 1994; Casanova és mtsai., 2007; Czerwinski és mtsai, 2004; Meyer és mtsai., 1958; O’Rahilly, 1959; Patton és mtsai, 1955). Mall 1906-ban megjelent közleményében a primaer csontosodási központok megjelenését vizsgálta különböző korú humán embryokban. Hisztológia vizsgálatok alapját carmin savas festés jelentette és ezzel mutatta ki a csontosodás jelenlétét. Munkája eredményeképpen a különböző csontosodási központok megjelenésének időpontját táblázatba rendezte, melyből kiderül, hogy mind a kéz, mind a láb porcos előtelepeiben a körömpercekben figyelhető meg elsőként a csontosodás folyamata. A kézben a disztális phalanx csontosodásának kezdetét a 7. hét végére, míg a láb esetén a 8 hét elejére határozza meg. Ezeket az adatokat korai stádiumban lévő kb. 6-7 hetes humán embryo esetén mi is megfigyeltük. Továbbá Alizarin-Alcián festéssel mi is azt tapasztaltuk, hogy az elsőként csontosodó vázelem a clavicula, aminek dezmalis csontosodása már a hatodik héten jól megfigyelhető. Ugyanakkor azt is láthattuk, hogy a clavicula után a humerus, majd a radius és az ulna csontosodik. 6 hetes kortól kb. 9-10 hetes korú embryok végtagjában csak a

körömpercben láttunk csontosodásra utaló Alizarin festést, az autopodiumok többi elemében nem, ezekben csak a későbbi fejlődési stádiumban indul meg a csontosodás. Ezek a megfigyelések alátámasztják azokat a munkákat, amelyek szerint a csontosodási folyamatok általános proximo-disztális iránya a kéz és a láb csontosodására nem érvényes (Czerwinski és mtsai., 2004). Korábbi publikációk ugyanakkor azt is leírják, hogy a körömpercek fejlődésében két telep vesz részt; egy proximális porcos telep és egy disztális feltehetőleg dezmalis telep (Mall, 1906; Dixey, 1880). Ez a morfológiai tény nem csak a humán embryok esetében érvényes, hiszen hasonló adatokat figyeltek meg egér (J. P. Patton és mtsai., 1995), csirke (Casanova és mtsai., 2007), bárány (Cerny és mtsai., 1990) embryok esetén. Munkánk során egész embryo festése illetve a végtagokból készült metszetek immuncytokémiai módszerekkel történő festése hasonló eredményeket hozott. II. típusú kollagén ellenes ellenanyagot használva a porcos előtelep jelenlétét mindenhol sikerült kimutatnunk, a körömperc disztális része 10 hetes embryóban nem festődött. Ezen a területen Alizarin-Alcián festéssel porcos előtelep megjelenése nélkül a mesenchymában csontszövet jelenik meg. Kettős immunfestéssel Osteonectin és Kollagén II ellenes antitestek egyidejű alkalmazásával megfigyeltük, hogy a körömperc disztális része elkülönül annak proximális porcos telepétől. A körömperc csontosodásában a többi ujjperc illetve más hosszú csöves csontok fejlődésétől eltérően a porcos telepben a primer csontosodási mag nem az előtelep középső részében, hanem annak apicális részletében jelenik meg (Dixey, 1880). Ezeket a megfigyeléseket félvékony metszetek készítésével megerősítettük. 10 Hetes embryo kezéről készített felvételeinken látszik, hogy a körömperc disztális részén egy csontos sapka figyelhető meg, amelynek kialakulásában porcos előtelep nem vesz részt, ugyanakkor a proximális porcos előtelep apicális részében az enchondrális csontosodásra jellemző szövettani képet figyeltük meg. Makroszkópos és szövettani módszerekkel végzett megfigyeléseinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az embryo körömpercének disztális mesenchymalis sejtjei egymástól elkülönülve chondralis és desmalis csontosodással differenciálódnak. A különálló telepek később fuzionálnak és feltehetőleg ennek eredményeként jön létre a körömperc tuberculum unguicularisa (11. Ábra). Dixey (1880) körömpercek csontosodásával foglalkozó közleményében azt a megállapítást is olvashatjuk, miszerint az enchondrális csontosodásban szerepet játszó mesenchymális sejtek illetve erek betörése a porcszövet belsejébe a körömpercek esetén nem oldalirányból, hanem apicálisan történik. Ennek további részletesebb megismeréséhez 6-8 hetes humán embryok körömpercének ér endothel ellenes antitest segítségével történő immunhisztokémia vizsgálatát tartjuk szükségesnek.



11.Ábra: Sémás rajz a körömperc korai csontosodásának fejlődési lépései a humán embryóban. A körömperc porcos telepe (kék) és a tuberculum unguicularisnak megfelelő helyen fellépő csontszövet (piros szín) a 8-10. héten egymástól külön fejlődik. A 12 héttől kezdve a csontszövet és a porcszövet fuzionál.

A körömperc csontosodásának vizsgálata alap kutatási és klinikai szempontból is fontos lehet. Kutatásban a körömpercek kialakulásának időbeni aspektusa különösen nagy jelentőséggel bír, hiszen egy pontosabb kormeghatározást tesz lehetővé. A fejlődéstani kutatók nagyon sok esetben az embryo korának meghatározásához a CRL (Crown-Rump Length) értéket veszik alapul, ennek használata fixálási folyamatok során pontatlan eredményhez vezethet, ahogyan erre Mall már 1906-ban publikált cikkében fel is hívja a figyelmet (Mall, 1906). Klinikai szempontból a körömpercek fejlődési menetének megismerése két szempögből is izgalmas a téma lehet, hiszen a folyamatok megismerése lehetővé teszi különböző fejlődési rendellenességek megismerését, úgy mint, cranio-cleido-disostosis vagy cretenismus esetén (Roche, 1962). A másik kutatási terület, amely okán a közelmúltban a körömperc fejlődési folyamatai újra előtérbe kerültek az a regeneráció. Alacsonyabb rendű élőlényekben vázelemek regenerációjával kapcsolatos megfigyelések már korábbról ismertek voltak, pl. szalamandra esetében (Satoh és mtsai., 2010).

Klinikai tapasztalatok alapján a humán körömperc regenerációs képességére korábban is felfigyeltek (Douglas és mtsai, 1972; Dickson és mtsai., 1993). Kísérletes vizsgálatok kimutatták, hogy a körömperc disztális részének amputációjakor a regeneráció lehetősége fenn áll egerekben, míg proximálisabb helyzetű amputációs sík esetén pusztán gyógyulásra van lehetőség (Han és mtsai., 2008). Sokáig ismeretlen volt, hogy hogyan függ össze egymással a körömperc és a regenerálódás folyamata. 2013-ban Erre próbáltak meg lehetséges választ adni a kutatók. Egy a *Nature*-ben közölt tanulmány szerint a körömlemez alatt a köröm proximális területén őssejteket mutattak ki, amelyek a Wnt morfogének hatására differenciálódási folyamaton mennek keresztül, ezek a Wnt fehérjék szükségesek ahhoz, hogy a mátrix őssejtjei differenciálódjanak és ezzel a regeneráció folyamatát beindítsák. A vizsgálatok másik részében azt mutatták ki, hogyha az amputáció síkja a mátrix őssejtjeitől proximálisan helyezkedik el, akkor regeneráció helyett gyógyulás lép fel (Takeo és mtsai., 2013).

Továbbá, hogy mivel magyarázható a disztális ujjperc apikális oldalról induló csontosodása, arra csak gerinces embryokon végzett kísérletekből következtethetünk. Csirke embryokon végzett génmanipulációs vizsgálatok szerint a porcos ujjugarak közti mesenchyama és a felszín borító AER hámsajtjei növekedési faktorokat termelnek (SHH, FGF), amelyek meghatározzák az ujjak és az ujjpercek számát (Tickle és mtsai., 2013; Casanova és mtsai., 2007). Mindezek mellett számos olyan gént azonosítottak, amelyek kifejezetten csak a leendő körömperc mesenchymájában és a körömperc feletti ectoderma eredetű sejtekben expresszálódnak. Ide tartoznak a BMP-4,5,7, MSX és Wnt gének, valamint a Bmp jelátvitelt gátló BAMBI nevű, TGF beta családba tartozó receptor molekula. Feltételezik, hogy ezeknek a molekuláknak a kölcsönhatása a körömperc apikális irányból kezdődő csontosodását szabályozzák, de ennek pontos mechanizmusa ma még nem ismert.

A körömpercet létrehozó mesenchyama sejtek differenciálódását célzó fejlődésbiológiai kutatás és molekuláris kölcsönhatások részletes jellemzése a regeneráció miatt kiemelt klinikai jelentőséggel bír.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Nagy Nándornak, aki a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet kutatója és oktatója, munkám során mindvégig segítségemre volt és bármikor készségesen állt rendelkezésemre. Nagyon hasznos tanácsokkal látott el munkám során Prof. Dr. Oláh Imre egyetemi tanár és velem való beszélgetéseim a laborban folyó munka mellett nagyon inspiráló hatással voltak rám.

Nagy segítségre volt munkámban az I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, különösen szeretném megköszönni Dr. Rigó János professzor úrnak illetve Dr. Nagy Gyula Richárd adjunktus úrnak, hogy a vizsgálataimhoz az embriókat biztosították.

Hatalmas köszönet illeti a Fejlődésbiológiai laboratórium valamennyi diplomás munkatársát (Dr. Kocsis Katalin, Dr. Herberth-Minkó Krisztina, Dr. Molnár Dávid, Bódi Ildikó, Fejszák Nóra, Dr. Dóra Dávid), különös tekintettel az asszisztenseket (Fügedi Jutka, Fölker Orsi, Orbán Edit), akik segítőkészségükkel és a mindig nagyszerű hangulat megteremtésével hozzájárultak szakdolgozatom elkészítéséhez.

8. Irodalomjegyzék

Ahn, K., et al. (2001). "BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb." *Development* 128(22): 4449-4461.

Bandyopadhyay, A., et al. (2006). "Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis." *PLoS Genet* 2(12): e216.

Bareggi, R., et al. (1994). "The growth of long bones in human embryological and fetal upper limbs and its relationship to other developmental patterns." *Anat Embryol (Berl)* 189(1): 19-24.

Capdevila, J. and J. C. Izpisua Belmonte (2001). "Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 87-132.

Casanova, J. C. and J. J. Sanz-Ezquerro (2007). "Digit morphogenesis: is the tip different?" *Dev Growth Differ* 49(6): 479-491.

Chimal-Monroy, J., et al. (2003). "Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling." *Dev Biol* 257(2): 292-301.

Czerwinski, F., et al. (2004). "The ossification of the metacarpal and phalangeal bones in human foetuses." *Folia Morphol (Warsz)* 63(3): 329-332.

Delezoide, A. L., et al. (1998). "Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification." *Mech Dev* 77(1): 19-30.

Elejalde, B. R. and M. M. de Elejalde (1986). "The prenatal growth of the human body determined by the measurement of bones and organs by ultrasonography." *Am J Med Genet* 24(4): 575-598.

Gardner, E., et al. (1959). "The prenatal development of the skeleton and joints of the human foot." *J Bone Joint Surg Am* 41-a(5): 847-876

Gray, D. J., et al. (1957). "The prenatal development of the skeleton and joints of the human hand." *Am J Anat* 101(2): 169-223.

Han, M., et al. (2008). "Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice." *Dev Biol* 315(1): 125-135.

Hansman, C. F. (1962). "Appearance and fusion of ossification centers in the human skeleton." *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 88: 476-482.

Hargus, G., et al. (2008). "Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro." *Int J Dev Biol* 52(4): 323-332.

Holmes, G., et al. (2003). "ALC (adjacent to LMX1 in chick) is a novel dorsal limb mesenchyme marker." *Gene Expr Patterns* 3(6): 735-741.

Kivell, T. L. and D. R. Begun (2007). "Frequency and timing of scaphoid-centrale fusion in hominoids." *J Hum Evol* 52(3): 321-340.

Lehoczky, J. A., et al. (2011). "Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51): 20609-20614.

Logan, C., et al. (1997). "The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb." *Development* 124(12): 2317-2324.

Lutterodt, M. C., et al. (2009). "Age determination enhanced by embryonic foot bud and foot plate measurements in relation to Carnegie stages, and the influence of maternal cigarette smoking." *Hum Reprod* 24(8): 1825-1833.

Meyer, D. B. and R. O'Rahilly (1958). "Multiple techniques in the study of the onset of prenatal ossification." *Anat Rec* 132(2): 181-193

Meyer, D. B. and R. O'Rahilly (1976). "The onset of ossification in the human calcaneus." *Anat Embryol (Berl)* 150(1): 19-33.

Mundlos, S., et al. (1992). "Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development." *J Histochem Cytochem* 40(2): 283-291.

Noback, C. R. and G. G. Robertson (1951). "Sequences of appearance of ossification centers in the human skeleton during the first five prenatal months." *Am J Anat* 89(1): 1-28.

Oberlender, S. A. and R. S. Tuan (1994). "Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis." *Development* 120(1): 177-187.

O'Rahilly, R. (1951). "Morphological patterns in limb deficiencies and duplications." *Am J Anat* 89(2): 135-193.

O'Rahilly, R. (1953). "A survey of carpal and tarsal anomalies." *J Bone Joint Surg Am* 35-a(3): 626-642.

O'Rahilly, R. (1959). "The development and the developmental disturbances of the limbs." *Ir J Med Sci*(397): 30-33.

O'Rahilly, R. (1979). "Early human development and the chief sources of information on staged human embryos." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 9(4): 273-280.

O'Rahilly, R. (1985). "The development and classification of anomalies of the limbs in the human." *Prog Clin Biol Res* 163c: 85-90.

O'Rahilly, R. and E. Gardner (1972). "The initial appearance of ossification in staged human embryos." *Am J Anat* 134(3): 291-301.

O'Rahilly, R. and E. Gardner (1975). "The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo." *Anat Embryol (Berl)* 148(1): 1-23.

O'Rahilly, R., et al. (1960). "The skeletal development of the foot." *Clin Orthop* 16: 7-14.

Patton, J. T. and M. H. Kaufman (1995). "The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse." *J Anat* 186 (Pt 1): 175-185.

Roche, A. F. (1962). "Incomplete distal phalanges in the foot during childhood." *Acta Anat (Basel)* 51: 369-376.

Satoh, A., et al. (2010). "Regulation of proximal-distal intercalation during limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*)." *Dev Growth Differ* 52(9): 785-798.

Scaal, M., et al. (1999). "SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development." *Development* 126(21): 4885-4893.

Takeo, M., et al. (2013). "Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration." *Nature* 499(7457): 228-232.

Tickle, C. and H. Barker (2013). "The Sonic hedgehog gradient in the developing limb." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2(2): 275-290.

Yu, L., et al. (2012). "BMP2 induces segment-specific skeletal regeneration from digit and limb amputations by establishing a new endochondral ossification center." *Dev Biol* 372(2): 263-273.

Franklin P. Mall (1906). On ossification center sin human embryos less than one hundred days old. *Am. J. of Anatomy* 5, 433-458.

F. A. Dixey (1880) On the ossification of terminal phalanges of the digits. *Proc. R. Soc. London*. 31:63-71

H. Cerny (1990) Topographical picture of digit ossification int he sheep int he late embryonic and early foetal period of development. *Acta vet. Brno*, 59,91-99.