

تکوین مفصل زانو و نقش مرگ سلولی در ایجاد فضای مفصلی موش بزرگ صحرائی

غلامعلی میرشفیعی* M.Sc.، مجتبی رضازاده* Ph.D.، حسین دشت‌نورد* Ph.D.،
حسین بهادران* Ph.D.، غلامرضا کاکا* M.Sc.، محمود مفید* M.Sc.، حسین ایمانی* Ph.D.
سیدهمايون صدرايي* Ph.D.

چکیده

هدف: بررسی پیدایش فضای مفصلی و نقش مرگ سلولی در تکوین زانوی موش بزرگ صحرائی.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ناحیه زانوی راست (اندام عقبی راست) ۱۰۸ جنین موش بزرگ صحرائی سری ۱۹-۱۳ روزه، پس از تثبیت با مایع فیکس‌کننده، پردازش بافتی انجام گرفت و برش‌های بافتی با ضخامت ۵-۱۵ میکرونی مقطع‌گیری شد. برش‌های پی در پی بافتی مفصل زانو پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، آلسین‌بلو و اسید فسفاتاز بوسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: مشاهده جوانه اندام عقبی در روز سیزدهم، جداشدن بخشی از ابتدا و انتهای جوانه توسط دو تنگه حلقوی در روز چهاردهم و سلول‌های مزانشیمی همگون، متراکم و بدون رگ در تنگه ابتدایی حداقل مدل غضروفی استخوان ران و درشت‌نی قابل ثبت بود. در روز شانزدهم تنگه حلقوی ابتدایی بصورت منطقه سه‌لایه‌ای اینترزون حاوی دو لایه سلولی متراکم کناری و یک لایه سلولی غیرمتراکم میانی وجود دارد. سلول‌های مرده در منطقه میانی به فراوانی مشاهده می‌شود که با افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده این سلولها شکاف بین سلول‌های ناحیه اینترزون پدیدار می‌گردد. در روزهای هفدهم و هجدهم سلول‌های مرده نیز در سطوح مفصلی استخوانهای ران و درشت‌نی نیز دیده می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که حداکثر فضای لازم برای شکل‌گیری مفصل زانو در روز هفدهم جنینی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در ناحیه اینترزون بوجود می‌آید. ولی این مرگ سلولی به تنهایی در گسترش فضای مفصلی نقشی ندارد و باید نقش عوامل دیگری مانند انقباض عضلانی را نیز احتمالاً دخیل دانست.

واژه‌های کلیدی: تکوین، جنین، مفصل زانو، موش بزرگ صحرائی

مقدمه

درمانگاه ارتوپدی و توانبخشی را تشکیل می‌دهد. این مفصل

گرفتاری مفصل زانو بعد از کمردرد، بیشترین میزان مراجعه به به دلیل ترکیب ساختمانی خاص خود و انتقال وزن بدن به ساق

نمود. (۵) Takabatake و همکارش Yamamoto در بررسی تکامل سینوویوم مفصل زانو مشاهده کردند که شکاف در بین سلول‌های اینترزون شروع و به اطراف گسترش پیدا می‌کند تا به مزانشیم سینویال می‌رسد. سپس سلول‌هایی شبیه ماکروفاژ در مزانشیم سینویال در روز شانزدهم جنینی ظاهر می‌شوند. به نظر می‌رسد افزایش تعداد این سلولها در روزهای ۱۷ و ۱۸ جنینی در اطراف منطقه شکاف ایجاد شده در فرآیند درشت‌خواری و انتقال بعضی از انواع ماتریکس خارج سلولی باعث تسریع در گسترش شکاف می‌شود. (۶)

Walmsley عامل مکانیکی، فشار و سایش تاندون عضله چهار سررانی را بر روی سطح کندیل‌های استخوان ران در تکامل فضای مفصلی موثر می‌داند. (۷) وجود تناسین (Tenasein) در ترکیب بافت مفصلی در طول دوران تکامل و رشد مفصل نشان می‌دهد که حضور و عدم حضور این ماده سبب تعیین نوع و مرحله رشد سلول‌های تخصص‌یافته می‌شود. (۸) Archer و همکارانش هیالورونین موجود در منطقه اینترزون را عامل اصلی تکامل مفصلی و سینوویوم عنوان کردند. (۹) Ito و همکاران کاهش پروتوگلیکان، فیبرهای کلاژنی و هیالورونیک ساخته شده در ماتریکس خارج سلولی را بعنوان پایه و اساس مکانیسم حفره‌سازی (Cavitation) بصورت کاهش چسبندگی و همچنین کاهش پیوستگی سلولی می‌دانستند. (۱۰) Kouri و همکاران وجود سلول‌های مرده در ساختمان سطح مفصلی با خصوصیات مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در ایجاد فضای مفصلی دخیل می‌دانند. (۱۱)

kavanagh و همکاران انتقال و سلول‌های مرده و پهن ناحیه مرکزی منطقه اینترزون را به سطوح و اطراف منطقه را عامل ایجاد فضای مفصلی می‌دانند. (۱۲) H'eraud و همکارانشان آپوپتوزیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده را یک جریان فیزیولوژیک برای حفظ و نگهداری موضوع Hemostasis در دوران جنینی و بعد از تولد تصور می‌کردند که نقش مهمی در تکامل مفصل در دوران جنینی و گرفتاریهای غضروف مفصلی در دوران بعد از تولد دارد. (۱۳) با توجه به مطالعات وسیعی که در زمینه تکامل مفصل زانو انجام شده است هر یک از محققان

با و تحرک زیاد آن در معرض گرفتاریهای مختلف ناشی از صدمات و بیماری‌های مفصلی قرار دارد. مطالعات محققان موید آن است که هر یک از اجزاء مفصل زانو تحت تاثیر عوامل مختلف تکامل پیدا می‌کنند و با هرگونه تغییر در میزان شرکت آن عوامل، عوارض بعدی در تکامل بوجود خواهد آمد و علاوه بر این برای درمان بدشکلی‌های مادرزادی شناخت دقیق روند طبیعی تکوین مفصل زانو و عوامل موثر بر آن امری لازم و ضروری است.

Berny در سال ۱۸۷۸ بعنوان اولین محقق مطالعات خود را در مورد چگونگی تکامل مفصل زانو انجام داد. او عنوان کرد که در دوران جنینی جوانه‌های اندام (Limb buds) در حال تکامل از سلول‌های مزانشیمی که به صورت همگون و نامنظم در کنار هم قرار گرفته و در میان آنها رگی دیده نمی‌شود، تشکیل می‌شود. (۱)

محققان دیگر نتیجه مطالعات Berny را به این صورت تکمیل نمودند که در محل پیدایش احتمالی مفصل زانو در جوانه اندام، سلول‌های مزانشیمی بگونه‌ای مرتب می‌شوند که منطقه مشخص سه‌لایه تحت عنوان اینترزون بوجود می‌آید. در اینترزون، تراکم سلولی در دو لایه کناری از لایه میانی بیشتر است. آنها معتقد بودند که سلول‌های کناری متمایز شده و به سلول‌های غضروفی تبدیل می‌شوند و باعث ایجاد سطوح مفصلی می‌گردند و سلول‌های لایه میانی در تشکیل ساختمانهای داخلی مفصل شرکت می‌کنند. (۲) چگونگی ایجاد فضای مفصلی بین استخوانهای شرکت کننده در ساختمان مفصل زانو جزء مواردی است که همواره مورد بحث محققان بوده است. بطوریکه Socoloff حرکت و انقباض عضلانی را بعنوان عامل اصلی تشکیل فضای مفصلی عنوان می‌کند. (۳)

Anderson وجود مواد متاکرومازی در منطقه اینترزون را بعنوان عامل موثر در ایجاد فضای مفصلی می‌داند. (۴) محقق دیگری با فلج کردن عضلات جوجه مشاهده کرد که فضای مفصلی در اکثر مفاصل کامل نمی‌شود و انقباض عضلانی را بعنوان گسترش فضای مفصلی مطرح

ساعت در محلول E.D.T.A کلسیم‌گیری شدند. طول سری-دمی کلیه نمونه‌ها اندازه‌گیری و وزن آنها مشخص شد. از هر روز جنینی و برای هر نوع رنگ‌آمیزی ۴ نمونه که دارای طول سری-دمی و وزن متفاوتی بودند بطور تصادفی انتخاب شدند. اندام عقبی از جنین‌ها جدا شده و در مرحله پردازش بافتی قرار گرفتند. از نمونه‌ها بلوکهای پارافینی تهیه شد و برشهای سریال به ضخامت ۵ میکرون با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری Leitz برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین و آلسین‌بلو و با ضخامت ۱۵ میکرون برای رنگ‌آمیزی اسیدفسفاتاز تهیه گردید. این برشهای متوالی با فاصله ۱ به ۵ بر روی لامهای میکروسکوپی قرار گرفتند. لامهای تهیه شده با استفاده از روش هماتوکسیلین-آئوزین، آلسین‌بلو و اسید فسفاتاز رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. با توجه به مطالعات قبلی انجام شده، بررسی روند پیدایش فضای مفصل در تکوین زانو در روزهای ۱۹-۱۲ جنین بوسیله مشاهدات میکروسکوپی ثبت شد.

یافته‌ها

روز سیزدهم جنینی (C.R: ۶/۸-۱۰/۴ mm)

در این روز جوانه اندام جلویی و عقبی در جنین مشاهده می‌شود. جوانه اندام به شکل پارو می‌باشد که بصورت یک تنه مزانشیمی و یک لایه اکتودرمی دیده می‌شود. لایه اکتودرمی، تنه مزانشیمی را پوشانده و قسمت انتهایی جوانه اندام پهن شده و صفحه پا (Foot plate) را می‌سازد. صفحه پا بوسیله یک تنگه حلقوی شکل از قسمت ابتدای جوانه اندام جدا شده است.

شکل ۱. تصویر میکروسکوپی جوانه اندام و سلول‌های مزانشیمی که مدهای ران و درشت‌نی را تشکیل داده‌اند دیده می‌شوند. رنگ‌آمیزی H&E بزرگ‌نمایی $\times 10$

شکل ۲. تصویر میکروسکوپی منطقه اینترزون که در آن دو لایه سلولی با تراکم زیاد و یک لایه میانی با تراکم کم مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی H&E بزرگ‌نمایی $\times 40$

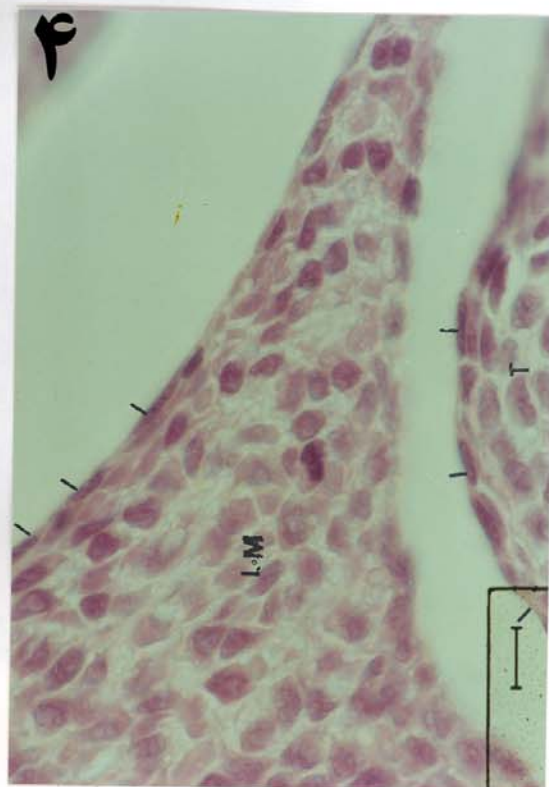
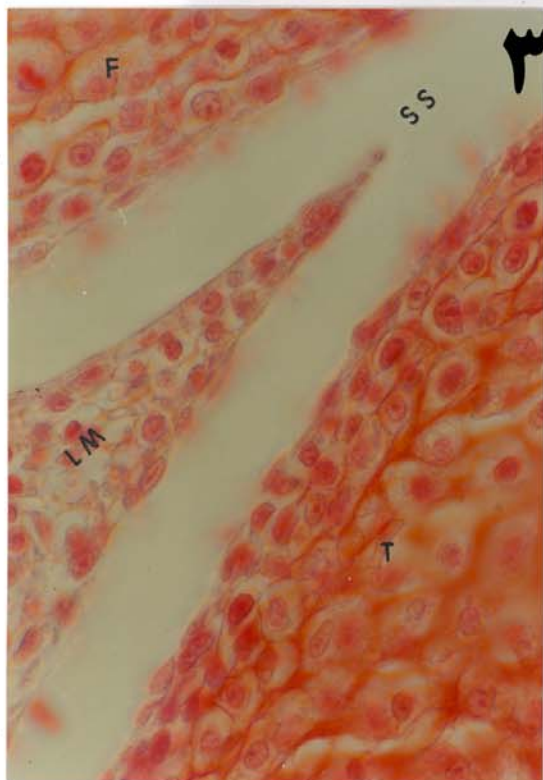
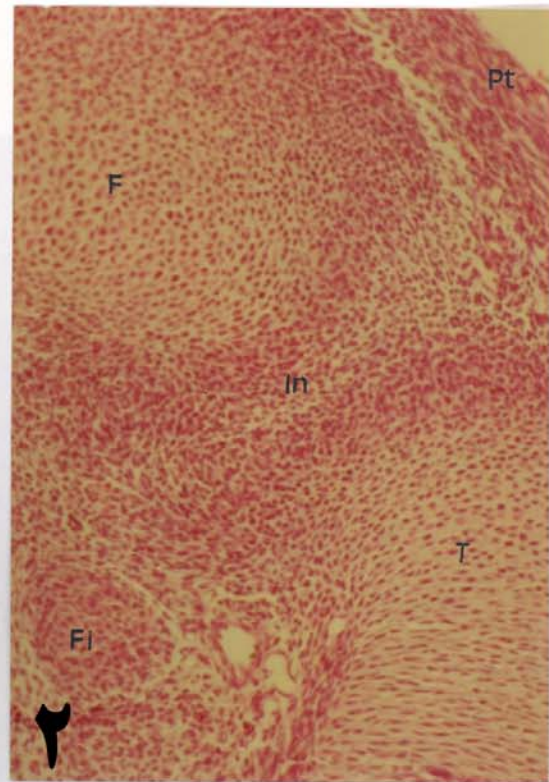
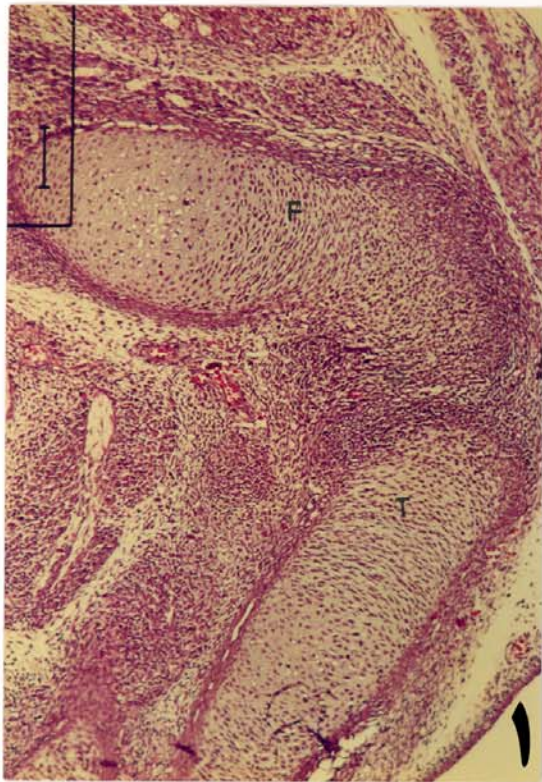
شکل ۳. تصویر میکروسکوپی مفصل زانو که نشانگر سطوح مفصلی ران و درشت‌نی و منیسک خارجی است و در آن نشانه‌ای از واکنش اسید فسفاتاز دیده نمی‌شود. رنگ‌آمیزی اسید فسفاتاز بزرگ‌نمایی $\times 100$

شکل ۴. تصویر میکروسکوپی مفصل زانو با سطوح مفصلی که بر روی آن سطوح سلول‌های پررنگ بطور پراکنده دیده می‌شوند. رنگ‌آمیزی H&E بزرگ‌نمایی $\times 100$

از زاویه خاصی بر نحوه تکامل مفصل زانو نگریسته‌اند و هنوز مطالب قابل بحث وجود دارد که می‌تواند چگونگی تکوین مفصل زانو و مکانیزم اصلی حفره‌سازی را روشن‌تر کند. هدف از انجام این تحقیق بررسی مراحل تکامل طبیعی زانوی جنین و با عنایت به نقش مرگ سلولی در ایجاد فضای مفصلی می‌باشد.

روش بررسی

در این تحقیق ۹۰ سر موش از نژاد خالص Sprague Dawley که تازه به دنیا آمده بودند انتخاب شدند. این موشها در حیوان‌خانه در قفسه‌های تمیز نگهداری و آب، خوراک و نورکافی در دسترس آنها بود. از این تعداد ۳۰ موش ماده و ۳۰ موش نر بطور تصادفی جدا شدند. هریک از موشهای ماده در یک قفس بطور انفرادی و موشهای نر در ۵ قفس ۶تایی تا سن بلوغ (با سن ۹۰ روز) و با وزنها ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم نگهداری شدند. هر یک از موشهای ماده بصورت مونوگامی حامله شدند. روز صفر حاملگی صبح روز بعد از کوپلینگ با مشاهده پلاک واژن و اسپرم در اسمیر واژن موش تعیین گردید. موشهای حامله شده بصورت انفرادی در قفس نگهداری شدند. از روز سیزدهم حاملگی روزانه ۲ سر از موشها بطور تصادفی جدا شده و عمل سزارین در آنها انجام شد و از هریک از آنها ۳ الی ۵ جنین موش از رحم مادر خارج و بعد از خارج نمودن از کیسه آمیون در آب شستشو داده شدند. جنین‌ها با احتساب روزهای تولد و اندازه طول سری-دمی آنها به سه گروه براساس نوع رنگ‌آمیزی، هماتوکسیلین-آئوزین، آلسین‌بلو و اسید فسفاتاز تقسیم شدند تا مورد مطالعه قرار بگیرند. نمونه‌های مربوط به رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - آئوزین و آلسین‌بلو در محلول فرمالین ۱۰٪ و نمونه‌های مربوط به رنگ‌آمیزی اسید فسفاتاز برای مدت ۲۴ ساعت در محلول استن خالص و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت با دو تغییر مجدد و در دمای اتاق (هر کدام از تغییرها ۲ ساعت) تثبیت شدند. نمونه‌های روزهای هفدهم، هجدهم و نوزدهم برای ۲۴



سلول‌های مزانشیمی متراکم، همگون که فاقد عروق خونی است، دیده می‌شوند. در دو رنگ‌آمیزی دیگر هیچ نشانه‌ای که بیانگر وجود فعالیت‌های آنزیمی باشد، مشاهده نشد. (شکل ۱)

روز شانزدهم جنینی (C.R: ۱۶/۷-۱۴/۶۵ mm)

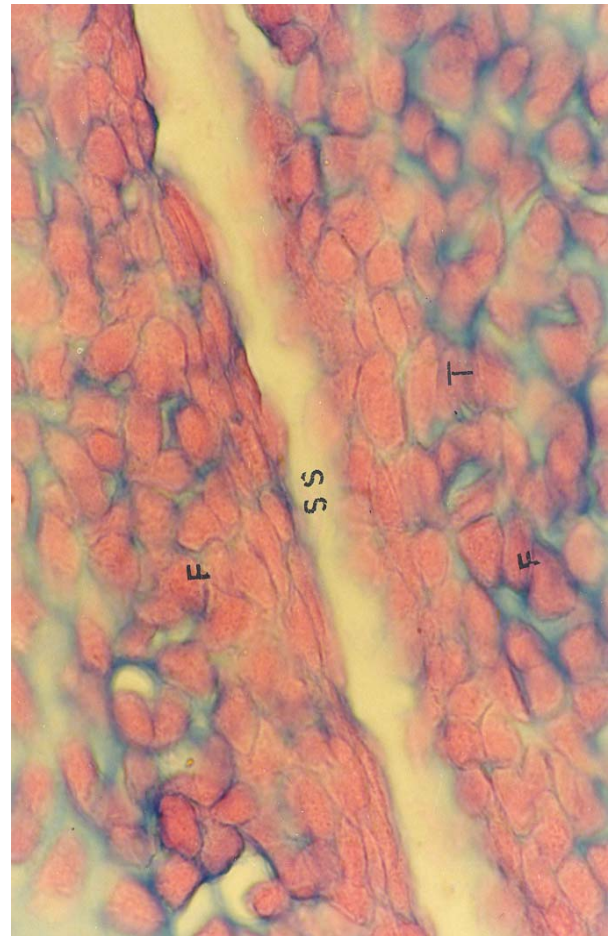
در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین دو مدل غضروفی درشت‌نی و ران نسبت به روز پانزدهم مشخص‌تر هستند و مدل غضروفی نازک‌نی در سمت خارج درشت‌نی مشاهده می‌شود، بطوریکه به نظر می‌رسد مفصل زانو بین سه استخوان ران، درشت‌نی و نازک‌نی تشکیل می‌شود. (شکل ۲)

در مشاهدات میکروسکوپی جهت قرار گرفتن و فشردگی، سلول‌های مزانشیمی بین مدل‌های غضروفی ران و درشت‌نی منطقه‌ای را بوجود می‌آورند که با بقیه قسمتهای مدل غضروفی متفاوت است. این قسمت از جوانه اندام شبیه به یک منطقه سه لایه است بطوریکه دو لایه کناری از تراکم سلولی زیادتری نسبت به لایه میانی برخوردار است. در جلوی مفصل زانو سلول‌های درشت و کشیده‌ای وجود دارند که نشانگر تاندون عضله چهار سر رانی می‌باشد. این سلولها از ران به سمت درشت‌نی کشیده شده‌اند. بین مدل‌های غضروفی ران و تاندون عضله چهارسر یکسری سلول‌های مدور و درشت وجود دارند که ساختمان اولیه غضروف کشکک از آن منشاء می‌گیرد. سلول‌های هیپرکروماتیک و کشیده در دو لایه کناری به صورت پراکنده مشاهده می‌شوند. (شکل ۴)

در نمونه‌هایی که با رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو تهیه شده و مورد مطالعه قرار گرفت سلول‌های درشت و چند وجهی کندروسیت در ناحیه تنه مدل‌های غضروفی که در حفره‌ها قرار دارند، دیده می‌شود. ماده بینابینی به رنگ آبی مشاهده می‌شود که نشانگر حضور ماده گلیکوز آمینوگلیکان است. این ماده رنگی در فضای مفصلی چندان مشهود نیست. (شکل ۵)

در رنگ‌آمیزی اسید فسفاتاز رسوب سیاه رنگ سولفید سرب را در دیافیز مدل‌های غضروفی می‌بینیم ولی اثری از این نوع رنگ‌آمیزی در منطقه سه‌لایه‌ای بین مدل‌های غضروفی نمایان نیست. (شکل ۳)

ج- روز هفدهم جنینی (C.R: ۲۰/۱۵-۱۶/۸۸ mm)



شکل ۵. تصویر میکروسکوپی مفصل زانو با سطوح مفصلی و فضای مفصلی که در آن شاهد رنگ آبی در ماده بینابینی سلول‌های سطوح مفصلی هستیم این آثار در فضای مفصلی وجود ندارد. رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو بزرگ‌نمایی $\times 100$

نیز قسمت ابتدایی جوانه اندام را به دو ناحیه تقسیم می‌کند و عملاً جوانه اندام به سه قسمت ناحیه ران، ساق و پا تقسیم شده است. در برشهای بافتی غضروف هیالین قابل مشاهده است که همان مدل‌های غضروفی ران و درشت‌نی می‌باشد.

روز پانزدهم جنینی (C.R: ۱۲/۵۵-۱۱/۵۵ mm)

در این روز مدل‌های غضروفی ران و درشت‌نی در یک فاصله نسبتاً وسیعی بهم قرار دارند. در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین سلول‌های اطراف مدل‌های غضروفی در چهار ردیف قرار دارند که از طرف بیرون دارای محدوده واضح و از طرف درون کم کم محو می‌شوند. در فاصله دو مدل غضروفی فوق

هفدهم به صورت پراکنده در خارجی‌ترین لایه سلولی یافت می‌شوند. سلول‌های عضلانی ماهیچه‌های اطراف مفصل که از استخوان ران منشاء می‌گیرند و به ابتدای درشت‌نی منتهی می‌شوند و همچنین ساختمان منیسکها و سلول‌های سازنده لیگامان متقاطع که بین دو کندیل استخوان ران و درشت‌نی قرار داده می‌شوند مشاهده می‌گردند.

تغییرات خاصی در این نمونه‌ها در رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو غیر از آنچه که در روز هفدهم دیده شده بود بوجود نیامد. نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی اسید فسفاتاز شبیه روزهای قبل می‌باشند و تغییری قابل مشاهده نیست.

روز نوزدهم جنینی (C.R: ۲۹/۲۵-۳۱/۱ mm)

روند استخوانی شدن سلولها در دیافیز مدلها رو به گسترش است. عروق خونی و تشکیلات سیستم هاورس را مشاهده می‌کنیم. سلول‌های پررنگ آپوتوتیکی نیز در سطوح مفصلی دیده می‌شوند.

بحث

روند تکامل مفصل زانو از الگوی مشخصی تبعیت می‌کند که شامل تشکیل اینترزون، ایجاد فضای مفصلی و تخصصی شدن سلول‌های مزانشیمی است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در روز سیزدهم اندام عقبی از جنین جوانه می‌زند و تا روز پانزدهم الگوهای اصلی اندام شامل ران، ساق و پا نمایان می‌شوند. ساختمان هر یک از الگوهای اصلی از سلول‌های مزانشیمی همگون، فشرده، نامنظم و بدون عروق تشکیل شده است. در روز پانزدهم تنگی حلقوی اولیه اندام عقبی که محدوده مفصل زانو می‌باشد با تراکم سلولی به دو منطقه فشرده کناری و یک منطقه کم تراکم میانی تقسیم می‌شود. اغلب محققانی که روند تکامل مفصل زانو را مطالعه کرده‌اند بر تشکیل منطقه اینترزون اتفاق نظر دارند. (۲) فقط O'Rahilly معتقد بود که اینترزون در متمایز شدن ساختمان مفصل زانو نقشی ندارد. (۱۴) در لایه میانی اینترزون تراکم سلولی بصورتی است که شکافهای کوچک بین سلولها مشاهده می‌گردد و در رنگ‌آمیزی‌های انجام شده نشانه‌ای که دال بر وجود سلول‌های مرده (آپوتوتیک) و وجود

کندیل غضروفی ران، درشت‌نی و نازکنی کاملاً مشخص هستند و نازکنی در ساختمان مفصل زانو شرکت ندارد. ساختمان گوه‌ای شکل بین کندیل‌های ران و درشت‌نی در دو طرف داخل و خارج مشاهده می‌شود. در لبه‌های این ساختمان گوه‌ای شکل، سلول‌های پررنگ و بدون هسته بصورت پراکنده وجود دارند. فضای خالی که بصورت شکافهای کوچک ایجاد شده است بین کندیلها و ساختمان گوه‌ای شکل قرار دارد. این فضای خالی بین دو استخوان گوه‌ای شکل وجود ندارد و توسط بافت مزانشیمی غیرتراکم که حاوی عروق خونی است پر شده است. در جلوی زانو چند ردیف سلول که از طرف استخوان کشکک به سمت برجستگی درشت‌نی مشاهده می‌شود. روی سطح مفصلی استخوان ران و کناره منیسکها توسط سلول‌های پررنگ و کشیده در سرتاسر سطح مفصلی در یک ردیف سلولی و بدنبال هم پوشیده شده است که اینها همان سلول‌های آپوتوتیکی هستند که می‌توانند در ایجاد حفره مفصل زانو نقش ایفا کنند.

تعداد سلول‌های پررنگ در قسمت‌های داخلی و خارجی نسبت به وسط مفصل بیشتر است و اینطور به نظر می‌رسد که فضای مفصلی از کناره‌های مفصل به وسط آن پیشرفت می‌کند. این سلولها در سطوح مفصلی کشکک نیز دیده می‌شوند. در رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو تغییر خاصی نسبت به نمونه‌های روز قبل مشاهده نمی‌شود. در رنگ‌آمیزی اسید فسفاتاز، رسوب سیاه رنگ سولفید سرب در دیافیز هر سه مدل غضروفی ران، درشت‌نی و نازکنی که تنها آثار واکنش بین فعالیتهای آنزیمی و رنگ اسیدفسفاتاز می‌باشد مشاهده می‌شود و نشانی از حضور آنزیم در فضای مفصلی و اطراف سلول‌های پررنگ نیست.

روز هجدهم جنینی (C.R: ۲۰/۲۵-۲۱/۲ mm) :

در این روز غضروف ران و درشت‌نی کاملاً مشخص می‌باشند و در اطراف مدلهای غضروفی لایه عروق استخوانی نمایان است. در ناحیه دیافیز مرکز استخوانی شدن غضروف مشاهده می‌شود. در سطوح مفصلی، سلول‌های پررنگ همانند روز

مقاطع در لایه میانی از منطقه اینترزون مشاهده می‌شوند. در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین فضای مفصلی را بطور واضح می‌بینیم و سلول‌های پر رنگ (آپوتوتیک) را در سطوح مفصلی کندیل‌های خارجی و داخلی مدلهای غضروفی ران و درشت‌نی که با فاصله به دنبال هم قرار دارند مشاهده می‌کنیم. این وضعیت موید این است که مرگ سلولی در ایجاد حفره‌های مفصلی نقش دارند (۶، ۱۱) ولی به تنهایی در گسترش فضای مفصلی دخالت ندارند و باید نقش عوامل دیگری از جمله انقباض عضلانی را دخیل دانست و احتمالاً نظریه Mitrovic را نیز مورد تایید قرار داد (۵،۳).

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این مطالعه تصور می‌شود که فضای مفصلی بدنبال پدیده مرگ سلولی بوجود می‌آید گرچه این پدیده به تنهایی در گسترش فضای مفصلی کافی نیست.

References

1. Gardner M, Orahlly R. Leg early development of the knee joint human embryos. *J Anat (G,B)* 1943; 102: 289-299.
 2. Mitrovic PR. Lanecrose physiologique dansle mesencyme arthwltry des embryons derat eypwlet. *Academic of Science* 1971; 273: 624-645.
 3. Socoloff M. The role of movement in embryonic joint development. *Biol* 1966; 4: 401-420.
 4. Anderson H. Histochemical studies of development of the human hip joint. *Act Anat* 1962; 48, 258-269.
 5. Valojerdy MR. Effect of paralysis on the development of synovial joint in chick embryos. Ph.D. theasis glasgow university 1990.
 6. Takabatake K, Yamamoto T. Morphology of synovium during its differentiation and development in the mouse knee. *Joint A histochemical, SEM and TEM*
- آنزیم لیزوزوم و مواد متاکروماتیک در منطقه اینترزون باشد مشاهده نشد. در روز شانزدهم در نمونه‌هایی که با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین تهیه شده بودند، در سرتاسر سطوح مفصلی که همان لایه‌های کناری اینترزون است، سلول‌های پررنگ و کشیده مشاهده شدند. این سلولها همان سلول‌های آپوتوتیک هستند که می‌توانند در ایجاد فضای در مفصل زانو نقش داشته باشند، ولی تعداد این سلولها در سطوح مفصلی به اندازه‌ای نیست که به تنهایی توانایی ایجاد و گسترش فضای مفصلی را داشته باشند. بنابراین تنها مرگ سلولی عامل بوجود آمدن فضای مفصلی نیست و عوامل دیگری در آن دخالت دارند. مشاهده نمونه‌های موجود موید نظر Mitrovic و Socoloff می‌باشد (۲،۳). در رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو، واکنش به مواد متاکروماتیک در مدلهای غضروفی جوانه اندام با حضور رنگ آبی در اطراف سلول‌های کندروسیت مشاهده می‌شود، در فضای مفصلی واکنش به مواد متاکرومازی خیلی ضعیف می‌باشد. بنابراین عدم وجود این مواد در فضای مفصلی نظریه کسانی که تاثیر مواد متاکرومازی را در ایجاد فضای مفصلی دخیل می‌دانند را تایید نمی‌نماید (۴،۹). در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با اسید فسفاتاز، رسوب سیاه رنگ سولفید سرب، که ناشی از فعالیتهای آنزیمی است در منطقه اینترزون و در کنار سلول‌های (آپوتوتیک) مرده سطوح مفصلی مشاهده نشد. عدم وجود واکنش بین مواد رنگ‌آمیزی شده و ماده بین سلولی، نشان می‌دهد که مرگ سلولی ناشی از رها شدن محتویات لیزوزوم سلول‌های پررنگ نمی‌باشد (۴) و موید این است که مرگ سلولی که در جریان روند تکوین مفصل زانو و در جریان تشکیل فضای مفصلی وجود دارد به صورت فیزیولوژیکی است و بسیاری از خصوصیات مرفولوژیکی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوتوتیک) را نشان می‌دهد (۱۱) و سلول‌های ماکروفاژ در جمع‌آوری سلول‌های مرده نقش دارند این نتیجه‌گیری نظریه Takabalake و Yamamoto را تایید می‌کند (۶). در روز هفدهم ساختمانهای دیگر مفصل زانو از جمله منیسک‌های داخلی و خارجی و رباطهای

- study. *Anat Embryol (Berl)* 1991; 183(6): 537-44.
7. Walmsley R. The development of the patellar. *J Anat-lond* 1940; 47: 360-368.
8. Crai FM, Bayliss M. A role for hyaloronian in joint development. *J Anat* 1990; 171: 17-23.
9. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-west P. Development of synovial joints. *Birth defects Res C embryo today* 2003; 69(2): 144-55.
10. 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 PT4: 659-79.
11. Kouri JB, Aguilera JM, Reyes J, Lozoya KA, human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *J Rheumato* 2000; 27(4): 1005-19.
12. Kavanagh E, Abiri M, Vette YS, Bland E, Doreen E. Division ad death of cells in developing synovial joints and long bones. *J Cell Biol international*. 28(8): 679-688.
13. H'eraud F, Heraud A and Harmand MF. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Ann Rheum* 2000; 59: 959-965.
14. O'rahilly R. The early prenatal development of the human knee joint . *J Anat Lond* 2000; 85: 166-170.

