

**UNIVERZITA KARLOVA**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Experimentální chirurgie



**MUDr. Mgr. Monika Frydrychová**

Osteogeneze a kostní hojení u vrozeně krátkého femuru

*Osteogenesis and bone healing in congenital short femur*

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Pavel Dungal, DrSc.

Konzultant: doc. MUDr. Martin Ošťádal, PhD.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1. 10. 2021

MONIKA FRYDRYCHOVÁ

Laboratorní část práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva zdravotnictví ČR, VZ0002384101: „Operační léčení v oblasti kyčelního kloubu při úrazech, vrozených vadách, osteopatiích a artropatiích. Zlomeniny páteře v terénu osteopatie.“

Identifikační záznam:

FRYDRYCHOVÁ, Monika. *Osteogeneze a kostní hojení u vrozeně krátkého femuru. [Osteogenesis and bone healing in congenital short femur]*. Praha, 2021. 62 s., 3 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ortopedická klinika 1. LF UK 2021. Školitel Dungl, Pavel. Konzultant Ošřádal, Martin.

## **Poděkování**

Na tomto místě chci poděkovat všem, kteří mě po celou dobu studia odborně vedli a podporovali. Zejména svému školiteli a učiteli, prof. Pavlu Dunglovi, za trpělivé vedení ve vědecké činnosti i klinické praxi, za cenné rady a připomínky při plnění cílů práce a jejich závěrečné prezentaci v písemné formě. Za pomoc při sestavování dílčích částí práce a praktické připomínky děkuji i konzultantovi a kolegovi, doc. Martinu Ošťádalovi.

Velký dík patří nyní již bývalému týmu Laboratoře molekulární biologie Ústavu patologické anatomie 1. LF UK a VFN pod vedením Ing. Daniela Tvrdíka, PhD., s jehož přispěním vznikala laboratorní část práce.

V neposlední řadě chci poděkovat svým blízkým a rodině, za významnou podporu, trpělivost a ochotu přizpůsobit se mým ambicím a aktivitám.

## SOUHRN

**Úvod:** Vrozeně krátký femur, neboli proximální femorální fokální deficiencie (PFFD), je vzácná komplexní vada dolní končetiny s maximem postižení na femuru. Nálezy zahrnují širokou škálu variant od kompletní absence femuru až po nenápadný zkrat.

**Cíl studie:** 1. Molekulární analýza patologické kostní tkáně u vrozeně krátkého femuru se zaměřením na expresi angiogenních a osteogenních faktorů v porovnání s fyziologickou kostí. Očekávané byly rozdíly v genové expresi obou skupin genů, zejména v jejich množství.

2. Retrospektivní analýza hojení femuru po prolongaci s ohledem na závažnost postižení, věk, délku prolongátu a s tím spojené komplikace. Předpokladem bylo prodloužené kostní hojení u závažnějších defektů končetiny, u starších pacientů, u pacientů s PFFD v porovnání s kontrolní skupinou.

**Materiál a metody:** Z bloku kostní tkáně byla izolována RNA a biočipovou technikou zjištěn transkripční profil (SuperArray Bioscience Corporation) s možností detekce 113 genů osteogeneze a 113 genů angiogeneze. Bylo analyzováno celkem 10 vzorků (7 PFFD, 3 kontrolní). K prolongaci končetiny byli indikováni pacienti s typy Pappas III a IV (s pakloubem femuru) a pacienti s typy VII, VIII a IX. Byla analyzována data u 57 pacientů s PFFD a 12 pacientů kontrolní skupiny. Statické zpracování probíhalo metodou GLS.

**Výsledky:** Zaznamenali jsme rozdíly v genové expresi u pacientů s pakloubem proti kontrolním vzorkům, významnější u genů angiogeneze. U pacientů s pakloubem byly některé geny více exprimovány (např. gen pro kalcitoninový receptor, kolagen XII, kolagen II, IX, FGFR2, fibronektin, integrin), jiné vykazovaly expresi nižší (např. gen pro annexin A5, kolagen XVIII, kolagen I, kathepsin K, FGFR1, FGFR3, IGF2, VEGFB). V klinické části studie jsme neprokázali souvislost mezi hojením po prolongaci a stupněm postižení femuru, ani na věku pacienta. Statisticky významný rozdíl byl v průměrných hodnotách healing indexu (HI) při druhé prolongaci. Významnou hodnotu v rozdílu HI prokázala i délka odstupu mezi prolongacemi, kdy v čase pod 7 let mezi operacemi výrazně narůstá healing index.

**Závěr:** Hypotéza o rozdílné genové expresi byla potvrzena, nelze však výsledky zobecňovat. Hypotéza o souvislosti kostního hojení a závažnosti postižení femuru potvrzena nebyla. Významný rozdíl v hojení byl zjištěn při druhém opakování prolongace a při odstupu mezi prolongacemi menším než 7 let.

**Klíčová slova:** vrozeně krátký femur, genová exprese, angiogeneze, osteogeneze, kostní hojení, prolongace femuru

## SUMMARY

**Introduction:** Congenital short femur, or proximal femoral focal deficiency (PFFD), is a rare complex deformity of the lower extremity with femoral dominance. The clinical findings cover wide range of variety, from femoral absence till inconspicuous shortening of the femur.

**Aim of the study:** 1. Molecular analysis of pseudoarthrosis tissue in congenital short femur with focusing on osteogenic and angiogenic gene expression in comparison with physiological bone. The differences in gene expression were expected. 2. Retrospective analysis of femoral healing after prolongation calculating the severity of affection, age, distance of elongation and complication. The extended healing according to severity type and age was expected compared to control group.

**Material and methods:** The RNA from piece of one was isolated and transcription profile of possible 113 genes of osteogenesis and angiogenesis was detected by biochip technology (SuperArray Bioscience Corporation). 10 samples analyses were performed (7 of PFFD, 3 controls). The data of 57 PFFD patients indicated for elongation of the femur with the types Pappas III, IV, VII, VIII and IX and 12 patients in control group were evaluated retrospectively and statistically by GLS method.

**Results:** The expected differences in gene expression in PFFD tissue compared with control were confirmed, especially in angiogenesis. In PFFD tissue were some genes over-expressed (calcitonin receptor gene, collagen XII, collagen II, IX, FGFR2, fibronectin, integrin), some of them under-expressed (gene for annexin A5, collagen XVIII, collagen I, cathepsin K, FGFR1, FGFR3, IGF2, VEGFB). The relationship between bone healing and severity of affection as so as age of the patient was not confirmed at clinical part of the project. Statistically significant difference in healing index (HI) during the second repetitive prolongation was noted. The significance of HI difference was found in the interval between repetitions of femur prolongation, when under 7 years between procedures the HI grows.

**Conclusion:** The hypothesis of the different gene expression was confirmed, but not so strong for generalize. The hypothesis of the relationship between severity of femoral defect and bone healing (HI) was not confirmed. The significant difference in bone healing after elongation in second repetition and interval between procedures less than 7 years was identified.

**Key words:** Proximal femoral focal deficiency, Gene Expression, Angiogenesis, Osteogenesis, Bone healing, Prolongation of the femur

## Obsah

1. Úvod .....	8
2. Poznámky k embryologii a anatomii dolní končetiny .....	10
2.1. Embryologie .....	10
2.2. Molekulární regulace růstu končetin .....	12
2.3. Vývoj cév .....	13
3. Morfologická charakteristika PFFD .....	15
3.1. Kyčelní kloub a femur .....	18
3.2. Kolenní kloub .....	22
3.3. Běrec a hlezno .....	24
3.4. Noha .....	25
3.5. Anatomie měkkých tkání u PFFD .....	26
3.6. Cévní zásobení dolní končetiny .....	27
3.7. Cévní anomálie u vrozeně krátkého femuru .....	29
4. Vyšetřovací metody .....	31
5. Strategie léčení .....	33
6. Experimentální část .....	37
6.1. Laboratorní studie .....	37
6.1.1. Materiál, získávání vzorků .....	37
6.1.2. Metodika .....	38
6.1.3. Laboratorní protokol .....	41
6.1.4. Výsledky .....	45
6.1.5. Diskuse .....	48
6.2. Klinická část .....	52
6.2.1. Prolongace femuru u pacientů s PFFD .....	52
6.2.2. Technika prolongace kostí .....	53
6.2.3. Materiál a metodika .....	55
6.2.4. Výsledky .....	58
6.2.5. Komplikace prolongací .....	63
6.2.6. Diskuse .....	65
7. Závěr .....	69
8. Literatura .....	71

## 1. Úvod

Vrozeně krátký femur je vzácná kongenitální vada pohybového aparátu, která postihuje vývoj celé dolní končetiny. Zahrnuje širokou škálu klinických projevů od kompletní absence femuru včetně acetabula až po nenápadný zkrat končetiny, u nichž dominuje postižení stehenní kosti. Protože u většiny typů je maximum postižení lokalizováno proximálně, je tato vada známá v mezinárodní literatuře jako *proximal femoral focal deficiency (PFFD)*.

Etiologie vady není dosud vysvětlena. Porucha vývoje končetiny vzniká již v době časně embryogeneze, mezi 4.-9. týdnem gravidity. Nabízí se úvaha o postižení genomovém, ale většinou je vada pouze jednostranná, proto je na místě zaměření spíše na lokální příčiny. Ani v dostupné světové literatuře jsme nenašli uspokojivé vysvětlení v podobě práce zabývající se analýzou biologické a molekulární podstaty této kostní vady; pouze histologický popis kostní tkáně u vrozeně krátkého femuru se objevuje v pracích Pappase (1983) nebo Bodena (1989). Boden píše o „abnormální vlastnosti proximální fýzy femuru, která je založena na defektu proliferace chondrocytů“. Jako následek zmiňuje opožděnou mineralizaci kostní matrix, přerušeni invaze cév a poruchu enchondrálního růstu. Na základě Bodenovy práce můžeme spekulovat o podstatě kostních změn a abnormalit na genové úrovni, zejména v genech ovlivňujících proliferaci a diferenciaci buněk (např. BMP – kostní morfogenetický protein, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, FGF – růstový faktor fibroblastů) ve skupině genů zajišťujících rovnováhu kostního metabolismu (např. geny pro kalcitoninový receptor, annexin A5, metalloproteinázy) a také mezi geny pro angiogenní faktory. Nicméně osteogeneze je velmi komplexní proces řízený jak z intracelulárního, tak extracelulárního prostředí. Regulaci těchto procesů reprezentuje řada růstových faktorů, signálních molekul a receptorů, jejichž funkce závisí na expresi příslušných genů. Pokud produkce některých faktorů selže kompletně nebo se faktory vytvoří nekompletní co do struktury nebo funkce, mohou se objevit poruchy osteogeneze. Je zřejmé, že osteogeneze není izolovaný proces a ukazuje se, že je velmi silně ovlivňována angiogenními faktory. Například je prokázáno, že FGF-2 indukuje produkci VEGF v osteoblastech, které vytváří také BMP-2 (Saadeh et al, 2000; Steinbrech et al, 2000).

Výše zmíněná fakta vedla k myšlence studie, jejíž cílem je analýza genové exprese osteogenních a angiogenních faktorů v pakloubu femuru u pacientů s PFFD. Jak jsme předeslali při hodnocení prvních výsledků studie v roce 2010 (Frydrychová et al, 2007, 2010),



očekávali jsme odhalení rozdílů v genové expresi ve tkáni pakloubu ve srovnání s fyziologickou kostí, a to rozdíly jak kvantitativní, tak i různé typy exprimovaných genů (reprezentující různé fáze osteogeneze i angiogeneze). Výsledky by mohly pomoci objasnit potíže a komplikace během ortopedických korekčních operací, zejména pak během prodlužování a kostního hojení u pacientů s vrozeným defektem končetiny (vrozeně krátký femur, vrozený pakloub bérce nebo fibulární hemimelie). Při tvorbě standardních vyšetřovacích postupů u pacientů s PFFD bylo na základě klinické studie Ortopedické kliniky FN Na Bulovce z let 2005-2009 zařazeno vyšetření cévního zásobení končetiny CT angiografií. U většiny pacientů, kteří podstoupili CT angiografii, byla anatomie cévního řečiště hodnocena jako normální. Nicméně u 3 pacientů byla nalezena a popsána atypie cévního zásobení postižené dolní končetiny cestou a. iliaca interna.

V souvislosti s očekávanými změnami v genové expresi a zjištěnými cévními změnami jsme se zaměřili na praktický dopad změn v klinické studii, kdy jsme analyzovali průběh a výsledky prolongační terapie u různých typů postižení dle Pappasovy klasifikace, srovnání tvorby a hojení prolongátu mezi jednotlivými fázemi léčení a také porovnání s kontrolním souborem pacientů indikovaných k prolongaci končetiny z jiných důvodů, než pro vrozený zkrat (po zlomeninách, infektech, prolongace u achondroplazií apod.)

Stanovili jsme si následující hypotézy pro laboratorní část projektu (hypotéza 1) a pro klinickou část práce (hypotéza 2)

***Hypotéza číslo 1:*** Profil genové exprese osteo i angiogenních faktorů je odlišný u pacientů s vrozeně krátkým femurem proti kontrolním vzorkům fyziologické kostní tkáně.

***Hypotéza číslo 2:*** Hojení prolongátu a jeho regenerace je u pacientů s vrozeně krátkým femurem delší než u zdravých fyziologických kostí.

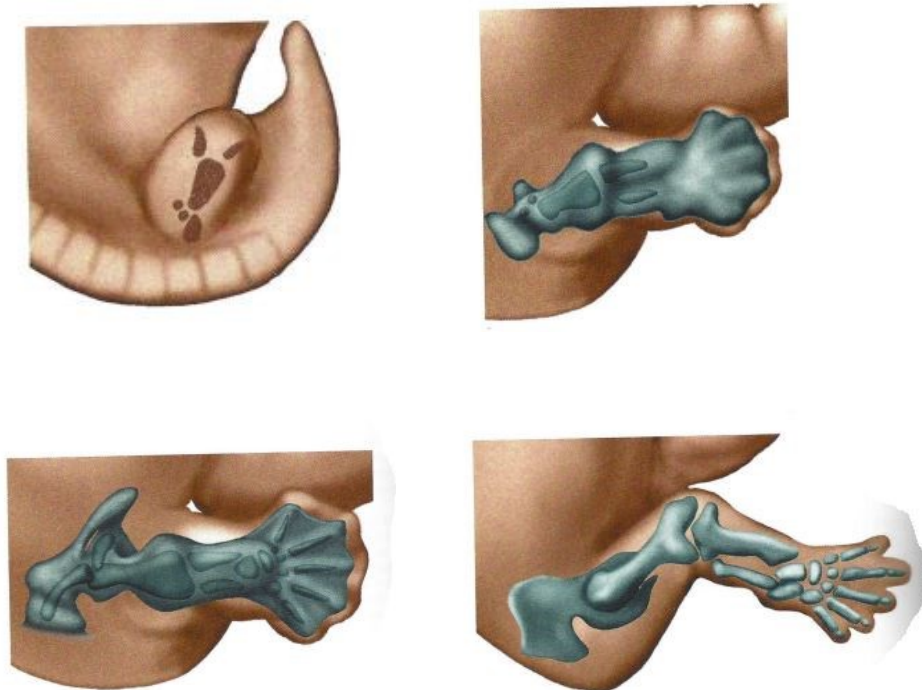
## 2. Poznámky k embryologii a anatomii dolní končetiny

### 2.1. Embryologie

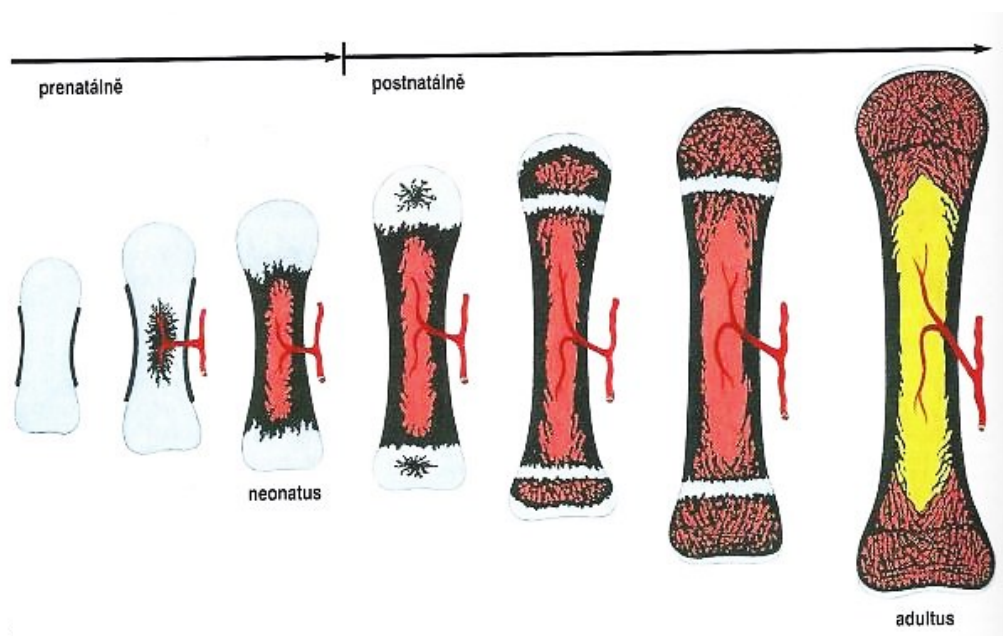
Vývoj končetin začíná v raném stadiu těhotenství, ve 4. týdnu se utvářejí základy horních končetin, o týden později pak základ dolních končetin (31.-32. den). Na laterální straně těla embrya vznikají proliferací mezenchymu somatopleury končetinové pupeny pokryté ektodermem, jehož ztlustění na konci vytváří ektodermový hřeben neboli apikální ektodermovou lištu (AER). Koncem 5. týdne vývoje mají končetiny ploutvičkovitý tvar, pak se objevuje cirkulární zaškrvení, které dělí základ končetiny na proximální axopodium a distálně terčovité autopodium. V 6. týdnu se v oblasti budoucího kolene (lokte) axopodium diferencuje na stylopodium a zeugopodium, na autopodiu se čtyřmi radiálními rýhami začínají ohraničovat prsty. Od 6. týdne vývoje začíná diferenciace mezenchymu končetinových pupenů v chondrocyty a vytváří se tak chrupavčité modely kostí (obr. 1). V místě budoucích kloubů zůstává původní mezenchym jako „primitivní disk“, vzniká postupně kloubní dutina. Zahuštěním okolních buněk vzniká kloubní pouzdro (Sadler, 2011).

Ve 12. týdnu vývoje jsou v základech dlouhých kostí patrna primární osifikační centra. Osifikace začíná v perichondriu diafýzy dlouhých kostí tvorbou kostěného pláště, a do takto změněné chrupavky vrůstají cévy. Chondrogenní osifikace postupuje z centra směrem ke koncům chrupavčitého základu kosti. V tomto období se také začíná projevovat reflexní aktivita kosterního svalstva. (Dylevský, 2014)

Mezi 14. a 16. týdnem pokračuje osifikace skeletu. V období 17. - 20. týdne se výrazně prodlužují dolní končetiny a vyrovnává se disproporce proti horním končetinám. Při narození je obvykle diafýza dlouhých kostí zcela osifikována, obě epifýzy jsou stále chrupavčité. V epifýzách se sekundární osifikační centra tvoří v časném postnatálním období. Chrupavčitá ploténka mezi diafýzou a epifýzou (růstová ploténka), přetrvává do ukončení kostního postnatálního růstu (obr. 2). Do konce fetálního období se rozvíjí podkožní tukové vazivo, které dodává končetinám válcovitý vzhled. (Sadler, 2011; Vacek, 2006; Čihák et al, 2011)



Obr.1: Vývoj dolní končetiny: embryo 5. -7. týden vývoje, prochondrální blastém základů pánevní kosti a femuru, tibie a fibuly se postupně chondrifikuje (Čihák, 2011)

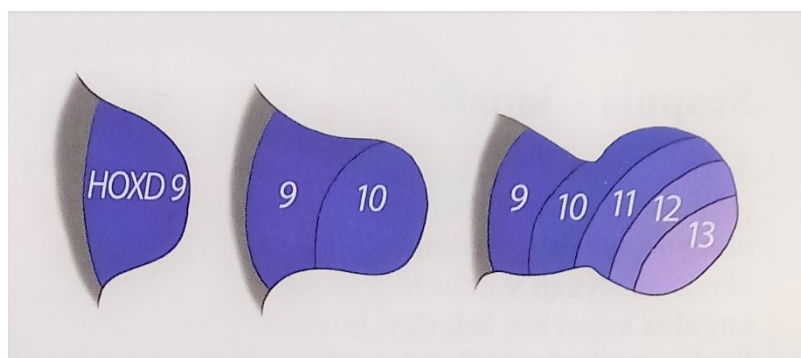


Obr. 2. Postup osifikace dlouhých kostí v prenatálním a postnatálním období. (Čihák et al, 2011)

## 2.2. Molekulární regulace růstu končetin

Proces formování tvaru zárodku je řízen kraniokaudálním směrem souborem homeotických genů (homeobox, HOX geny). Existují ve 4 kopiích souborů genů (HOXA, HOXB, HOXC, HOXD) na 4 chromozomech. V každé kopii je uspořádán soubor homologických genů podle časování exprese jejich funkce. (Vacek, 2006, Čihák, 2011)

Jakmile je určena pozice končetiny v kraniokaudálním směru, je její růst dále regulován podél dalších os (proximodistální, předozadní a dorzoventrální). Růst základu končetiny je iniciován geny laterální ploténky, TBX5 a FGF10 u horní končetiny, TBX4 a FGF10 u dolní končetiny. Kostní morfogenetický protein BMP exprimovaný ve ventrálním ektodermu indukuje vytváření AER prostřednictvím genu MSX2. Vytvořená AER exprimuje FGF4 a FGF8, které udržují růstovou zónu rychle proliferujících mezenchymových buněk. Buňky vzdálenější od lišty postupně zpomalují růst a diferencují se. V předozadní ose je růst končetiny řízen zónou polarisující aktivity (ZPA). Buňky při zadním okraji končetiny produkují kyselinu retinovou a ta spouští expresi genu Sonic hedgehog (SHH). Dorzoventrální osa je řízena proteiny BMP, které indukují expresi transkripčního faktoru EN1 ve ventrálním ektodermu. EN1 potlačuje expresi WNT, který mimo jiné udržuje expresi SHH v ZPA a tím ovlivňuje nepřímo i předozadní osu. (Vacek, 2006, Dylevský, 2014)



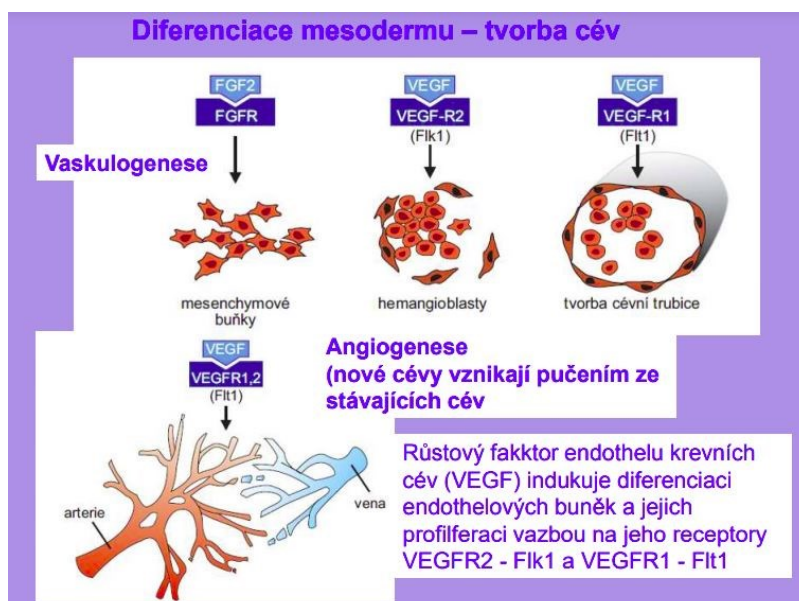
Obr. 3: Podíl HOXD genů na utváření úseků dolní končetiny: pletenec, stylopodium, zeugopodium a autopodium (Čihák, 2011)

## 2.3. Vývoj cév

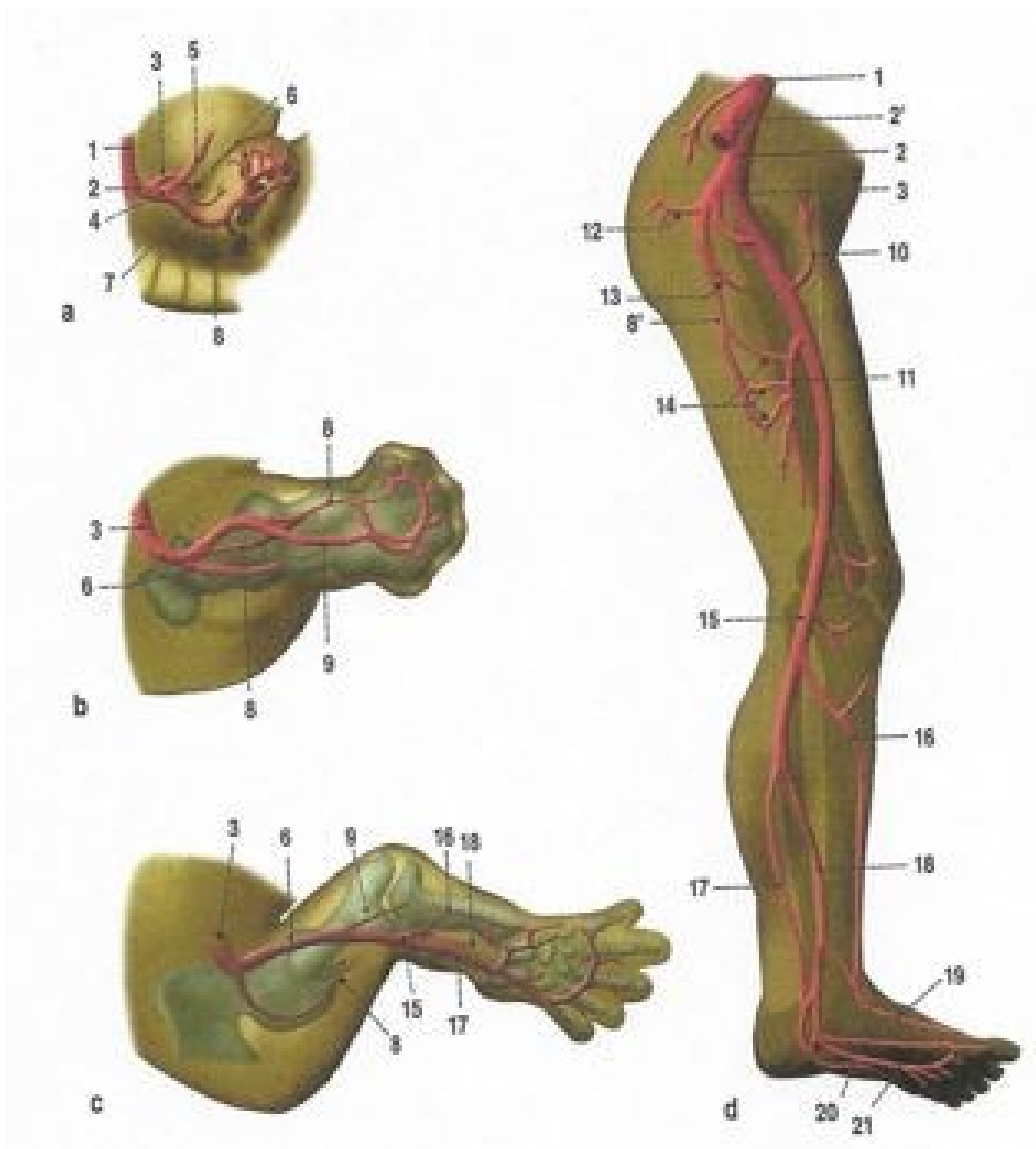
Celý cévní systém, podobně jako kosterní systém, pochází z mesodermu.

Vývoj cév zahrnuje dva základní pochody: 1. vaskulogeneze – cévy vznikají de novo splýváním angioblastů do krevních ostrůvků (velké cévy); 2. angiogeneze – tvorba cév pučením z již existujících cév (např. končetinové cévy). Vývoj celého cévního systému je řízen růstovým faktorem cévního endotelu (VEGF) a dalšími růstovými faktory (obr. 4). Angioblast je indukován VEGF, produkovaným buňkami mesodermu. Expresi VEGF doprovází exprese HOXB5, který zvyšuje expresi receptoru pro VEGF. V centru ostrůvků se buňky diferencují v hemopoetické kmenové buňky, periferní buňky se mění v angioblasty. VEGF stimuluje proliferaci angioblastů a reguluje spojování endothelových buněk v primitivní krevní cévy. Vyhrávání a remodelace cévního řečiště jsou regulovány dalšími růstovými faktory, např. PDGF, TGF $\beta$ . Chordou produkovaný SHH stimuluje okolní mesoderm k expresi VEGF. (Sadler, 2011)

Arterie pro dolní končetinu (tzv. axiální, pocházející z 5. bederní intersegmentové arterie) vstupuje do pupenu dolní končetiny 36. den, tedy záhy po jeho diferenciaci 31.-32. den embryonálního vývoje (Vacek, 2006, Čihák, 2016). Axiální arterie napojená na a. iliaca interna persistuje později a. ischiadica (a. concomitans n. ischiadici) a zásobující funkci dolní končetiny přebírá a. iliaca externa. Pozůstatkem axiální arterie je také a. poplitea a část a. fibularis (obr. 5). Ostatní tepny dolní končetiny vznikly růstem z a. iliaca externa. (Čihák, 2016)



Obr. 4: Vaskulogeneze.  
(podle Grim, 2014)



Obr.5: Vývoj cév dolní končetiny. (Čihák, 2011)

1 - aorta, 2 - a. iliaca communis, 3 - a. iliaca externa, 4 - a. iliaca interna, 5 - a. umbilicalis, 6 - axiální tepna základu dolní končetiny, 7 - a. femoralis, 8 - a. ischiadica, 10 - a. epigastrica inferior, 11 - a. profunda femoris, 12 - a. glutea superior, 13 - a. pudenda interna, 14 - aa. perforantes, 15 - a. poplitea, 16 - a. tibialis anterior, 17 - a. tibialis posterior, 18 - a. fibularis, 19 - a. dorsalis pedis, 20 - a. plantaris medialis, 21 - a. plantaris lateralis

### 3. Morfologická charakteristika PFFD

Proximální femorální fokální deficiencie představuje velmi vzácnou komplexní deformitu končetiny, která se projevuje jako hypoplazie různých částí femuru s maximum změn v proximální části. Klinicky je nápadný zkrat končetiny ve stehenní části, která je flektována, abdukována a zevně rotována. Přidružené anomálie se mění v závislosti na typu deficiencie. Přestože je maximum změn vyjádřeno na proximálním femuru, je postižena celá končetina. Různí autoři uvádějí různá procenta výskytu přidružených vad u PFFD, v našem souboru jsme zaznamenali přidruženou anomálii na postižené končetině ve 100 % případů. Při plnění cílů institucionálního výzkumného záměru MZ ČR 0002384101 jsme se mimo jiné zaměřili na studium morfologických změn doprovázejících PFFD při využití přesnějších zobrazovacích diagnostických metod (CT, CT angiografie a artroskopie) a závěry těchto klinických studií doplňují k známým faktům o této vadě dostupným z literatury. Kromě proximálního femuru a acetabula je postižen kolenní kloub, bérce i noha. Tuto skutečnost se snaží zohlednit některé klasifikace (ISO/ISPO), klinicky uznávaná hojně používaná Pappasova klasifikace postižení femuru je velmi rozsáhlá a snaží se rozčlenit jednotlivé typy především podle abnormality femuru.

Dělení femorálních defektů podle *Pappase (1983)* rozlišuje 9 typů postižení, od nejzávažnějších (typ I) po nejméně nápadné vady (typ IX), současně popisuje i přidružené deformity a v hrubých rysech naznačuje i léčení jednotlivých typů. Aitkenova klasifikace je druhá nejčastěji citovaná a klinicky významná klasifikace, zohledňuje zejména závažné typy postižení (Aitken GT, 1968). Aitkenovy typy jsou uvedeny u odpovídajících typů dle Pappase, obě klasifikace pak ukazují přehledně obrázky 6 a 7.

**Typ I:** Vrozená absence femuru – femur zcela chybí, acetabulum není vyvinuto, proximální tibia je ve výši kyčelního kloubu zdravé končetiny, chybí fibula.

**Typ II:** Proximální femorální a pánevní deficiencie – proximální polovina femuru chybí, zkrat femuru činí 70-90 %, acetabulum není vyvinuto, opožděná osifikace ischiopubické kosti, koleno má omezený pohyb, tibia i fibula je kratší, abnormality nohy. Odpovídá Aitkenovu typu D.

**Typ III:** Proximální femorální deficiencie s nekostěným spojením hlavice a diafýzy – kyčelní kloub bývá vytvořen, ale acetabulum může i chybět. Hlavice femuru je hypoplastická, později osifikuje, zkrat femuru dosahuje 45-80 %, proximální část femuru se může zužovat, kondyly femuru jsou dysplastické, zejména laterální, patella může zcela chybět, nebo je hypoplastická, lateralizovaná, koleno je nestabilní, kratší je tibia i fibula, noha většinou deformovaná. Odpovídá typu Aitken C.

**Typ IV:** Proximální femorální deficiencie s nepravidelným osteofibrozním spojením hlavice a diafýzy femuru – kyčelní kloub je vytvořen, hlavici s diafýzou spojuje nepravidelná fibroartilaginní tkáň s ostrůvky kalcifikace, zkrat femuru je 40–67 %, zkrácena tibia i fibula, nestabilní koleno, noha zmenšená, někdy s deformitou. Odpovídá Aitkenovu typu B.

**Typ V:** Deficiencie diafýzy femuru s hypoplazií proximálního i distálního femuru – zkrat dosahuje 48–85 %, zkrácena tibia i fibula, nestabilita kolena, často i závažné deformity nohy.

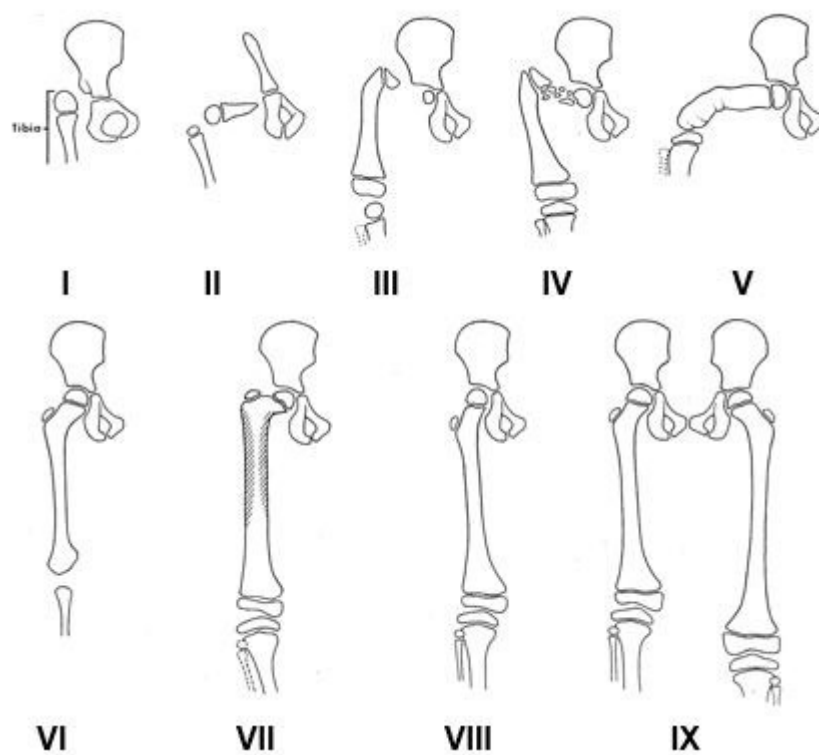
**Typ VI:** Distální femorální deficiencie – pánev, acetabulum a proximální část femuru jsou normálně vyvinuty, abnormality se nacházejí distálně od subtrochanterické oblasti. Diafýza je krátká, hypoplastická, nepravidelně vyvinutá, defektní distální femur. Zkrat femuru činí 30–60 %. Chybí patella, bérec je tvořen pouze jednou kostí, kde nelze rozlišit, zda jde o tibií nebo fibulu. Tento typ doprovází také závažné deformity nohy.

**Typ VII:** Hypoplastický femur s coxa vara a sklerotickou diafýzou – zkrat femuru dosahuje 10-50 %, coxa vara neprogreduje, proximální diafýza femuru je sklerotická, zúžená, s poruchou diferenciací dřevnaté dutiny, hypoplastický laterální kondyl femuru, hypoplastická, vysoko postavená a lateralizovaná patella, valgózní koleno, mírné zkrácení tibia i fibuly. Při výraznějším zkratu fibuly se vyskytují i závažnější deformity nohy. Odpovídá typu Aitken A.

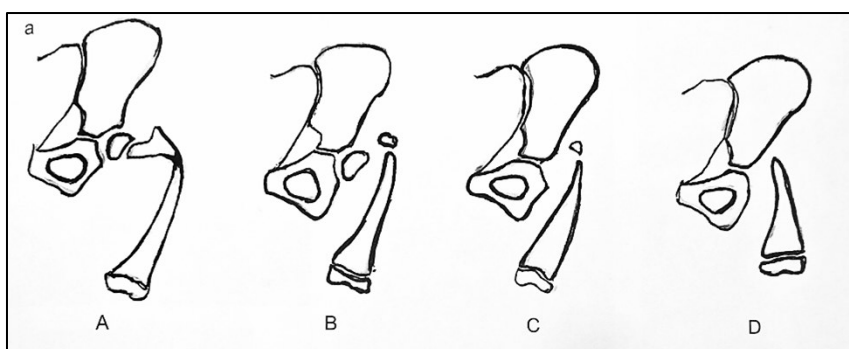
**Typ VIII:** Hypoplastický femur s coxa valga – zkrat dosahuje 10–40 %, hlavice a krček femuru bývají zmenšeny, antevertze krčku nebývá zvětšena, horizontální průběh proximální diafýzy, často bývá diafýza femuru mediálně prohnuta, laterální kondyl femuru hypoplastický, proto je výsledkem valgózní koleno, patella bývá vysoko a laterálně, variabilní zkrat tibia a fibuly s přidruženými deformitami nohy.

**Typ IX:** Hypoplastický femur s normální proporcionalitou – zkrat femuru činí 6–20 %, femur je hypoplastický, ale normálně vytvořen, typická je nestabilita kolena. Bývá přítomen i mírný zkrat tibia a fibuly. (Dungl P. et al, 2014)





*Obr. 6: Pappasova klasifikace (1983)*



*Obr. 7: Aitkenova klasifikace (1968)*

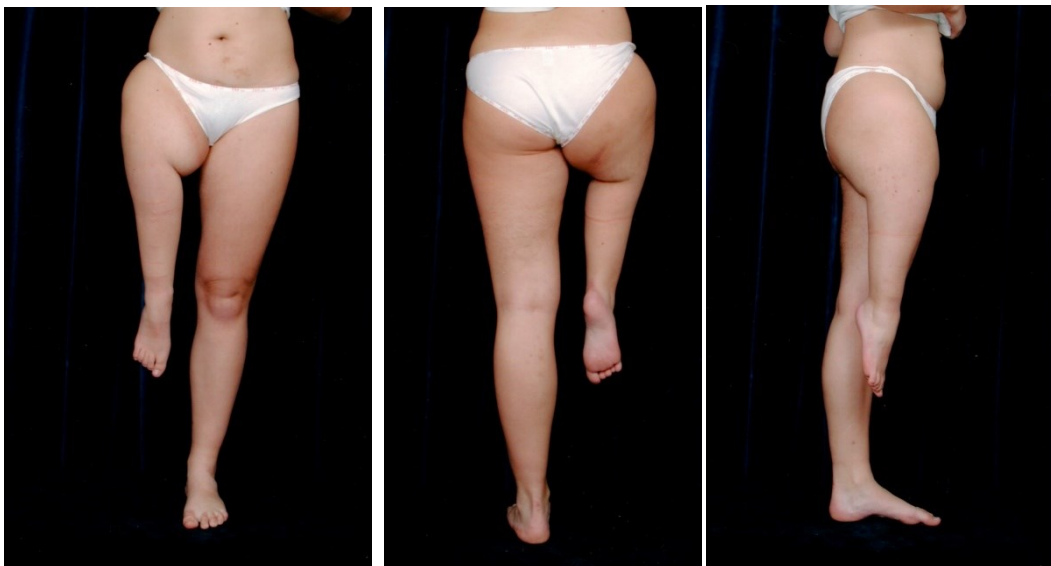


*Obr. 8: Klinický a radiologický obraz vrozeně krátkého femuru typu III dle Pappasovy klasifikace (vazivový pakloub proximálního femuru se závažným zkratem končetiny). Pětiletý pacient se zkratem levé dolní končetiny 24 cm, na rentgenovém snímku je patrná diskontinuita femuru a jako přidružená vada fibulární aplazie.*

### 3.1. Kyčelní kloub a femur

Až na nejmírnější typ postižení bývá kyčelní kloub, respektive acetabulum dysplastické. Všeobecně lze říct, že stav kyčelního kloubu předurčuje typ postižení k možné prolongační léčbě femuru. Je-li kyčelní kloub vytvořen a je stabilní, můžeme uvažovat o prolongaci femuru. Naopak u dysplastických kyčelních kloubů je nutná nejprve rekonstrukce acetabula, aby zvýšením tlaku v kyčli při prolongaci femuru nedošlo k luxaci hlavičky femuru.

U nejzávažnějších typů PFFD (Pappas I a II), je kyčelní kloub postižen tak zásadně, že nelze uvažovat o rekonstrukčních výkonech končetiny. U typu I chybí zcela femur i acetabulum, končetina je napojena na pánevní pletenec vazivově a nestabilně. U typu II bývá na zobrazovacích vyšetřeních patrný distální konec femuru, acetabulum není vyvinuto a nelze rekonstruovat. Oba typy jsou odkázány na protézování. Jednou z operačních možností u typu II jsou rotační plastiky (Van Ness), nebo operace typu „koleno pro kyčel“, u kterých pak kolenní kloub funkčně nahrazuje kyčelní. Oba výkony vyžadují vysokou erudici a technickou zdatnost operátora. Nemalý význam má i dokonalá protetická péče k zajištění dobré funkce končetiny s ortoprotézou (obr. 9, 10).



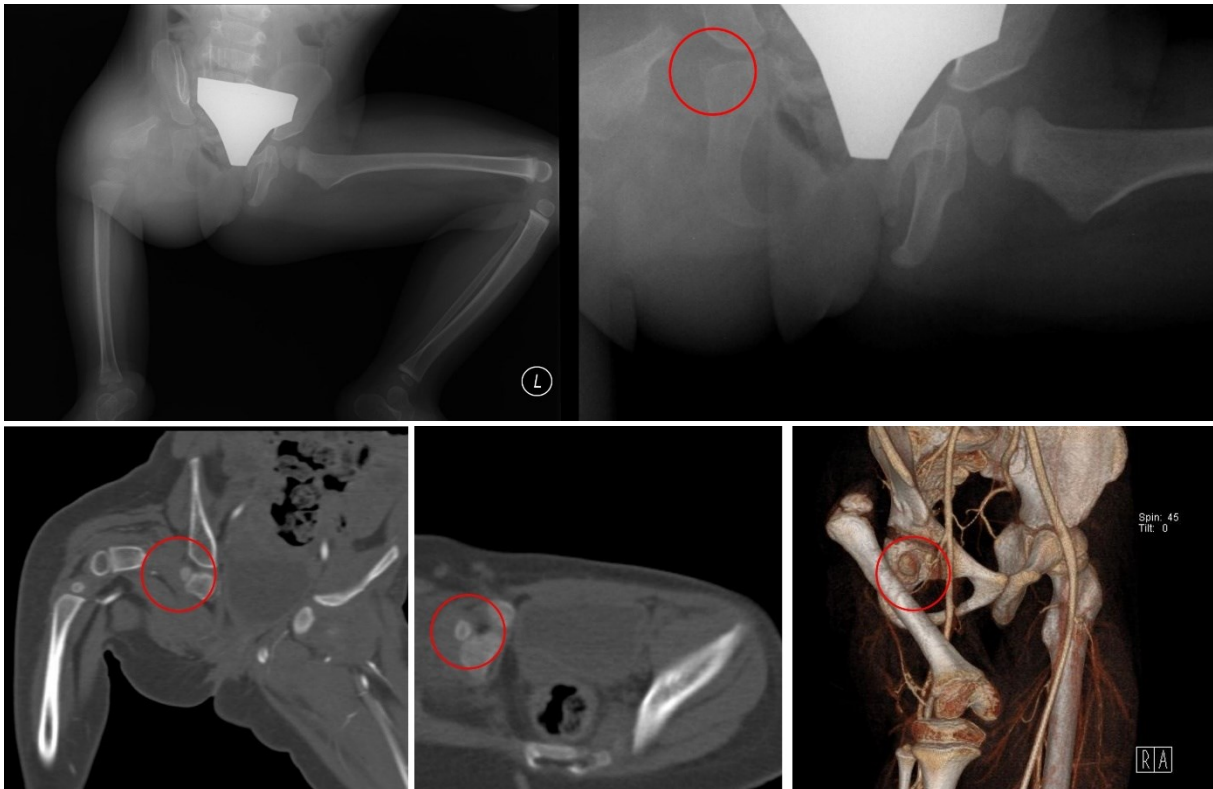
*Obr. 9: Pacientka s typem postižení femuru Pappas II a zkratem 40cm. Pohled zepředu, zezadu a z boku.*



*Obr. 10: Stejná pacientka (postižení pravého femuru Pappas II) s ortoprotézou a korekcí délky končetin pro chůzi*

U typu III je standardně postižen proximální femur fibrózním paklobem, kdy hlavice je s výrazně zkrácenou diafýzou femuru spojena vazivovou tkání. Je zřejmé, že takový segment je velmi nestabilní, a nemůže sloužit jako opora končetiny. Hlavice může být navíc v acetabulu fixována, což lze ověřit na CT vyšetření, případně artrografií (obr. 11). Pokud se

potvrdí tato skutečnost, je tento typ postižení léčen jako typ II. Pokud je však hlavice v acetabulu volně pohyblivá, dá se zvážit rekonstrukce proximálního femuru fúzí. Typ IV je velmi podobný typu III a je charakteristický chrupavčítým paklobem. U tohoto typu jsme případ fixované epifyzy nezaznamenali.



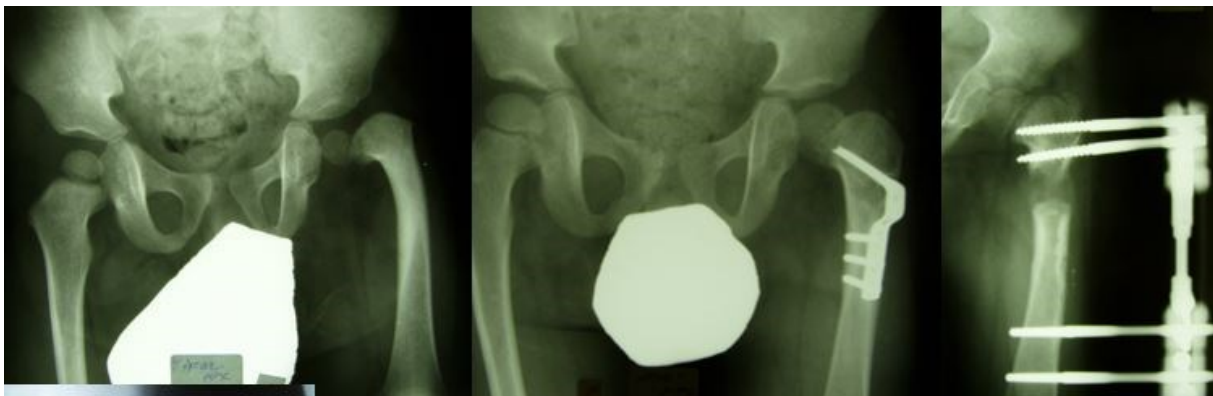
*Obr. 11: Rentgenový a CT nález u pacienta s PFFD typem III. Na CT je patrna malá fixovaná epifyza, která na rtg snímku v AP projekci není viditelná.*

Typ V a VI jsou velmi vzácné a dominuje postižení diafýzy, respektive distálního konce femuru. Kyčelní kloub je vytvořen a funkční.



*Obr. 12. Chlapec s postižením levého femuru Pappas V.*

Typ VII je charakteristický varozitou proximálního femuru, která neprogreduje a nevytváří se pakloub. Nicméně je velmi rezistentní, a i po opakovaných valgizačních osteotomiích recidivuje. Proximální diafýza bývá sklerotická a zúžená, kyčelní kloub obvykle vykazuje lehkou dysplazii, kterou lze napravit pánevní osteotomií (obr. 13). Mírná dysplazie kyčelního kloubu doprovází i některé případy typu VIII. Femur u typu VIII bývá hypoplastický, krček valgózní, hlavice často bývá v retroverzi. U typu IX nacházíme zpravidla normální acetabulum, femur fyziologického tvaru, jen proporcionálně zkrácený. Kyčelní kloub je normálně vyvinut a je stabilní.



*Obr.13: Postižení levého femuru Pappas VII s varozitou, po valgizační osteotomii a v průběhu prodloužení*

## 3.2. Kolenní kloub

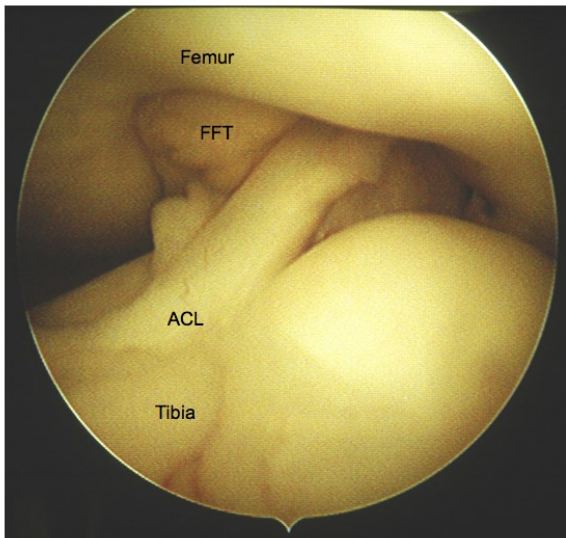
Proximální femorální fokální deficiencie je pravidelně doprovázena aplazií nebo hypoplazií fibuly a hypoplazií nebo aplazií zkřížených vazů kolenního kloubu, podobně jako jiné vrozené vady končetin. Důvod těchto nálezů může vysvětlovat tzv. teorie fibulárního vývojového pole, která vysvětluje nespécifické postižení zkřížených vazů u různých vrozených podélných defektů dolní končetiny a zahrnuje defekty pubické části pánve, proximálního femuru, patelly, přední zkřížený vaz, femorální kondyly, fibulu a různý počet paprsků nohy, talus, krychlovou kost a sekundárně i nervově cévní a svalové struktury (Lewin SO, Opitz JM, 1986; Sorge G. et al, 1995).

Diagnostika je možná jak neinvazivními metodami (speciální držené rentgenové projekce, MRI) (Johansson a Aparisi, 1983), nebo invazivně artroskopicky. V našem souboru pacientů jsme během institucionálního výzkumného záměru indikovali artroskopické vyšetření kolena jako součást jiného plánovaného výkonu, který prodloužila o 10-15 minut. Cílem bylo zjištění anomálií zkřížených vazů v souvislosti s Pappasovým typem postižení. Z nálezů byla vytvořena klasifikace, která dělí nálezy do 3 skupin podle nálezu na předním zkříženém vazů (I – normální, II – hypoplastický III – aplazie) a do 3 skupiny podle stavu zadního zkříženého vazů (A – normální, B – hypoplastický, C – aplazie) (Chomiak et al, 2010, 2012). U většiny vyšetřených pacientů chyběly vazy oba, výjimkou byl jediný pacient s přítomností obou vazů i přes závažný stupeň PFFD (Pappas IV).

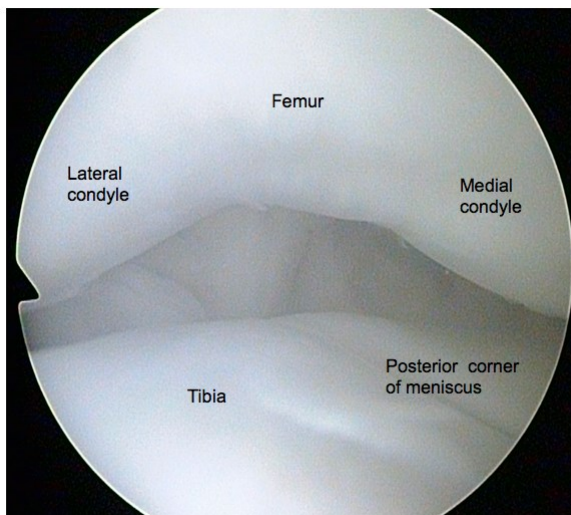
Nálezy na meniscích se v literatuře značně liší. Jsou popisovány případy hypoplazie menisků, častěji zevního, někteří autoři referují o nálezech diskoidních menisků v souvislosti s aplazií obou zkřížených vazů (Manner et al, 2006), které mají podklad v embryologických studiích vysvětlující těsně časově navazující vývoj femuru a kolenního kloubu ze společného blastému (Gardner E, O'Rahilly R, 1968; Gray DJ, Gardner E, 1950). V naší skupině pacientů vyšetřených artroskopicky jsme diskoidní meniskus nenašli ani jednou, přestože aplazie obou zkřížených vazů byla nejčastějším nálezem (obr. 14 a 15).

Kromě intraartikulárních abnormalit jsou popisovány radiologické změny kolenního kloubu, které zahrnují hypoplazii laterálního kondylu femuru a tibie, dysplazii pately a valgositu kolena. Při aplazii zkřížených vazů je radiologicky patrná zúžená interkondylická fossa, případně ji nelze vůbec diferencovat, bývají také oploštěny nebo nepřítomné výběžky

interkondylické eminence (obr. 16). Systematické zpracování rentgenologického nálezu kolenního kloubu u PFFD vypracoval Manner a spol (Manner et al, 2006).

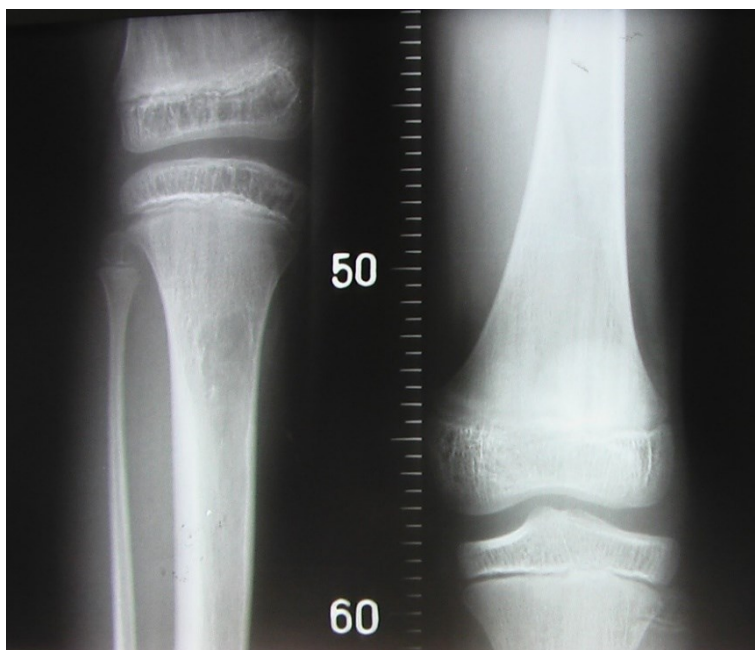


*Obr. 14: Artrokopický nález hypoplastického zkříženého vazů (ACL) a chybějícího zadního zkříženého vazů, který je nahrazen fibrozně vazivovou tkání (FFT) u pacienta s vrozeně krátkým femurem typu Pappas IX vlevo (Chomiak et al., 2012)*



*Obr. 15: Artrokopický nález aplázie zkřížených vazů pravého kolena u pacienta s PFFD typu VIII.*

*(Chomiak et al., 2012)*



*Obr. 16: Rentgenový obraz postiženého a fyziologického kolenního kloubu u pacientky s postižením Pappas III. V levé polovině snímku je zřetelná hypoplazie interkondylické eminence proximální tibie, měřítko pak vizualizuje zkrat končetiny.*

### 3.3. Bérec a hlezno

Téměř pravidelným nálezem u pacientů s PFFD je i zkrácení kostí bérce, častěji fibuly, což opět podporuje teorie fibulárního vývojového pole. Distální růstová ploténka fibuly bývá v úrovni distální růstové ploténky tibie, nebo dokonce nad ní. Zkrat fibuly je příčinou valgózního postavení nohy, sekundárního zkrácení peroneálních šlach a omezení hybnosti nohy v talo-krurálním i subtalárním kloubu. U některých pacientů může fibula zcela chybět.

Hlezenný kloub je morfologicky změněn z kladkového na kulový, tzv. „ball in socket“ joint. Klinický i radiologický obraz deformity distálního bérce při minimálních změnách na femuru (Pappas VIII a IX) pak může imponovat jako prostá hypoplazie/aplazie fibuly. U vrozených deformit dolních končetin je třeba řádně vyšetřit celou končetinu včetně pánve.



*Obr. 17: Obraz CT bérce u pacienta s pravostranným postižením Pappas VIII. Na bérce je v předozadní i bočné projekci patrný zkrat proximální, méně i distální fibuly, v bočné projekci navíc jasná talokalkaneární koalice.*



*Obr. 18: Rentgenový snímek hlezenních kloubů u pacienta s typem Pappas VIII. Vpravo typický kulovitý „ball in socket“ hlezenný kloub, vlevo fyziologicky tvarované kladkovité hlezno.*



### 3.4. Noha

Postižení nohy je další konstantní charakteristikou vady. U těžších postižení (Pappas I-VII) mohou chybět laterální paprsky nohy, pravidelně se setkáváme s nálezem talokalkaneární koalice, která je další příčinou omezení hybnosti segmentů nohy. Valgozita zadního segmentu nohy větší než  $10^\circ$  by měla být varovným klinickým příznakem možné tarzální koalice. Plantigrádní a zátěže schopná noha je po stabilním kyčelním kloubu i dle jiných autorů další podmínkou ke zvážení prolongační terapie, (Grogan et al, 1994, Choi et al, 1990, Miller a Bell 1992, Tachdjian 1990). Je tedy třeba zvážit jak morfologický, tak funkční stav nohy před zahájením terapie (obr. 19, 20).



Obr. 19



Obr. 20

*Obr. 19: CT pacienta s typem Pappas VIII. Na rekonstrukci je čtyřpaprsková noha, v bočné projekci a je zřejmá talokalkaneární koalice.*

*Obr. 20: Na rentgenovém snímku je tentýž nález u pacienta s postižením Pappas IX.*

### 3.5. Anatomie měkkých tkání u PFFD

Současné metody klasifikace posuzují postižení končetiny podle kostní abnormality, bez ohledu na měkké tkáně. Moderní zobrazovací metody, jako je magnetická rezonance (MRI), mohou pomoci objasnit anatomii měkkých tkání a jejich vzájemné vztahy ve vztahu k závažnosti postižení (Pirani et al., 1991; Huser et al., 2021).

Podle studie kanadských autorů (Pirani et al., 1991), jsou všechny svaly na postižené končetině vyvinuty, ale jsou menší než na kontralaterální zdravé straně. Výjimkou je m. obturatorius externus, který je elongovaný a jeho svalové břicho zasahuje až téměř k úponu. Tvar zmíněného svalu se mění v závislosti na typu postižení, u typu Aitken A (Pappas VII) je rovný, u typů Aitken B, C, D (Pappas IV, III, II) má tvar písmene „L“. Změna jeho tvaru může nasvědčovat tomu, že funguje jako „depressor“ proximální metafýzy femuru zabraňující teleskopickému pohybu končetiny během zátěže. M. adductor magnus směřuje více kolmo k femuru než na nepostižené straně. Změny byly zaznamenány i na m. sartorius, který je na MRI studiích hodnocen jako hypertrofický. U PFFD považují svaly za významné v podílu na stabilitě a přenosu zátěže v oblasti kyčle, kterou za normálních okolností zajišťují kostěné struktury.

Kolektiv autorů z Paley Institutu na Floridě (Huser et al., 2021) poukazuje na změnu anatomických poměrů, respektive uložení femorálního neurovaskulárního svazku vzhledem k významným anatomickým bodům. Měřili jeho vzdálenost od spina iliaca anterior superior (SIAS), spina iliaca anterior inferior (SIAI) a od trochanter minor (Tm) na postižené a nepostižené straně. Došli k závěru, že vzdálenost neurovaskulárního svazku od všech jmenovaných bodů se signifikantně liší při porovnání postižené a nepostižené strany, navíc vzdálenost od SIAI koreluje s kolodigrafickým úhlem proximálního femuru. Vzdálenost svazku od malého trochanteru je větší a od SIAI menší na postižené straně než na nepostižené. S ohledem na tyto skutečnosti je třeba šetrně volit operační přístup a předpokládat změněné prostorové uspořádání důležitých struktur.

### 3.6. Cévní zásobení dolní končetiny

Od místa bifurkace aorty ve výši 4. bederního obratle odstupuje *a. iliaca communis dextra* a *sinistra*. Po 5-7 cm průběhu se dělí ve výši bedrokyčelního skloubení na *a. iliaca interna* pro oblast pánve a *a. iliaca externa* pro dolní končetinu. *A. iliaca externa* sestupuje po mediální straně *m. psoas* a vstupuje do *lacuna vasorum*, odkud pokračuje jako *a. femoralis*. *V. iliaca externa* jde mediálně o tepny.

Femorální arterie sahá od *lig. inguinale* až po průchod do popliteální krajiny skrze *hiatus adductorius*. Zásobuje kůži přední dolní části břicha, přední úseky zevních genitálií (*a. epigastrica superficialis*, *a. circumflexa ilium superficialis*, *aa. pudendae externae*), všechny útvary stehna a kolenní kloub. Ve vzdálenosti 3-5 cm pod *lig. inguinale* odstupuje laterodorzálně velmi silná hlavní tepna pro svaly stehna *a. profunda femoris*. Jejími hlavními větvemi jsou *a. circumflexa femoris medialis* pro adduktory, zadní svaly stehna a pelvitrochanterické svaly, a také pro kyčelní kloub, kam proniká v *incisura acetabuli*.

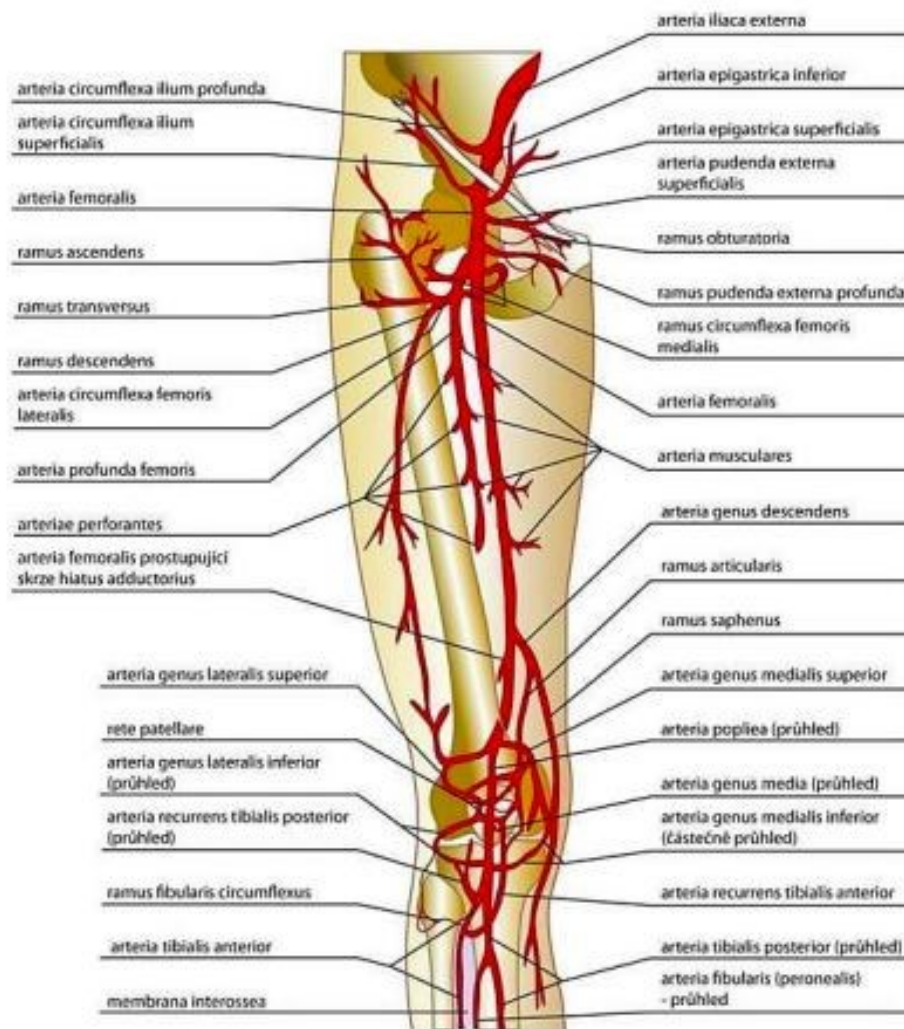
*A. circumflexa femoris lateralis* odstupuje laterálně pod *m. rectus femoris* a zásobuje všechny složky čtyřhlavého svalu. Tři konečné větve sestupné části *a. profunda femoris*, *aa. perforantes*, procházejí štěrbinami mezi úpony adduktorů podél femuru na dorzální stranu stehna. Nahrazují tak fylogeneticky starší *a. ischiadica* (z *a. glutea inferior/a. iliaca interna*), která u nižších obratlovců sloužila jako hlavní zásobující tepna dolní končetiny. Z perforátorů vystupují i *aa. nutriciae femoris*. *A. genus descendens* odstupuje v *canalis adductorius* a spolu se žílou *a. n. saphenus* prochází skrze membránu *vasoadductoria* a vstupuje do cévní sítě kolenního kloubu.

*A. poplitea* je pokračováním femorální tepny popliteální krajinou po dolní okraj *m. politeus*. Naléhá těsně na kloubní pouzdro kolenního kloubu, dorzolaterálně od ní je vena a nejvíce laterálně *n. tibialis*. *A. poplitea* zásobuje svaly popliteální jámy a okolí a kolenní kloub, do jehož *rete articularis* přispívá. Při dolním okraji *m. popliteus* se rozděluje na *a. tibialis anterior* a *a. tibialis posterior* (přímé pokračování kmene *a. poplitea*).

*A. tibialis posterior* sestupuje po svalech hluboké vrstvy bérce za vnitřní kotník a přechází do planty pod *retinaculum musculorum flexorum* doprovázena dvěma žilami. Dělí se

na dvě konečné větve pro chodidlo – a.plantaris medialis a lateralis. Zásobuje dorzální a laterální kompartment bérce a chodidlo.

A.tibialis anterior vybočuje z a.poplitea dopředu nad interoseální membránou mezi tibií a fibulu, sestupuje až na hřbet nohy. Po průchodu pod extenzorovými retinakuly se nazývá a.dorsalis pedis. A.tibialis anterior leží pod svaly předního lože, podél laterálního okraje m. tibialis anterior, doprovází jí dvě žíly. Zásobuje kolenní kloub, útvary předního bércevého kompartmentu, hřbet nohy a prstů a spojkami přispívá k zásobení chodidla (r. plantaris profundus). (Čihák, 2016)



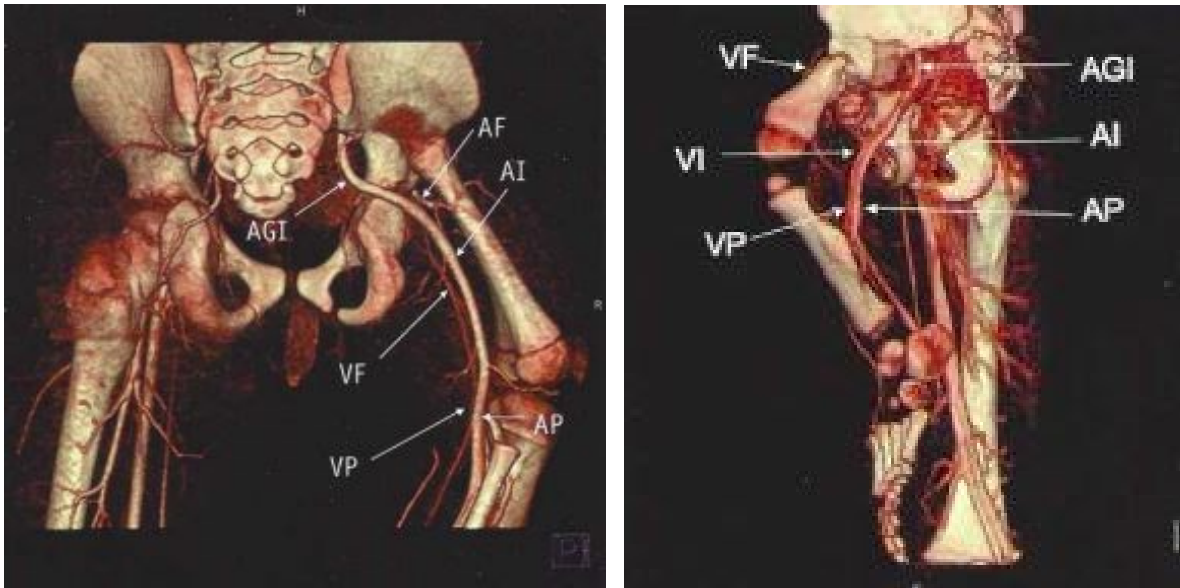
Obr. 21: Schéma anatomie tepen dolní končetiny.

(Grus T., <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/80554/>)

### 3.7. Cévní anomálie u vrozeně krátkého femuru

Při standardizaci vyšetřovacího algoritmu pacientů s PFFD bylo na základě klinické studie z let 2005-2009 zařazeno vyšetření cévního zásobení končetiny CT angiografií. U většiny pacientů, kteří podstoupili CT angiografii, byla anatomie cévního řečiště hodnocena jako normální. U dvou pacientů s typem defektu Pappas III (typ s vazivovým pakloubem proximálního femuru) a jedné pacientky s typem II byla popsána atypie cévního zásobení postižené dolní končetiny. V obou případech byla zkrácena a.femoralis, která jako konečná větev dosahovala do úrovně pakloubu proximálního femuru. Zbytek končetiny byl zásoben cestou a.iliaca interna a z ní odstupující a.glutea inferior (fylogeneticky starší a. ischiadica), která po zadní straně stehna v popliteální krajině přecházela do a.poplitea. Distální větvení již bylo typické. V jednom případě tepna probíhala v těsné blízkosti n. ischiadicus a byla doprovázena dvěma vénami. V druhém případě byla a. ischiadica bez doprovodných vén a ani těsně neprobíhala podél n. ischiadicus. Ani v jednom případě nebyly prokázány anastomózy mezi a. femoralis a a. ischiadica.

U ostatních pacientů byly zjištěny nepatrné morfologické změny cév, např. menší průměr a délka tepen zásobujících postiženou dolní končetinu, větvení a. femoralis ve vztahu k Y chrupavce. Tyto změny však nijak typicky necharakterizovaly jednotlivé skupiny postižení dle Pappase. Nicméně průměry hlavních tepen postižené končetiny byly menší než na nepostižené straně u závažnějších typů (Pappas I-IV), naopak u méně závažných typů Pappas VII-IX se průměry cév na postižené a nepostižené straně téměř nelišily. (Horák et. al. 2007, Chomiak et al. 2009, 2010)



Obr. 22 a, b: a) Obrázek CT angiografie u pacienta s PFFD typu III vpravo, pohled zezadu. Postižená končetina je zásobena cestou a. glutea inferior (AGI), která přechází do a. ischiadica (AI) a a. poplitea (AP). V. poplitea se odděluje od a. poplitea a pokračuje ventrálně jako v. femoralis (VF) na přední stranu stehna. A. femoralis (AF) zásobuje pánvi a končí na stehně. b) venózní fáze CT angiografie. Již popsané tepny dopovídají v. poplitea (VP) a v. ischiadica (VI). Ventrálně hypoplastická v. femoralis (VF).

## 4. Vyšetřovací metody

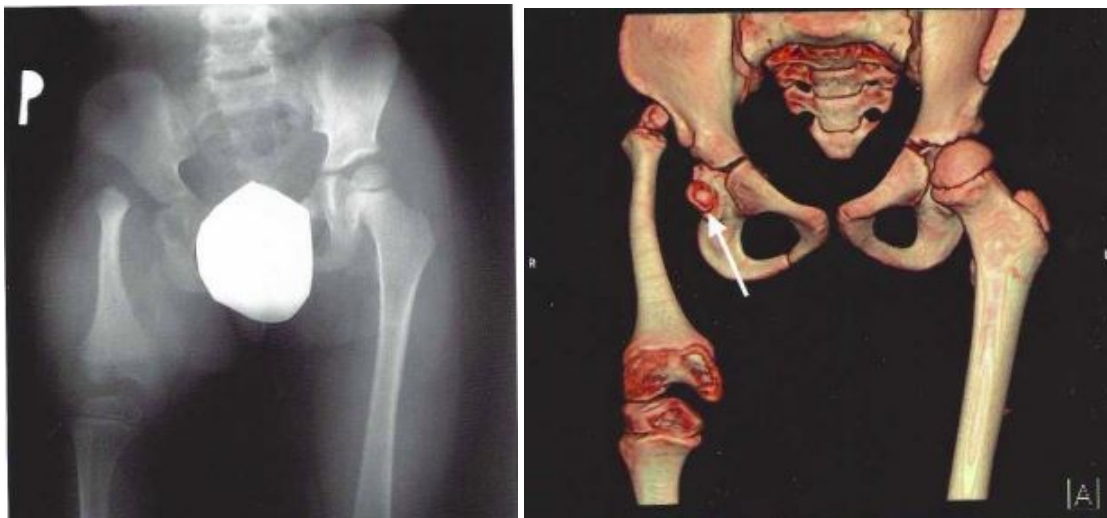
Základní vyšetřovací modalitou zůstává stále prostý rentgenový snímek. První vyšetření většina pacientů absolvuje do 3 let věku, kdy už se projeví i u méně nápadných a méně závažných případů (Pappas VII-IX) menší zkrat končetiny nebo asymetrická osová deformita. Do 1 roku věku zaevidujeme pacienty se zřejmým a závažným postižením dolní končetiny, kdy deformita a zkrat je přítomen již při narození. Na prostém skiagramu pánve a dolních končetin jsme schopni určit typ postižení dle Pappasovy klasifikace, hodnotíme stav acetabula, tvarové změny kolenního nebo hlezenného kloubu, hypoplazii kostí bérce, většinou fibuly, a významné koalice tarzálních kostí (talo-kalkaneární). Velmi obtížné je v raném věku rozlišení typů II-IV při nevyzrálém osifikačním jádru proximálního femuru.

Vzhledem k rozdílné strategii léčby je třeba objasnit situaci v oblasti kyčelního kloubu co nejdříve. Proto zařazujeme standardně v diagnostickém procesu vyšetření počítačovou tomografií (CT), v naprosté většině případů spojené s angiografií (CT angiografie). U velmi malých dětí je potřeba krátká celková anestezie, u starších stačí sedace. Vyšetření přináší cenné informace o kyčelním kloubu: 1) zda je přítomna proximální epifýza femuru v acetabulu, 2) zda je epifýza v acetabulu pohyblivá a 3) jaké je prostorové uspořádání spojení mezi epifýzou a diafýzou. CT angiografie je významná u závažnějších typů postižení (Pappas II-IV), kdy může identifikovat abnormality v cévním zásobení končetiny cestou a. glutea inferior, a je tedy důležitá v operačním plánování. Stejně tak jsou tyto informace důležité při konstrukci protéz, kdy jako opěrná část protézy slouží sedací kost, a v případě poškození vyživujících cév tlakem protézy při neexistenci anastomóz může dojít ke kritickému porušení cévního zásobení zbytku končetiny a trofickým změnám. Z téhož vyšetření je možné po subtrakci kostních struktur dostat přehled o svalech v oblasti stehna a pánve, podobně jako při vyšetření magnetickou rezonancí (MRI).

MRI studie kanadských autorů pomohly objasnit nejen instabilitu kolenního kloubu (Court a Carlouz, 1997), ale v posledních letech také anatomii měkkých tkání u PFFD, viz kapitola 2.4.5.

MRI vyšetření používáme u starších dětí k vyšetření kolenního kloubu, kde očekáváme nález hypoplazie nebo aplazie zkřížených vazů. Vzhledem k tomu, že chybění vazů a nestabilita kolena může komplikovat průběh prolongační léčby subluxací nebo luxací kolena (Ganger et al, 2011), měl by být vývoj stabilizátorů kolenního kloubu ozřejměn ještě

před zahájením prolongace. Protože zahajujeme první prolongaci kolem 5. roku věku, je nutná k MRI vyšetření kolena u malých dětí anestezie. Z toho důvodu v některých případech upřednostňujeme artroskopické vyšetření kolenního kloubu postižené končetiny, které spojujeme s jiným plánovaným operačním výkonem. Prodloužení anestezie je pak zhruba 15 minut, u malých dětí využíváme menší průměr optiky 2,7 mm.



*Obr. 23: Srovnání prostého rentgenového snímku a 3D CT rekonstrukce u šestiletého pacienta s PFFD typu III vpravo. Na rentgenovém snímku není patrna epifýza proximálního femuru, na 3D CT je jasně zobrazena.*



## 5. Strategie léčení

Léčba závažných postižení dolní končetiny spojených s výrazným zkratem je v mnoha ohledech velmi kontroverzní. Přístup k řešení takových komplexních vrozených defektů jako je PFFD se liší celosvětově z důvodů medicínských (ať již vyplývajících ze zkušeností nebo technického zabezpečení), ale i kulturních a etických. Ke zvážení je postup zcela konzervativní, spočívající v protetické péči. Zkraty do 7 cm je možné kompenzovat podražením obuvi, větší rozdíl délky končetin je třeba řešit ortoprotézou, tedy ortézou s vloženou botou (obr.10 a 24). Jako opora pro ortoprotézu slouží v takových případech sedací kost.



*Obr.24.: Ortoprotéza pouze na bérceovou část u pacientky 4 roky s typem Pappas VII vpravo. Stehenní segment je stabilní.*

Operační léčba je velmi náročná a zdlouhavá a je třeba zvážit vhodné podmínky nejen anatomické, ale i sociální. Jednou z možností jsou ablativní výkony, zejména u zásadních a výrazných zkratů končetiny s nestabilitou kyčelního kloubu, jak doporučují někteří autoři (Koman et al, 1982). Kromě délky femuru posuzují jako indikační kritérium pro prolongační terapii pelvifemorální stabilitu, kterou reprezentuje trojice parametrů: acetabulární index, index kapacity acetabula (shelf index) a dysplazie acetabula. Pokud pacient má předpoklad dosažení délky postiženého femuru přirozeným růstem více než 60% délky zdravé strany, rozdíl délky menší než 17 cm, pelvifemorální stabilita má akceptovatelné hodnoty (AI do 35°,

SI > 0,6 a dysplazie je klasifikována jako žádná nebo mírná) a noha je plantigrádní a zátěže schopná, je možné indikovat prolongační a rekonstrukční terapii. V opačném případě je indikován ablativní výkon. Toto rozhodnutí by mělo být dle autorů prezentováno do 1 roku věku dítěte. Podobnými kritérii k prolongační terapii se řídíme i na naší klinice.

Volba **rekonstrukční a prolongační operační terapie** se týká poškození typu Pappas III , IV a VII a znamená pro dítě i rodinu volbu opakovaných a častých hospitalizací s několika operačními etapami léčení během dětství.

Etapové léčení PFFD s ohledem na stabilitu kyčelního kloubu a přidružené deformity od roku 1980 vyvíjel na Ortopedické klinice FN Na Bulovce prof. MUDr. Pavel Dungl, DrSc. Na základě předchozích bohatých zkušeností s léčbou dysplazie kyčelních kloubů a jiných redukčních vad dolní končetiny (fibulární hemimelie, vrozený pakloub bérce) vypracoval léčebný plán pro pacienty s PFFD.

V prvním roce věku provedeme nutná radiografická vyšetření a klasifikujeme postižení končetiny. Mezi prvním a druhým rokem věku, při vertikalizaci dítěte, ve spolupráci s protetikem necháme zhotovit úpravu obuvi nebo bérce ortoprotézu, na které se děti překvapivě dobře naučí chodit. Po 3. roce začíná vlastní operační léčba u typů s pakloubem, tedy **Pappas III a IV**. Pokud však CT vyšetření ukáže femorální epifýzu fixovanou v acetabulu, pak i typy s pakloubem řešíme jako typ II, kde femorální epifýza zcela chybí, tedy operací „koleno pro kyčel“. Pelvifemorální distrakcí na Hoffmannově zevním fixátoru nejprve distalizujeme proximální konec diafýzy femuru pod úroveň kyčelního kloubu (1. etapa), pak následuje rekonstrukce proximálního femuru, tedy resekce pakloubu a fúze diafýzy s hlavicí (2. etapa), u typu **Pappas VII** začíná operační léčba valgizační osteotomií proximálního femuru. Pokud je zřejmá dysplazie acetabula, doplňujeme výkony na pánvi před zahájením prolongační fáze léčby, nejčastěji Salterovu pánevní osteotomii. Po zhojení fúze nebo osteotomie zahajujeme po 5. roce věku postupnou prolongaci femuru při pelvifemorální, ev. pelvi-femoro-tibiální stabilizaci k prevenci poškození hlavice femuru a prevenci subluxace kyčle nebo kolena při zvýšení tlaku v kloubech během prolongace (3. etapa). Po ukončení prodlužování a zhojení prolongátu odstraňujeme zevní fixátor a prodloužený segment stabilizujeme subkutánně podvlečenou dlahou nebo silným Kirschnerovým drátem k prevenci kontrakce prolongátu nebo jeho deformace. 4. etapa je věnována přidruženým deformitám končetiny, korigujeme osové i délkové poměry bérce, stabilizujeme nohu, rekonstruujeme hlezno. Prodloužený femur zaostává v růstu, proto je kolem 10. roku věku indikována druhá etapa prolongace a současně kontralaterálně řízené

zpomalení nebo zástava růstu, epifyzeodéza růstové ploténky distálního femuru a proximální tibie (5. etapa). V poslední fázi léčení se zaměříme na odstranění rozsáhlých jizev a uvolnění pohybu kolena, kyčle nebo hlezna, které bývají po prolongační terapii omezeny. Přehledně fáze léčby shrnuje tabulka a obrázek 25.

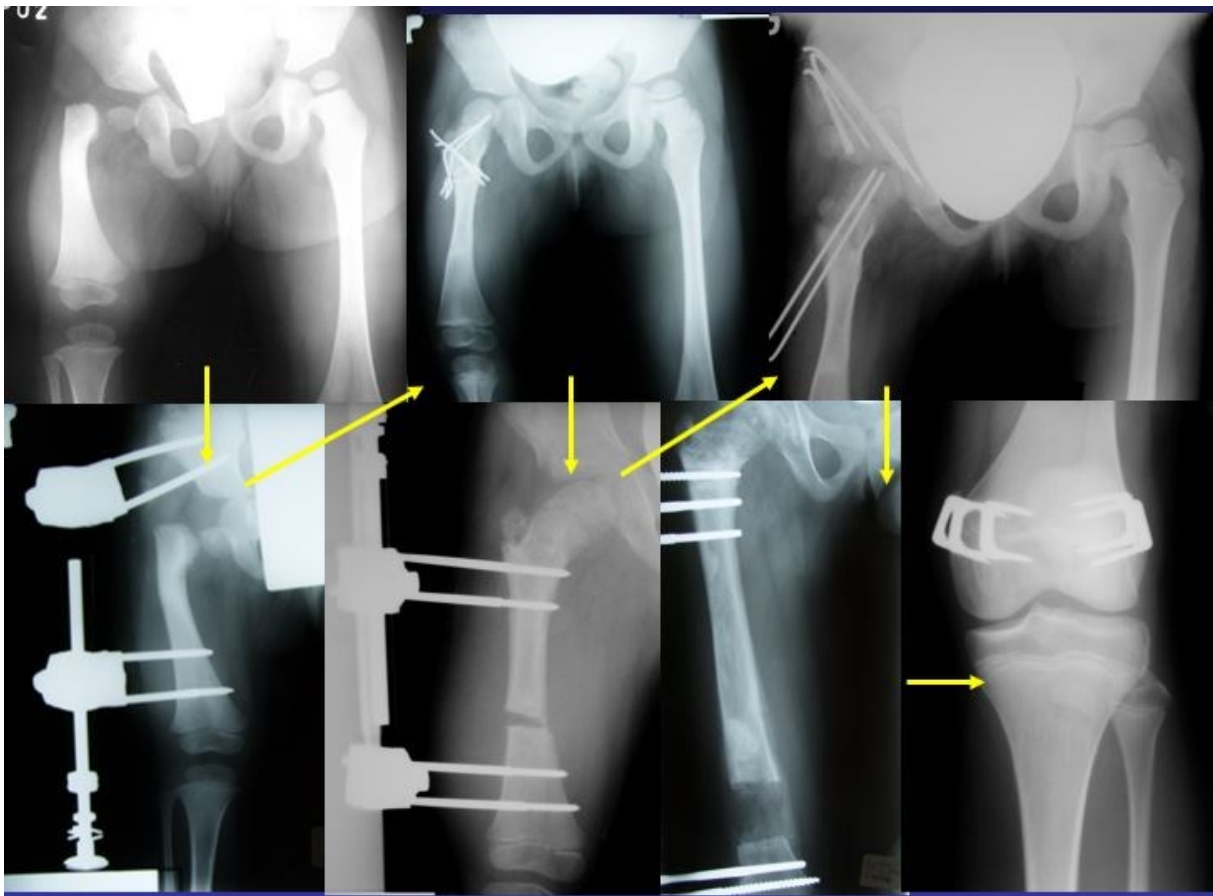
<b>Etapa</b>	<b>Výkon</b>
1.	Diagnóza, zobrazovací vyšetření, ve 3 letech longitudinální distrakce
2.	Resekce pakloubu, napojení hlavice na diafýzu
3.	Postupná prolongace rámovým zevním fixátorem se stabilizací kyčle/kolena
4.	Korekční výkony na bérce, noze
5.	Finální prolongace končetiny, kontralaterální epifyzeodéza
6.	Odstranění jizev, plastické výkony, redres kloubů

*Tabulka 1: Etapové léčení PFFD*

Pro pacienty s postižením **Pappas I** (ageneze femuru i acetabula) není jiné možné řešení než protetické. Pro postižení **Pappas II** je prolongace končetiny neproveditelná, ke zvážení jsou ablativní výkony, rotační artroplastiky (Hamel et al., 1999; Alman et al., 1995) nebo fúze zbytku femuru s pánví po její osteotomii podobné Chiariho technice (operace dle Kinga). Koleno je v sagitální rovině rotováno, plná extenze pak slouží jako flexe v kyčli, což je důležité pro sezení, plná flexe kolena pak nahrazuje extenzi kyčle. Tato technika se osvědčila při ošetřování pacientů s tímto typem na naší klinice.

**Typy Pappas VIII a IX** jsou k operačnímu řešení nejvhodnější, obvykle postačuje jedna etapa prolongace a v druhé fázi řešení přidružených vad. V této skupině pacientů jsou i nejlepší funkční výsledky léčby.

**Typy Pappas V a VI** jsou extrémně vzácné, v našem souboru je zastoupen pouze typ V jediným pacientem. Taková postižení vyžadují vždy individuální plán i řešení. (Dunzl et al., 2014; Grill F, Dunzl P, 1991, 1993).



*Obr. 25: Etapové léčení u pacienta s typem Pappas III, popis ve směru šipek: výchozí snímek – distalizace femuru v pelvi-femorálním rámu (typ Hoffmann) – resekce a fúze diafýzy a hlavice – první prolongace femuru (zevní fixátor Wagner) – rekonstrukce acetabula a profylaktické hřebování proximálního femuru – druhá prolongace – finální korekce délky končetin epifyzeodézou distálního femuru*

## 6. Experimentální část

### 6.1. Laboratorní studie

**Hypotéza číslo 1:** Profil genové exprese osteo i angiogenních faktorů je odlišný u pacientů s vrozně krátkým femurem proti kontrolním vzorkům fyziologické kostní tkáně.

#### 6.1.1. Materiál, získávání vzorků

Pro molekulární analýzu jsme se přednostně soustředili na skupinu pacientů s velmi závažnou formou defektu femuru, zvanou také vrožený pakloub femuru (skupina III a IV Pappasovy klasifikace). Výskyt těchto závažných forem je u novorozenců velmi vzácný (1-2:100000), proto je počet pacientů pro analýzu poměrně malý.

Vzorky fyziologické a patologické kostní tkáně byly odebrány během plánovaného ortopedického výkonu na základě informovaného souhlasu pacientů, respektive jejich rodičů. Tkáň pakloubu byla odebrána při plánované resekci a fúzi pakloubu u pacientů s PFFD. Vzorky fyziologické kostní tkáně pocházejí z resekcí během výkonů na noze (resekce tarzální koalice), nebo při odběru kostních štěpů z pánve u pacientů, kde důvodem k operaci byla jiná diagnóza než PFFD. Vzorek kosti (v případě kontroly), eventuálně smíšená tkáň s převahou kosti (u skupiny PFFD) velikosti cca 0,5cm<sup>3</sup> byla sterilně vložena do malé zkumavky s prezervačním médiem, které zamezuje rozkladu RNA enzymy (RNA Safer, SuperArray Bioscience Corporation) a hluboce zmrazen na -80 °C. Do laboratoře byly vzorky přepraveny v lahvi se suchým ledem a ihned po transportu zpracovány.

Po rozmrazení bylo nutné vzorek kosti mechanicky narušit, aby byl umožněn průnik a působení extrahujících činidel. K tomuto účelu jsme nejprve používali mechanický homogenizátor, později jsme používali drcení vzorku v hmoždíři po hlubokém zmrazení tekutým dusíkem. Pro izolaci RNA jsme využili technologie RNeasy Mini Kit (Qiagen) v souladu s doporučeným protokolem. Metodika kombinuje lýzu vzorku guanidin isothiokyanátem a vazbu RNA na silikátovou membránu, ze které je čistá RNA získána vymýváním (elucí). Abychom získali větší množství RNA, pokoušeli jsme se o enzymatickou lýzu vzorku před RNA izolací (enzymatický mix: elastáza, trypsin, kolagenáza II, kolagenáza

VII, kolagenáza IX). Protože tento postup k navýšení izolovaného množství nevedl, s enzymatickou lýzou jsme v laboratorním protokolu dále nepokračovali.

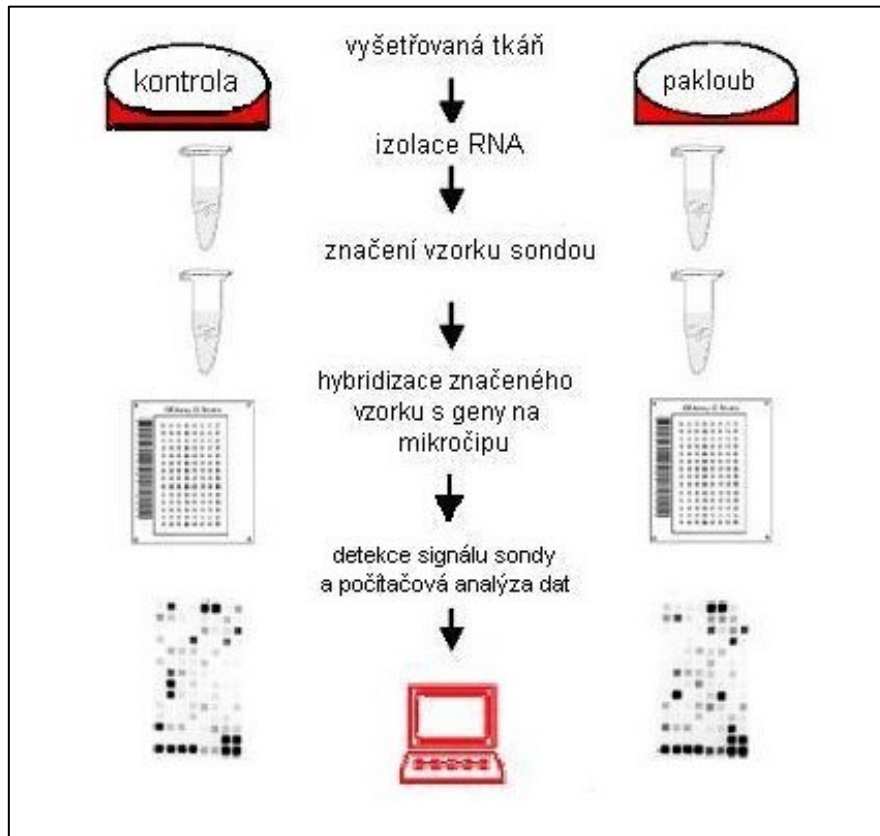
Během laboratorní studie (2008-2012) jsme vyšetřili celkem 7 vzorků pacientů s PFFD a 3 kontrolní vzorky, některé analýzy byly opakovány. Celkem jsme použili pro analýzy 13 biočipů pro osteogenní geny a 11 pro geny angiogeneze. Ze 7 pacientů PFFD bylo 5 ze skupiny s pakloubem (Pappas III, IV), po jednom vzorku jsme vyšetřovali kostní tkáň femuru u typu II a VII dle Pappase.

### 6.1.2. Metodika

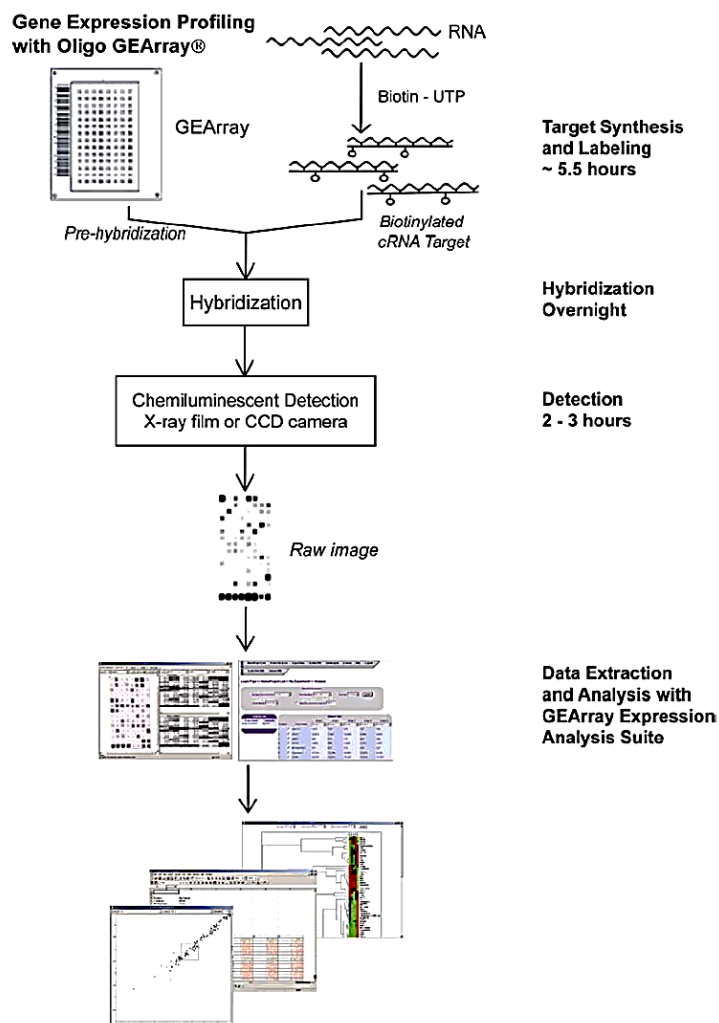
Další práce s RNA se řídila doporučeným firemním postupem SuperArray Bioscience Corporation, jejíž biočipovou technologii jsme si pro experiment vybrali. V zásadě se jedná o simultánní analýzu exprese RNA na základě imobilizace DNA sond (molekuly DNA určené na zachytávání jiných molekul na podkladě kompatibility) na membránu, na které jsou DNA sondy pravidelně uspořádané do řádků a sloupců. V dalším kroku jsou vystavené reakci s vazebně korespondujícími molekulami vzorku. Tak vznikají vazebné komplexy, které jsou po promytí následně detekovány čtecím systémem založeným na chemiluminiscenci. Systém umožňuje v jedné reakci detekovat až 113 genů osteogeneze a 113 genů angiogeneze (příloha 1 a 2).

Po izolaci RNA následovala syntéza cRNA (komplementární RNA), značení RNA biotinem a amplifikace (obr. 28). Po purifikaci vzorku amplifikované a značené RNA bylo třeba připravit, tzv. prehybridizací, biočipové membrány k samotné hybridizaci se vzorky. Po přidání vzorků k membránám do hybridizačních trubic začala hybridizační reakce, při které se na membrány v místech DNA sond navázaly komplementární části RNA, které byly v okamžiku odběru vzorku v tkáni exprimovány. Reakce probíhala přes noc v hybridizační peci při teplotě 60 °C. Po promytí byly membrány inkubovány s roztokem streptavidinu konjugovaného s alkalickou fosfatázou a následně detekován chemiluminiscenční signál generovaný reakcí CDP-star (chemiluminiscenční barvivo) s konjugátem alkalická fosfatáza-streptavidin-biotin-cRNA-biočipová membrána. Signál byl detekován na rtg filmu, který byl

naskenován a vyhodnocen softwrem GEArray Expression Analysis Suite (SuperArray). Metoda umožňuje také semikvantitativní analýzu exprimovaných genů v závislosti na intenzitě detekovaného signálu.



*Obr. 26: Schéma experimentu. Simultánně analyzujeme vzorek tkáně pakloubu a fyziologické kosti. Po přípravě RNA dle obrázku 1 přistupujeme k samotné hybridizaci. Vzorek biotinem značené RNA je přidán s reakční směsí k membráně mikročipu, na které jsou ukotveny sekvence genů osteogeneze a angiogeneze (DNA sondy). Pokud jsou ve vzorku přítomny komplementární sekvence, dojde k jejich hybridizaci na membránu. Po navázání chemiluminiscenčního barviva k hybridizovaným sekvencím lze detekovat signál na rtg filmu. Výsledné spektrum zobrazených signálů, které reprezentuje exprimované geny, je podrobena počítačové analýze.*



Obr. 27: Postup experimentu pro každý vzorek. Izolovanou RNA ze vzorku tkáně značenou biotinem jsme hybridizovali s připravenou membránou, po hybridizaci proběhla inkubace s chemiluminiscenčním barvivem a signál detekován na rtg filmu. Membrány byly naskenovány a analyzovány softwarem GEMArray Expression Analysis Suite



### 6.1.3. Laboratorní protokol

#### I. Izolace RNA (Qiagen Rneasy mini kit)

- Mražená tkáň (10mg) po rozmrazení nejprve mechanicky rozmělněna v homogenizátoru
- + 350  $\mu$ l RLT pufru (lyzační pufr před izolací RNA, součást kitu), několik sekund promíchat (příprava: 10  $\mu$ l merkaptoethanolu do 1 ml RLT, nutno připravovat čerstvý)
- rychle přelít do sterilní 1,5 ml zkumavky, centrifugace 3 min / 13000 ot/min
- supernatant slít do nové 1,5ml zkumavky + 350  $\mu$ l 70 % EtOH (ethanol), pipetou promíchat
- vše přepipetovat na silikagel, centrifugovat 15 s / 10000 ot/min,
- RNA zůstane navázána na silikagel, přidat 700  $\mu$ l RW 1, centrifuga 15 s / 10000 ot/min
- silikagel nasadíme na 2ml zkumavku, přidáme 500  $\mu$ l RPE, centrifuga 15 s / 10000 ot/min, roztok slít, znovu nasadit na 2ml zkumavku + 500  $\mu$ l RPE, centrifuga 2 min / 10000 ot/min
- po centrifugaci nasadím zkumavku se silikagelem na sterilní zkumavku s odstřiženým víčkem, centrifuga 1 min / 13000 ot. (odstranění alkoholu)
- na sterilní zkumavku dám malou se silikagelem, nakapat 20  $\mu$ l RNase free H<sub>2</sub>O (voda bez RNasy), centrifuga 1 min / 10000 ot/min
- izolovaná RNA se rozpustila ve vodě, roztok lze uskladnit při – 20 °C (lépe při - 70°C)

#### II. Syntéza cDNA

Příprava roztoků:

- a) *Popouštěcí směs* (Annealing mixture, AM): 1-4  $\mu$ l RNA + 1  $\mu$ l primer + 6-9  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (celkový objem 10  $\mu$ l)  
promixovat pipetou, krátce centrifuga, inkubace při 70 °C 10 minut, promixovat, centrifuga 2 s, ihned umístit na led.
- b) cDNA Synthesis Master Mix (SMM):

4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O + 4  $\mu$ l 5x cDNA syntetizační pufr + 1  $\mu$ l inhibitor RNasy + 1  $\mu$ l cDNA  
Synthesis Enzyme Mix (celkový objem 10  $\mu$ l)

Mix, centrifugace, led.

c) cDNA syntetizační reakce:

10  $\mu$ l Synthesis Master Mix + 10  $\mu$ l Annealing Mixture

Mix pipetou, centrifuga, inkubace 50 min. při 42 °C, pak opět mix pipetou, centrifuga, inkubace 5 min. při 37 °C.

### III. Značení a amplifikace cRNA

Příprava roztoků:

a) Amplifikační směs:

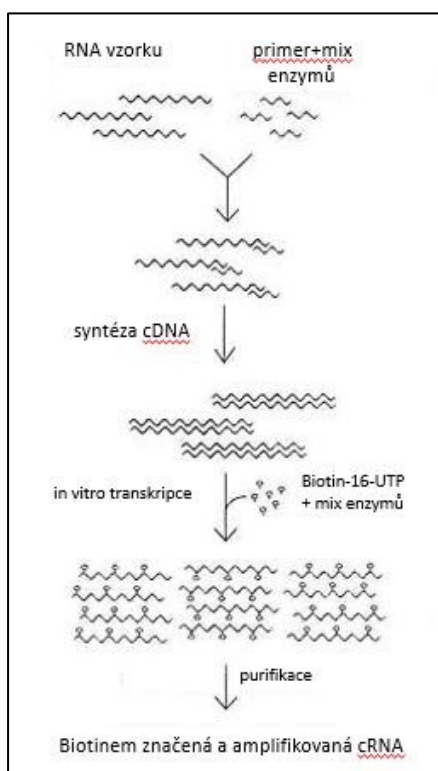
16  $\mu$ l 2,5x RNA amplifikační pufr + 2  $\mu$ l Biotin-16-UTP + 2  $\mu$ l amplifikační mix enzymů

Mix pipetou, centrifuga, inkubace 5 min. při 37 °C

b) cRNA syntetizační reakce:

20  $\mu$ l amplifikační směs + 20  $\mu$ l cDNA ze syntetizační reakce (bod II c)

Mix pipetou, centrifugace, inkubace minimálně 4 hod. při 37 °C, pokud je množství použité RNA menší než 1  $\mu$ l, pak inkubace přes noc. Pak je možné vzorek uchovat při -20 °C)



Obr. 28: Postup amplifikace a značení RNA biotinem. RNA izolovaná ze vzorku se smíchá se směsí enzymů a primerů, uloží do termocykleru, kde po několika hodinách reverzní transkripce proběhla syntéza cDNA. K získanému materiálu je přidán biotin s reakční směsí enzymů a v další několikahodinové reakci probíhá transkripce DNA do RNA, amplifikace RNA a její označení biotinem. Biotin se „zabuduje“ do struktury RNA tím, že je navázán na uridin (analog timidinu), který se páruje s adeninem (základní stavební prvky DNA a RNA).

#### **IV. Purifikace cRNA**

- ke vzorku cRNA (40 µl) přidat 60 µl H<sub>2</sub>O, schladit na ledu
- přidat 350 µl vazebného pufru, promixovat pipetou
- přidat 350 µl 100 % ethanolu, promixovat pipetou, naplnit do centrifugační kolonky, centrifuga 30 s / 8000 ot/min, roztok slít
- na kolonku přidat 200 µl vymývacího pufru, centrifuga 3 min / 11000 ot/min
- kolonku nasadíme do nové sterilní zkumavky, přidáme 50 µl H<sub>2</sub>O (při pokojové teplotě), inkubace 2 min., centrifuga 1 min / 8000 ot/min
- vzorek je pak možno uchovat v -20 °C

#### **V. Prehybridizace**

- Do hybridizační trubice s detekční membránou aplikujeme 5ml vody na 5 minut
- Předehřejeme hybridizační roztok (GEAhyb solution) na 60 °C a promícháme
- Z trubice vylijeme vodu, aplikujeme 2ml předehřátého hybridizačního roztoku
- Malé hybridizační trubice s detekčními membránami vložíme do skleněné hybridizační trubice a umístíme do hybridizační pece na 2 h při 60 °C a otáčení 5-10 ot/min

#### **VI. Hybridizace**

Cílový hybridizační mix:

10-50 µl biotinem značené cRNA + 750 µl GEA hybridizačního roztoku

Dobře promíchat, ponechat při 60 °C

- Prehybridizační medium vylejeme z trubice a přidáme hybridizační mix
- Hybridizace probíhá přes noc při 60 °C a otáčení 5–10 ot/min

## VII. Promývání

Promývací roztok č. 1: 10ml 20x SSC + 5ml 20 % SDS + 85ml H<sub>2</sub>O

Promývací roztok č. 2: 0,5ml 20x SSC + 2,5ml 20 % SDS + 97ml H<sub>2</sub>O

- Oba roztoky přehřejeme na 60 °C
- Cílový hybridizační mix slijeme z hybridizační trubice do zkumavky, uchováme při -20 °C
- Do hybridizační trubice k membráně přidáme 5ml promývacího roztoku č. 1, promícháme na vortexu a umístíme do hybridizační pece na 15 min. při 60 °C a 20-30 ot/min.
- Vylejeme promývací roztok č. 1 a přidáme 5ml promývacího roztoku č. 2, promícháme na vortexu a umístíme do hybridizační pece na 5 min\* při 60 °C a 20-30 ot/min

Pozn: \* výrobce doporučuje inkubaci s vymývacím roztokem č. 2 na 15 min, ale pro zvýraznění hybridizačních produktů jsme dobu promývání zkrátili na 5 minut.

- Po působení promývací roztok č. 2 vylejeme, uzavřeme hybridizační trubici, aby membrána nevyschla a necháme vychladnout na pokojovou teplotu.

## VIII. Detekce

Princip detekce hybridizačních produktů na membráně je chemiluminiscence.

- Zastavení oligo GEMArray: 2ml blokujičho roztoku Q (GEA blocking solution) přidáme do hybridizační trubice a krátce mixujeme.
- Inkubujeme 40 min při otáčení 20-30 ot/min.
- Navázání alkalické fosfatázy konjugované se streptavidinem:  
Roztoky: Pufr F: 6,4ml 5x pufr F + 25,6 ml H<sub>2</sub>O

AP-SA pufr: 2 µl AP-SA (alkalická fosfatáza-streptavidin) + 16 ml pufr F

- Z trubice vylejeme blokujič roztok Q, přidáme 2ml AP-SA pufru a krátce promícháme
- Inkubace přesně 10 min při otáčení 5-10 ot/min
- Celkem 4x promyjeme membránu 4ml pufru F, á 5 min při 5-10 ot/min

- 2x promyjeme membránu 3ml pufru G
- Přidáme 1ml CDP-star (chemiluminiscenční barvivo) do hybridizační trubice s membránou, inkubujeme při pokojové teplotě v hybridizační peci při 2-5 ot/min
- Membránu vyjmeme z trubice, necháme okapat přebytečný roztok a zabalíme do folie.

#### **IX. Expozice, skenování**

- Exponujeme 1-2 min na rentgenový film
- Skenujeme do formátu JPEG nebo TIFF

#### **X. Počítačová analýza dat**

[www.superarray.com/support\\_software.php](http://www.superarray.com/support_software.php)

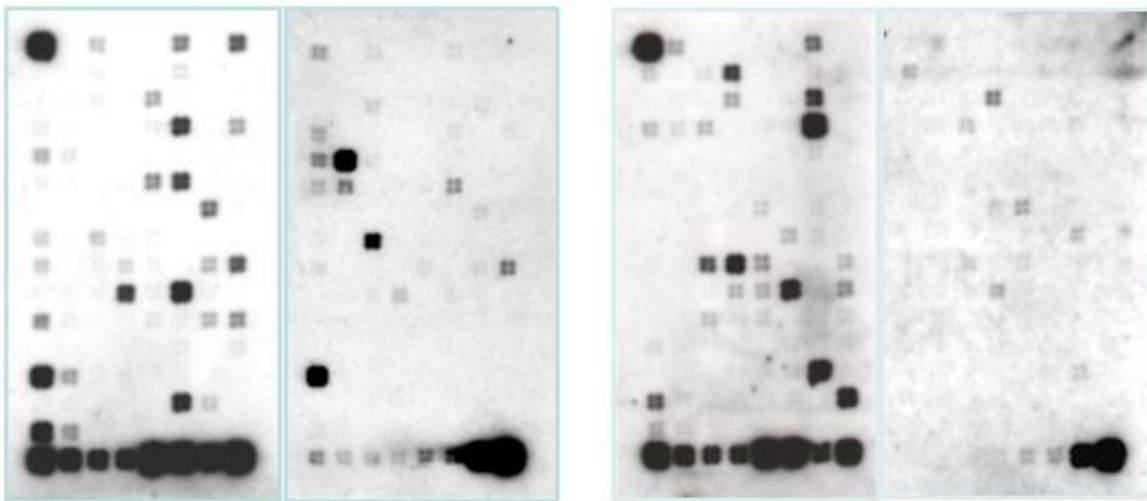
- Semikvantitativní analýza genové exprese osteogenních i angiogenních genů v různých grafických výstupech

### **6.1.4. Výsledky**

Spektrum detekovaných signálů reprezentujících exprimované geny bylo velmi různorodé. Některé analýzy selhaly z důvodu malého množství izolované RNA, proto byly opakovány s novým vzorkem. Přesto se potvrdil náš počáteční předpoklad, že množství i zastoupení genů budou odlišné ve fyziologické tkáni v porovnání s vývojově vadnou kostní tkání od pacienta s PFFD. Všeobecně bylo detekováno tedy i exprimováno méně genů v patologické kosti než ve fyziologickém vzorku. U nejreprezentativnější dvojice biočipů byl procentuální rozdíl v prezentovaných genech osteogeneze 35 % u kontrolního vzorku proti 26 % u tkáně PFFD, u angiogenních 33 % exprimovaných ve fyziologickém vzorku proti 16 % patologického vzorku. (obr. 29 a, b)

Softwarem byla vyhodnocena zvýšená exprese (overexpression) u některých genů osteogeneze v patologické kostní tkáni proti kontrolnímu vzorku. Byly to gen pro kalcitoninový receptor, kolagen XII, kolagen I podj.alfa 2, kolagen II, kolagen IX, FGFR2, fibronectin a integrin. Naopak některé geny vykazovaly sníženou expresi (underexpression) u tkáně pacienta s PFFD: gen pro annexin A5, kolagen XVIII podj. alfa1, kolagen I podj.alfa1, katepsin K, FGFR1, FGFR3, IGF2, VEGFB, VEGFC.

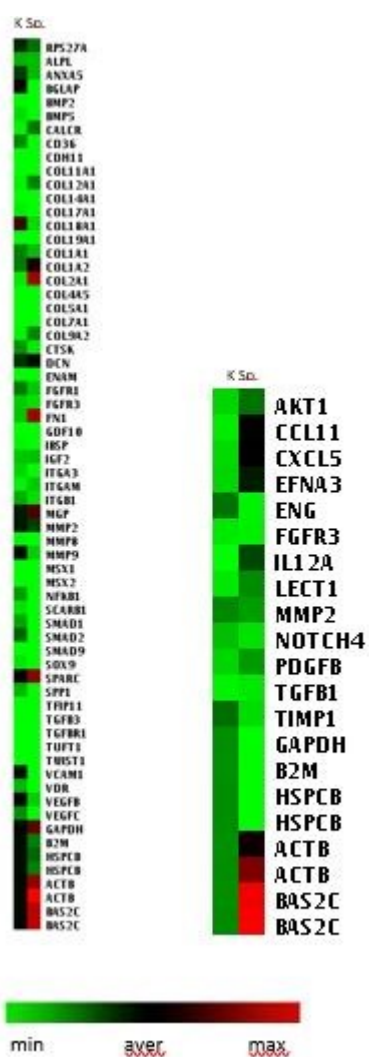
Ve skupině genů angiogeneze byl dominantní rozdíl v množství exprimovaných genů, kdy v patologickém vzorku jich bylo významně méně. Po počítačovém vyhodnocení čipů jsme zjistili absenci některých genů ve vzorcích pacientů s PFFD, které naopak byly exprimovány v kosti fyziologické. Jsou to: VEGFB, VEGFC, ECGF 1, a dále geny kódující jiné angiogenní růstové faktory a receptory (např. ANPEP, LAMA5, PDGFA), proteázy a inhibitory (PECAM 1, PF4), transkripční faktory (PTEN, PTGS1) nebo adhezivní molekuly (CDH5, COL18A1, LAMA5) (obr. 18). Přehled genů zastoupených více či méně u vzorků pacientů s PFFD v porovnání s kontrolními vzorky uvádí tabulka XY a fotografie mikročipů pacienta s PFFD v porovnání s kontrolním vzorkem (obr. 29 a, b).



Obr. 29 a

Obr. 29 b

Výsledek biočipové analýzy u kontrolního vzorku fyziologické kosti (levý z každé dvojice) a pacienta s PFFD (pravý z každé dvojice). Na obrázku 29 a) jsou výsledky exprese osteogenních faktorů, 29 b) angiogenních faktorů. Na biočipech pacientů s PFFD je patrné méně zachycených chemiluminiscenčních signálů, což vyjadřuje menší množství exprimovaných genů angiogeneze i osteogeneze a potvrzuje očekávaný rozdíl genové exprese.



Obr. 30. Semikvantitativní analýza spektra exprimovaných genů. V zobrazeném páru sloupců je kontrolní vzorek prezentován vlevo; vzorek pacienta s PFFD napravo. Pár sloupců vlevo zobrazuje spektrum exprimovaných genů osteogeneze, kde výrazněji exprimované geny zastupují „nevyzrálou“ kost s převahou genů pro kolagen II, kolagen XII, kolagen IX, kalcitoninový receptor, FGFR2, fibronektin a integrin. Mezi méně exprimované geny patří geny vztahující se ke stimulaci angiogeneze (VEGFB, VEGFC, FGFR1, FGFR3), geny pro kolagen I podjednotku alfa 1, a z dalších například geny pro kathepsin K, receptor vitamínu D, annexin A5. Barevná škála symbolizuje semikvantitativní množství exprimovaných genů dle připojené legendy.

Tabulka 2: Přehled exprimovaných genů osteogeneze a angiogeneze u vzorků pacientů s PFFD v porovnání s kontrolou. V prvním sloupci (osteo +) jsou geny osteogeneze se silnější expresí než u kontrolních vzorků, druhý sloupec (osteo -) prezentuje geny s menší expresí. Ve sloupci „angio +“ jsou geny angiogeneze více prezentované u pacientů s PFFD, poslední sloupec naopak ukazuje geny, které u pacientů s PFFD chyběly v expresním profilu angiogeneze u PFFD kompletně.

	osteo -	angio +	angio A
CALCR	ANXA5	CCL11	VEGFB
COL12A1	BGLAP	CXCL5	VEGFC
COL1A2	COL18A1	EFNA3	ECGF1
COL2A1	COL1A1	IL12A	ANPEP
COL9A2	CTSK	PDGFB	LAMA5
FGFR2	FGFR1		PDGFA
FN1	FGFR3		PECAM1
ITGAM	IGF2		PF4
	ITGA3		PTEN
	ITGB1		PTGS1
	MMP2		CDH5
	MMP8		COL18A1
	MMP9		
	VEGFB		

### 6.1.5. Diskuse

Během experimentů jsme zaznamenali některé komplikace. Jedním z nejzávažnějších problémů bylo velmi malé množství izolované RNA. Důvody malého množství RNA mohou být rozličné – degradace RNA již při odběru, poškození v rámci zpracování (rozmrzáni a homogenizace, opakované zmrazení dusíkem), chyba při prehybridizaci, či samotné detekci apod. Někdy i po amplifikaci a zakoncentrování vzorku bylo množství RNA v reakci na dolní hranici doporučené protokolem experimentu. U jednoho z pacientů nebyl ani dostatek materiálu k analýze obou skupin genů. Snažili jsme se zvýšit výtěžnost izolace RNA z tkání využitím enzymatické lýzy mechanicky zpracovaného vzorku, před samotnou izolací RNA, avšak množství získané tímto krokem nebylo významně vyšší, proto jsme od tohoto postupu upustili.

Bohužel se nám nepodařilo u analyzovaných vzorků identifikovat jednoznačné a stabilní rozdíly v expresi angio a osteogenních genů, které by bylo možné potvrdit jinou laboratorní metodou, například imunohistochemicky, a nastínit patologický vzorec genové exprese u postižení vývoje femuru. To může být mimo jiné způsobeno nesourodým buněčným zastoupením v kostní tkáni pakloubu, kde mohou v různé míře převyšovat zastoupení kostních buněk chondrocyty a fibrocyty, případně jiné minoritní buněčné typy.

Možností většího výtěžku RNA bylo založení tkáňových kultur osteoblastů. Tímto způsobem bylo možné získat nejen větší množství RNA z namnožených buněk, ale zajistit i buněčně specifickou RNA jednotlivých typů buněk zastoupených v odebraném vzorku (osteoblasty, chondroblasty, fibroblasty aj.). Po detekci exprese genů z tkáňově specifické RNA by byly rozdíly zjištěné analýzou buněčného mixu pakloubu buď potvrzeny nebo jednoznačně vyvráceny. Podařilo se nám založit tkáňovou kulturu fyziologických osteoblastů k zavedení a osvojení metodiky. Bohužel pro nedostatek klinického materiálu již nebyla další možnost k založení tkáňové kultury ze vzorku pacienta s PFFD. Metodu tkáňových kultur jsme tedy nemohli rutinně zavést do protokolu. Tato metoda zůstává dále v repertoáru pro další experimenty.

Téma osteogenních mechanismů patologické kostní tkáně jako je pakloub u vrozeň krátkého femuru, ale i fyziologické kostní tkáně, se nám v soupisu světové literatury nepodařilo zachytit. Nemáme tedy žádný odkaz, na který by bylo možno navázat a také s ním



konfrontovat naše vlastní poznatky. Je proto nutné brát naši studii jako pilotní, která byt' má ambiciózní cíle, trpí nedostatky prvotiny. Hodnocení informací z našich experimentů o rozdílech v osteo i angiogenezi u pacientů s PFFD v porovnání s fyziologickými vzorky kostí je zejména z tohoto ohledu velmi obtížné. Vzhledem k tomu, že nyní nemůžeme navázat na naše analýzy a pokračovat ve výzkumu, musíme naše závěry omezit na tvrzení ve formě úvah o možných souvislostech našich výsledků s klinickými důsledky. Je nutné naši hypotézu potvrdit v budoucnu dalšími experimenty (např. imunohistochemicky, proteomickou analýzou, tkáňově specifickou analýzou RNA).

V souladu s naším primárním očekáváním se v tkáni pakloubu exprimovalo méně genů obou studovaných procesů než ve vzorku fyziologickém. Nabízí se otázka, zda jde o reálné snížení genové exprese osteogenních i angiogenních faktorů, nebo zda na pozadí menšího množství exprimovaných genů může být vyšší zastoupení jiných buněčných typů (chondroblasty, fibroblasty, myoblasty) v tkáni pakloubu. Tuto skutečnost by bylo možné potvrdit po vyšetření buněčně specifické RNA získané z tkáňových kultur jednotlivých buněčných typů.

Celkově jsme u vzorků pacientů s PFFD zaznamenali menší počet exprimovaných genů angiogeneze. Možné vysvětlení můžeme hledat v anomálii cévního zásobení postižené končetiny pacientů s PFFD, které u tří pacientů potvrdila CT angiografie (Chomiak et al, 2010, 2012).

Většina pacientů s PFFD vykazuje neobvyklé cévní změny na postižené končetině, zahrnující zmenšení průměru a délky artérií v kontrastu s nepostiženou, kontralaterální končetinou. Průměr artérií byl výrazněji redukován u pacientů se závažnějšími formami PFFD. Na druhou stranu nebyly objeveny žádné cévní abnormality specifické pro každý typ PFFD (dle Pappasovy klasifikace). Topograficko-anatomické změny cévního zásobení končetiny byly nalezeny pouze u tří pacientů s PFFD. U těchto pacientů byla hlavní zásobující arterií končetiny a. glutea inferior (větev z a. iliaca interna), pokračující jako doprovázející arterie n. ischiadicus a formující popliteální arterii jako hlavní kmen zásobující distální část končetiny. Tyto rozdíly v cévním zásobení mohou být přisouzeny přetrvávajícímu embryonálnímu vzorci cévního zásobení dolní končetiny. Přesto otázka „proč?“ zůstává nezodpovězena. Co je primární: kostní nebo cévní abnormalita? Je příčina lokální nebo systémová? Je důvod mechanický, genetický nebo jiný?

Primární chyba v cévním zásobení proximálního femuru v místě pakloubu může být příčinou toho, proč důležité angiogenní faktory důležité pro osteogenezi nejsou „dopraveny“ do místa vyvíjející se kosti. Naopak víme, že některé osteogenní faktory jsou nezbytné v indukci těch angiogenních.

Ze studií na kmenových buňkách je známo, že VEGF hraje důležitou roli v kostní tvorbě indukovanou BMP-4 (Peng et al, 2002; Qi et al, 2003). VEGF se podílí na kostním růstu v procesu enchondrální osifikace. Zablokování VEGF vede ke snížení tvorby trabekulární kosti v růstové ploténce sekundárně po snížení invaze krevních cév a zhoršení resorpce chrupavky (Peng et al, 2002).

Experimentální studie na myších (Zelzer et al, 2002, 2004) souhlasně potvrzují 2 důležité funkce VEGFA pro tvorbu kosti. Ta první je v časném i pozdním stadiu vaskularizace chrupavky, druhá je zásadní pro přežití chondrocytů, kdy nedostatek VEGFA je příčinou masivní buněčné smrti chondrocytů během enchondrální osifikace. Většina skeletu se vyvíjí právě tímto procesem. Mesenchymální buňky se diferencují v chondrocyty, které proliferují a vytvářejí chrupavčité modely kostí. Od centra chrupavčitého základu chondrocyty přestávají proliferovat a postmitotické buňky hypertrofují. Následuje invaze cév, osteoklastů a dalších mesenchymálních buněk z perichondria do chrupavčitého základu, který narušují (erodují) a je nahrazen kostní dřeví a trabekulární kostí v tzv. primárních osifikačních centrech (Karsenty et al, 1999; Olsen et al, 2000). VEGFA je tak důležitý regulátor angiogeneze během enchondrální osifikace. Inhibice VEGFA zamezuje invazi cév do hypertrofické zóny růstové ploténky dlouhých kostí a je příčinou narušení tvorby trabekulární kosti a rozšířením hypertrofické zóny. Akumulace terminálně diferencovaných chondrocytů v růstových ploténkách naznačuje redukci cévní novotvorby a zpomalení odstraňování chrupavky během osifikace.

Souvislosti mezi procesy angiogeneze a osteogeneze velmi podrobně analyzují na univerzitě ve Stanfordu (Saadeh et al, 2000). Další prokázanou souvislostí mezi angiogenními a osteogenními faktory je indukční vliv FGF2 na osteoblasty, které pak produkují jak VEGF, tak BMP2 (Zelzer et al, 2002). Podobné závěry prezentuje Farhadi a kol. (2005), kteří při práci s lidskými kmenovými buňkami in vitro sledovali up-regulaci BMP-2, TGF beta 1 a VEGF indukovanou FGF-2.

Zajímavou studii publikovali autoři Stem Cell Institutu v Minnesotě (Qi et al, 2003), kteří studovali diferenciaci lidských mezodermálních progenitorových buněk in vitro. Po 7

dnech kultivace bylo možné na diferencovaných osteoblastech imunohistochemicky detekovat osteokalcin a kolagen typu I, ale nikoli kolagen typu II. Naopak v kultuře diferencovaných chondroblastů imunohistochemie ukázala přítomnost kolagenu typu II a agrekanu, ale osteokalcin ani kolagen typu I detekovány nebyly.

V souladu s výše zmíněnými fakty jsme i v našich vzorcích zaznamenali nižší expresi kolagenu typu I ve tkáni pakloubu oproti fyziologické kosti, zatímco exprese kolagenu typu II byla vyšší. To ukazuje na vyšší podíl chrupavčitých elementů v pakloubu a s tím spojenou redukci mechanické odolnosti. Kolagen typu II je také považován za marker klidových a proliferujících chondrocytů (Zelzer et al, 2002, 2004). Jeho vyšší podíl může naznačovat, že v buňkách vzorků pacientů PFFD nedochází k diferenciaci a hypertrofii chondrocytů, která předchází samotné osifikaci.

## 6.2. Klinická část

**Hypotéza číslo 2:** Hojení prolongátu a jeho regenerace je u pacientů s vrozeně krátkým femurem delší než u zdravých fyziologických kostí.

### 6.2.1. Prolongace femuru u pacientů s PFFD

Prolongace končetin jsou výkony s nejvyšším počtem možných komplikací, a dokonce i u idiopatických a poúrazových zkratů provázejí významné procento pacientů (Jochymek et al, 2009; Grill a Dungl, 1991). U vrozených vad pohybového systému jako je vrozený zkrat femuru je situace ještě složitější, daná existencí anomálií měkkých tkání (Pirani et al, 1991; Huser et al, 2021), alterací cévního zásobení (Chomiak et et al, 2009, 2010; Horák et al,2007), nestabilitou kyčelního kloubu při dysplazii acetabula, tvarovými změnami proximálního femuru (zevně-rotací postavení končetiny při retroverzi femuru), nestabilitou kolena při hypoplazii nebo aplazii zkřížených vazů. Všechny tyto faktory ovlivňují průběh i výsledek prolongace. Mezi časté komplikace patří kontraktury kloubů a dislokace na obou koncích prolongovaného segmentu (u PFFD tedy kyčel i koleno), osová deviace končetiny, opožděná konsolidace prolongátu, refraktury, či infekce kolem drátů nebo hřebů zevního fixátoru. Při etapovém léčení závažných stupňů femorální deficiencie bývá prolongace dlouhých kostí i několikrát opakována, protože zisk a hojení regenerátu je biologicky a mechanicky limitováno. Při prolongacích dlouhých kostí u pacientů s vrozenými vadami jsme si všimli zvýšeného počtu komplikací, oproti pacientům, kteří prolongaci podstoupili z jiného důvodu, např. s cílem vyrovnání končetin po zlomeninách.

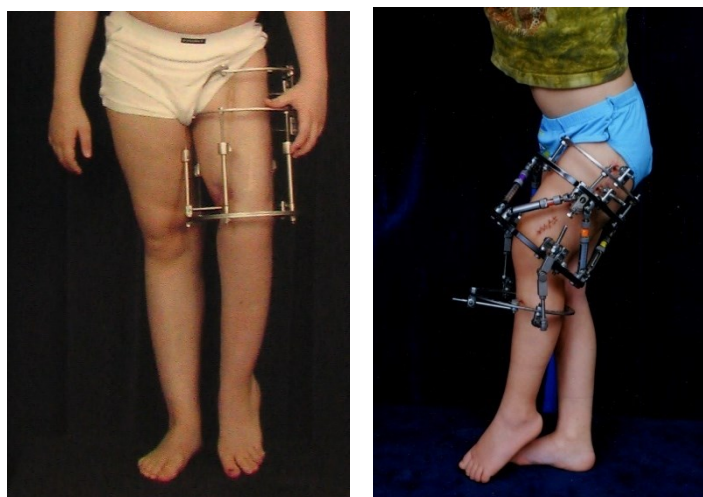
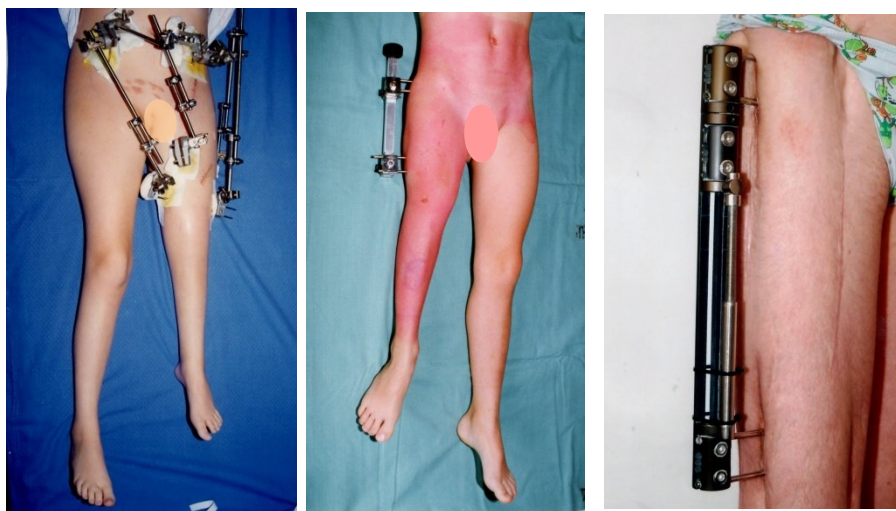
V souvislosti s nálezem anomálního cévního zásobení končetiny u některých pacientů s PFFD cestou a. iliaca interna, její rudimentární větvi a. ischiadica, menším průměrem cév u složitějších typů defektu femuru, byla vyslovena hypotéza horšího, respektive opožděného, hojení prolongátu u pacientů s PFFD ve srovnání s pacienty bez vrozené skeletální vady. Také nás zajímalo, zda bude souvislost mezi stupněm postižení a délkou hojení kosti, případně zda doba mezi opakovanými prolongacemi ovlivňuje rychlost hojení.

Dalším podpůrným nálezem k této hypotéze byla analýza genové exprese angiogenních faktorů, jejichž vliv je na hojení kosti již znám. Výsledky jsou uvedeny v části laboratorní.

## 6.2.2. Technika prolongace kostí

K prolongaci dlouhých kostí končetin využíváme metodu tzv. postupné kalotaxe. Po přerušení kortikalis (kortikotomii) v oblasti distální metadiafýzy femuru stabilizujeme femur v zevním rámu (zevním fixátoru). V našem souboru pacientů se v průběhu let používaly různé typy fixátorů a jejich použití se během léčby různě kombinuje dle nutnosti přemostění nestabilních kloubů.

1. Hoffmannův zevní fixátor – k pelvi-femorální nebo pelvi-femoro-tibiální stabilizaci během prolongace
2. Wagnerův jednorovinný zevní fixátor
3. Jednorovinný zevní fixátor Orthofix
4. Ilizarovův kruhový zevní fixátor
5. Taylor Spatial Frame (TSF) – zevní fixátor s možností korekce deformity ve 3 rovinách s možností detailního programu korekce připraveného počítačovým programem na základě analýzy deformity.



*Obr. 31: Zevní fixátory používané k prolongaci femuru u PFFD  
a) Hoffmannův, b) Wagnerův,  
c) Orthofix, d) Ilizarovův,  
e) TSF (Taylor Spatial Frame)*

Po iniciální distrakci během operace (obvykle 5 mm), ponecháme několik dní tvořit primární svalek. Dobu začátku prolongace volíme orientačně podle věku dítěte, od 7 let věku začínáme s prolongací po týdnu od iniciální distrakce. Prolongace probíhá tempem 1 mm denně, většinou otáčením prolongačních členů 4x1/4 otáčky, z důvodu nutné ochrany nervové cévních struktur a postupné distenze kloubních pouzder, úponů šlach a svalů. Kvalita a kvantita novotvořené kosti je stimulována vytvořením tenzního stresu mezi oběma konci prolongační osteotomie a závisí na: 1. rigiditě fixace, 2. na poškození měkkých tkání a medulárního kanálu při operaci, 3. na rychlosti distrakce a počtu dílčích dávek prolongace během 24 hodin.

Jakmile získáme požadovaný kostní prolongát, ukončíme distrakční fázi a nastává fáze konsolidační. Ta trvá obvykle trojnásobek doby distrakční. Doba, za kterou se dá odstranit zevní fixátor a kost je zátěže schopná, považujeme za dobu hojení. Poměr doby hojení a zisku prolongace v mm určuje parametr kostního hojení, tzv. healing index.

Distrakční i konsolidační fázi prolongace pravidelně kontrolujeme na rtg snímcích, jakmile je na rtg snímku identifikovatelný tzv. trikortikální regenerát (ve 2 na sebe kolmých projekcích jsou vidět minimálně 3 formované kortikální lamely), indikujeme sejmutí zevního fixátoru. V případě jednorovinného fixátoru je sejmutí dvoudobé, nejprve odstraníme tělo fixátoru, necháme pacienta zatěžovat, a pokud nedojde k angulaci prolongátu nebo zlomenině, extrahujeme i fixační šrouby. U rámových fixátorů postupujeme při extrakci jednorázově.

Po odstranění fixátoru by měla být kost zatížení schopná, berle pacienti zcela odkládají průměrně 6 měsíců po extrakci zevního fixátoru. (Dungl P. et al, 2014; Grill F., Dungl P., 1991, 1993)

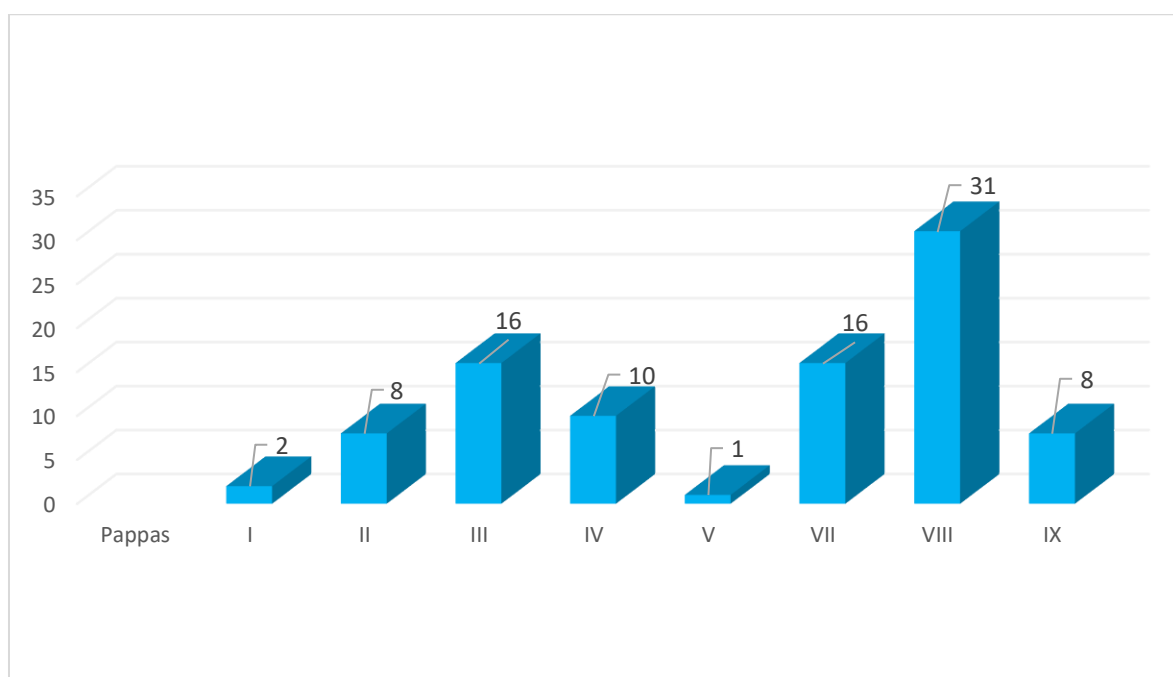
Pokud dojde v časném období po extrakci fixátoru k angulaci nebo zlomenině prolongátu, indikujeme osteosyntézu podvlečenou dlahou nebo hřebem. Jako prevenci mechanických komplikací v místě novotvořené kosti používáme v případě jednorovinného fixátoru zavedení titanových elastických prutů do dřevěné dutiny femuru ještě před samotnou kortikotomií.

Po celou dobu prolongace je nutná důsledná rehabilitace pohybu kloubů, kontrola prokrvení periferie končetiny, péče o zevní fixátor. Většinu doby prolongace tráví pacienti v domácím prostředí.

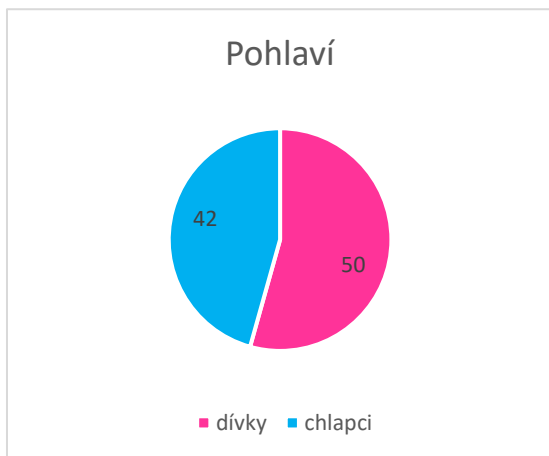
### 6.2.3. Materiál a metodika

Soubor pacientů s PFFD Ortopedické kliniky FN Na Bulovce je unikátní svým počtem. Od roku 1980 do roku 2020 jsme evidovali celkem 95 pacientů, 51 dívek, 44 chlapců, ve všech případech se jednalo o vadu jednostrannou. Retrospektivně jsme analyzovali soubor pacientů registrovaných na naší klinice do roku 2018, což bylo 92 pacientů, 42 chlapců a 50 dívek (obr.32, 33). Analyzovali jsme průběh prolongace u pacientů s femorální deficiencí a zajímala nás doba prolongace, typ použitého zevního fixátoru, prolongační zisk, healing index a v neposlední řadě komplikace a jejich rozbor i v závislosti na typu vrozeného defektu femuru.

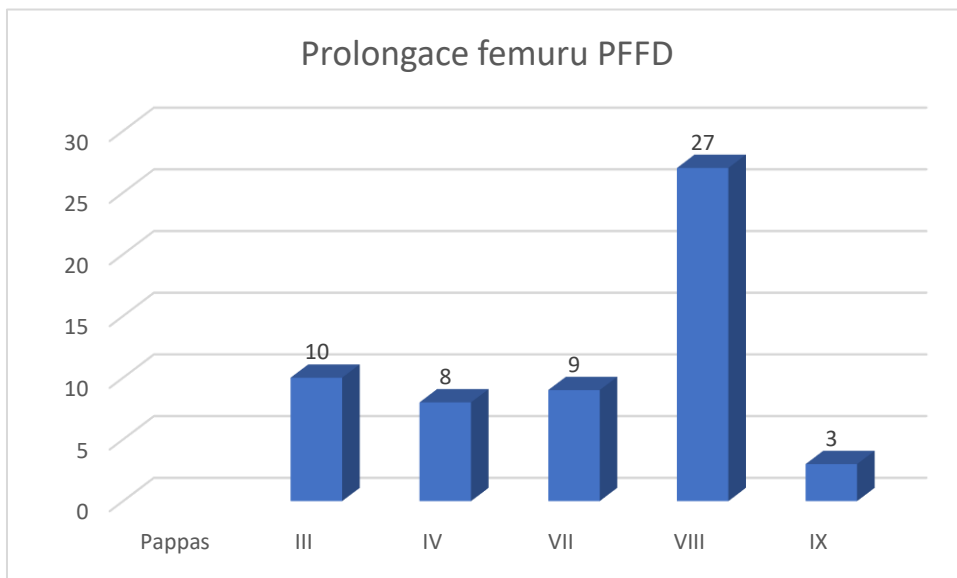
Prolongační léčbu podstoupilo 57 pacientů, distribuci typů indikovaných k prolongaci ukazuje graf (obr. 34)



Obr. 32: Soubor pacientů s PFFD do roku 2018. Římské číslice udávají klasifikaci dle Pappase, arabské číslice počet pacientů.



Obr. 33: Zastoupení pohlaví v souboru pacientů s PFFD.



Obr. 34: Graf ukazuje zastoupení pacientů s PFFD podle Pappasovy klasifikace v souboru hodnocených prolongací

Jako kontrolní skupinu jsme použili soubor pacientů, kteří podstoupili prolongaci končetiny z jiné indikace (např. poúrazový zkrat, zkrat po léčbě vrozené dysplazie kyčelní, zkrat po osteomyelitidě apod.), kde není předpoklad alterace kostního hojení. Kompletní obrazovou dokumentaci jsme našli od 12 pacientů.

Rozhodující pro posouzení hojení byly rentgenové snímky pořizované při ambulantních kontrolách. Z délky hojení byl stanoven *healing index*, tedy poměr počtu dnů hojení (od naložení zevního fixátoru do jeho sejmutí) k délce prolongátu. Tvorbu svalku a



kvalitu hojení jsme sledovali na rentgenových snímcích pořízených vždy ve 2 projekcích. Při ukončení prolongační fáze jsme měřili délku prolongátu v mm, doba hojení (konsolidace) byla určena demontáží zevního fixátoru ve dnech. V případech, kde byla doba sejmutí fixátoru urychlena, byla doba dnů hojení stanovena podle rentgenového sledování konsolidace svalku. Předčasná extrakce zevního fixátoru byla způsobena buď jeho mechanickým selháním při extrémně dlouhých prolongátech (7 a více cm), nutností extrakce z důvodu závažného infektu, případně možné dřívější extrakci při použití dalších metod fixace (nitrodřeňové elastické pruty, osteosyntéza podvlečenou dlahou, případně sádrová spika).

U všech pacientů byl zaznamenán věk při první i každé další prolongaci, zkrat končetiny (tedy očekávaná délka prolongace), den naložení zevního fixátoru, den jeho sejmutí, v některých případech byla místo sejmutí fixátoru jako konec hojení zaznamenána doba konsolidace svalku s možností zátěže končetiny. Ze získaných dat byl vypočítán index hojení (healing index), u kontrolní skupiny pouze jeden, u skupiny PFFD pacientů byla data i healing indexy zaznamenány u každé prolongace.

Skupinu pacientů s PFFD, kteří podstoupili prolongační terapii, jsme rozdělili na 3 podskupiny podle tíže postižení. Za nejkomplicovanější považujeme pro léčbu pacienty s typem Pappas III a IV, tedy s pakloubem proximálního femuru, podskupina A. U těchto pacientů jsme očekávali i nejvíce komplikací. Druhou podskupinu B tvořili pacienti s typem Pappas VII, jejichž prolongace bývají komplikované, ale o něco jednodušší než v podskupině A. Jako téměř fyziologické vnímáme prolongace u pacientů s typem postižení VIII a IX, které jsme zařadili do podskupiny C. Všechny podskupiny jsme porovnávali ve sledovaných parametrech s kontrolní skupinou K.

Porovnávali jsme jak absolutní parametry obou souborů, tak statisticky významné rozdíly posuzovaných parametrů. Evidovali jsme průměrný věk ve skupinách, průměrný zisk prolongace, průměrný healing index pro každou prolongační epizodu. Statisticky nás zajímala závislost hojení (healing indexu, HI)

- na tíži postižení femuru (dle Pappasovy klasifikace),
- závislost na věku pacienta
- závislost na opakování prolongace
- porovnání hodnot s kontrolní skupinou pacientů.

Data byla zpracována statisticky, všechny testy významnosti byly prováděny statistickým testem nulovosti regresního koeficientu v modelu lineární regrese odhadnutém Zobecněnou metodou nejmenších čtverců (GLS, Generalized least squares).

*Lineární regrese* je matematická metoda používaná pro proložení souboru bodů v grafu přímkou nebo jinou funkcí. O bodech reprezentujících měřená data se předpokládá, že jejich x-ové souřadnice jsou přesné, zatímco ypsilonové souřadnice mohou být zatíženy náhodnou chybou. Podstatou lineární regrese je nalezení takové přímky, aby součet druhých mocnin těchto odchylek byl co nejmenší.

*Metoda nejmenších čtverců* má velmi mnoho aplikací v nejširším okruhu vědních oborů, ve kterých se setkáváme s nepřesnými daty. Obecně metoda nejmenších čtverců slouží k eliminaci chyb, kterou provádí optimálně vzhledem k pevně danému jednoznačnému kritériu. (Likeš J., Machek J., 1988)

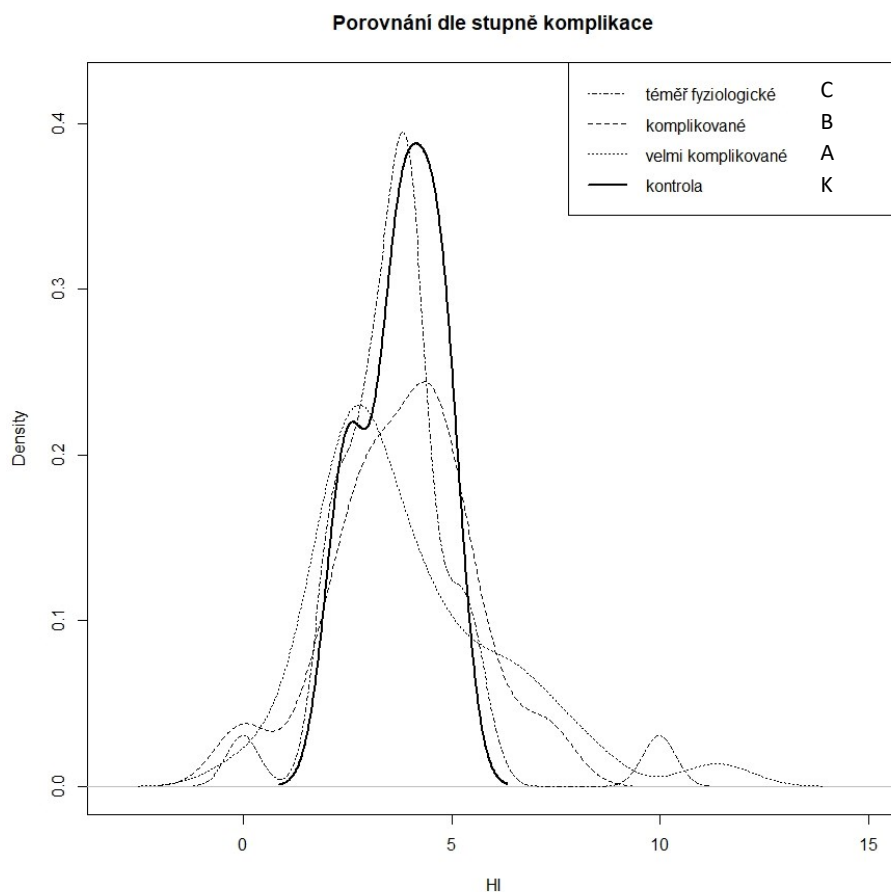
#### 6.2.4. Výsledky

Hodnotili jsme celkem 83 prolongačních epizod u 57 pacientů s PFFD. V kontrolní skupině to bylo 14 prolongací u 12 pacientů. Průměrný věk při první prolongaci ve skupině PFFD byl 6,1 roku, průměrný zisk prolongace činil 49,93 mm (25-117 mm) a průměrný index hojení (Healing Index, HI) byl 3,67. V kontrolní skupině byl průměrný věk při zahájení prolongační léčby 12,09 roku, průměrný zisk prolongace byl 57,64 mm (33-106 mm), průměrný HI 3,64. Hodnoty průměrného věku, zisku a HI v podskupinách PFFD i kontrolní skupině ukazuje přehledně tabulka č. 3. Ve skupině PFFD 26 pacientů podstoupilo prolongaci opakovaně, z toho 19 pacientů dvakrát, 7 pacientů třikrát, většina z nich měla postižení typu III a IV (podskupina A). V kontrolní skupině podstoupili opakovanou prolongaci pouze 2 pacienti.

skupina	počet	prol.epi	počet	věk (roky)	zisk (mm)	HI
<b>A</b>	18	I	18	6,03	64	3,58
		II	11	11,05	67	5,20
		III	6	15,28	59	3,53
<b>B</b>	9	I	9	6,10	53	4,24
		II	4	13,80	68	3,87
		III	1	16,00	100	4,56
<b>C</b>	30	I	30	6,30	44	3,81
		II	4	12,30	58	3,02
<b>K</b>	12	I	12	12,09	58	3,64
		II	2	12,65	46	4,76

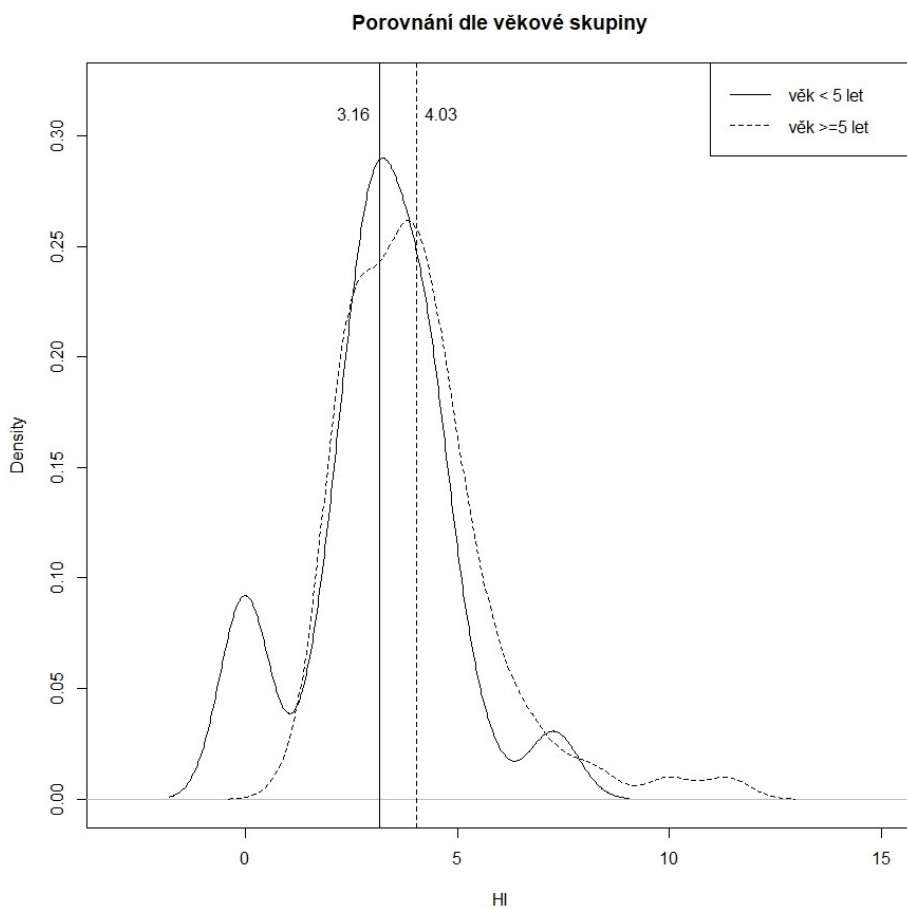
*Tabulka 3: Soubor pacientů s PFFD, kteří podstoupili prodloužení femuru. V prvním sloupci rozdělení skupin podle postižení femuru (A - Pappas III a IV, B – Pappas VII, C – Pappas VIII a IX, K – kontrolní), ve druhém sloupci počet pacientů v každé skupině. Třetí a čtvrtý sloupec ukazují počet pacientů, kteří podstoupili opakovaně prodloužení (II a III). Ke každé skupině i prodloužení jsou zaznamenány statistické ukazatele, průměrný věk v době zahájení prodloužení, průměrný zisk prodloužení a průměrný healing index.*

Domnívali jsme se, že by mohl být rozdíl v délce hojení, tedy HI, u pacientů s těžším typem postižení (podskupina A, B) proti pacientům kontrolní skupiny a PFFD s méně závažným zkratem (podskupina C a K). Závislost HI na stupni postižení končetiny se neprokázala. Rozdíly středních hodnot HI pro jednotlivé podskupiny byly statisticky nevýznamné. (obr. 35)



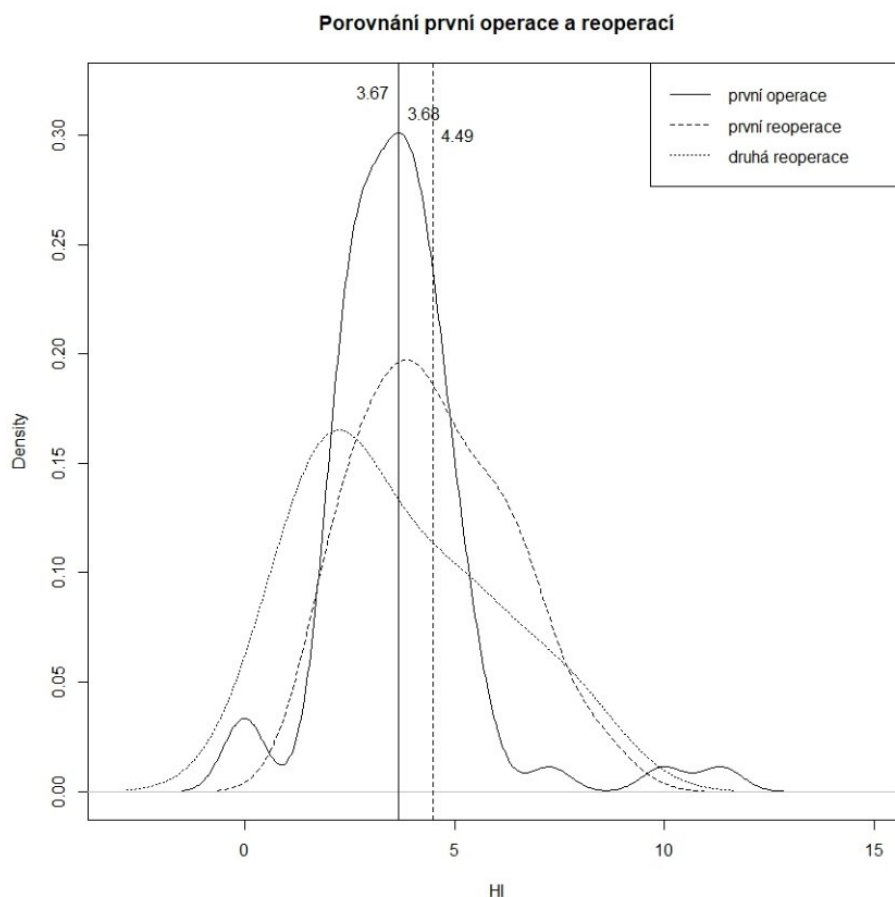
*Obr. 35: Graf závislosti healing indexu na typu postižení. Označení skupin dle postižení je v legendě.*

Pokud jsme analyzovali závislost hojení na věku pacienta, byl pozorován rozdíl průměrného HI ve skupině pacientů mladších 5 let a starších o 0,87. Na zvolené hladině pravděpodobnosti 95 % je tento rozdíl statisticky významný, jak ukazuje graf 35. Ve věku 5 nebo méně let zahájilo první prolongační léčbu 23 pacientů z 57 s PFFD (40,35 %) a průměrný HI byl u této skupiny 3,16. Nabízí se tedy očekávané vysvětlení, že významně lepší hojení prolongátu je u mladších pacientů. Pokud si ale uvědomíme, že u starších pacientů šlo ve většině případů již o opakovanou prolongaci, a tyto případy vyloučíme, pak se rozdíl v průměrném HI ve skupinách pod a nad 5 let věku stává statisticky nevýznamným. (obr. 36)



*Obr. 36: Graf závislosti healing indexu na věku pacientů.*

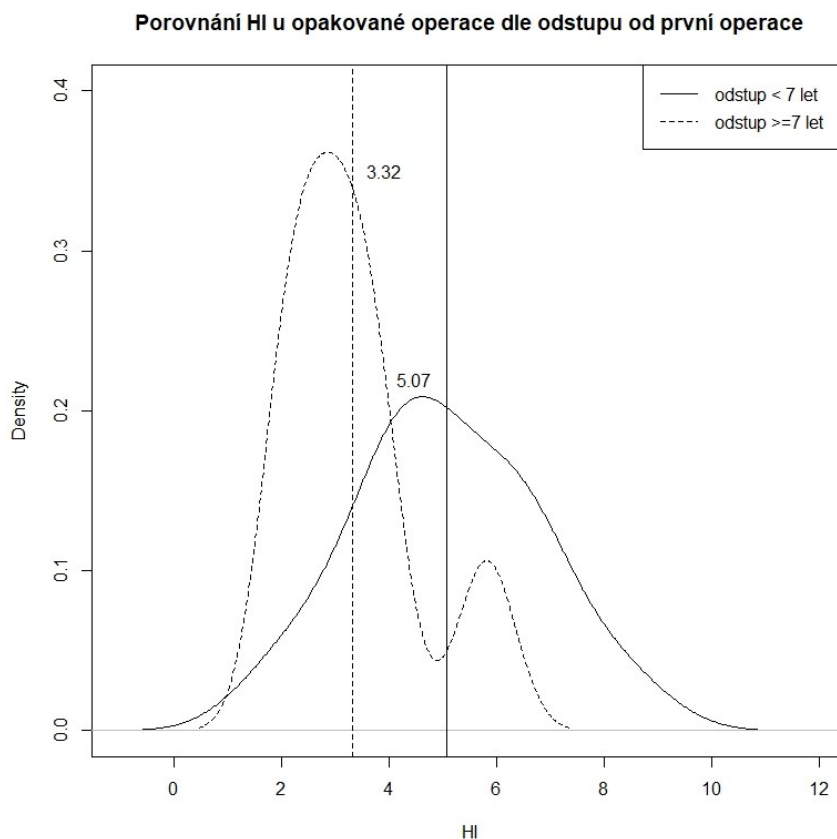
Při hodnocení průměrného HI u první a druhé prolongace byl opět zjištěn statisticky významný rozdíl hodnoty HI na 95 % hladině významnosti. Průměrná hodnota HI při druhé prolongaci byla 4,49, kdežto při první prolongační epizodě 3,67. Zajímavé je, že průměrné hodnoty HI při třetí prolongaci byly podobné jako při první, a to 3,68. Z tohoto pohledu se zdá, že při druhé prolongaci nastává nejdelší hojení, což může být spojeno s růstovým spurtem v době mezi 11 a 13 lety. (obr. 37)



*Obr. 37: Graf závislosti healing indexu na opakované prolongaci.*

Tento výsledek nás přiměl zaměřit se na vliv doby odstupu mezi prolongačními událostmi. Při porovnání průměrného HI se ukázala jako významná doba 7 let mezi prolongacemi. Pacienti, kteří měli odstup mezi 1. a 2. operací  $\geq 7$  let, měli průměrný HI druhé operace 3,32. Pacienti, kteří měli odstup  $<7$  let, měli průměrný HI druhé operace 5,07. Tento rozdíl byl shledán statisticky významným na zvolené hladině pravděpodobnosti 95 %.

(obr. 38)



*Obr. 38: Graf závislosti healing indexu na době odstupu mezi prodlouženími. Výsledný rozdíl je statisticky významný.*

### 6.2.5. Komplikace prodloužení

Pouze 12 z 57 pacientů (21 %) nevykazovalo během prodloužení žádné komplikace. Většina z nich byla z podskupiny C, tedy s nejméně vyjádřeným postižením končetiny. Také v kontrolní skupině pacientů bylo procento komplikací nižší proti skupinám A a B, a to 58,3 % (7 z 12). Zaměřili jsme se na tyto hlavní komplikace: infekce s nutností parenterální antibiotické léčby, angulace nebo fraktura prodloužení s nutností stabilizace (osteosyntéza dlahou, aplikace zevního fixátoru nebo sádrové spiky), subluxace nebo luxace kyčle nebo kolena během prodloužení, rigidita kyčle nebo kolena po prodloužení a výskyt více než jedné komplikace u jednoho pacienta.

Výsledky jsou číselně shrnuty v tabulce 4 a je zřejmé, že počet komplikací stoupá se stupněm postižení femuru.

skupina	počet	kompl	%	> 1 komp.		ang/fract		infekt	sublux	rigidita	paréza	selhání
				n	%	n	%					
A	18	17	94,4	11	61,1	9	50	8	5	3	1	3
B	9	8	88,9	6	66,7	7	77,8	3	3	3	-	-
C	30	20	66,7	3	10,0	12	40	6	1	4	-	-
K	12	7	58,3	0	0	1*	8,3	5	-	1	-	-

*Tabulka 4: Komplikace při prolongaci femuru u podskupin PFFD (A – Pappas III a IV, B - Pappas VII, C – Pappas VIII a IX) a kontrolní skupiny pacientů (K). Ve sloupci s označením > 1k % je procento pacientů, kteří měli během prolongace více než jednu komplikaci. \* jeden pacient s frakturou v místě původního hřebu fixátoru, nikoli prolongátu.*

Z tabulky je zřejmé, že procento komplikací prolongací končetin je všeobecně vysoké navzdory vstupním parametrům pacienta. V kontrolní skupině je nejnižší 58,3 %, nejvyšší u skupiny A, tedy pacientů původně s pakloubem femuru (Pappas III a IV), a to 94,4 %. Procento komplikací u dalších podskupin se pohybuje v rozmezí mezi skupinou A a K. Pokud připustíme pouze procento mechanických komplikací ve smyslu angulace nebo refraktury, je nejhorší výsledek ve skupině B (Pappas VII). U pacientů s PFFD se také ve vysokém procentu vyskytovala více než jedna komplikace v průběhu prolongace, (nejméně 10 % ve skupině C, nejvíce 66,7 % ve skupině B), naproti tomu v kontrolní skupině takový pacient zaznamenán nebyl.



## 6.2.6. Diskuse

Prolongace kostí jsou všeobecně výkony s vysokým procentem komplikací, obzvláště to pak platí u komplexních deformit končetin ve více rovinách, navíc spojených s instabilitou nebo rigiditou kloubů kolem prolongovaného segmentu (Barker et al. 2001, Bowen et al. 2001, Herzenberg et al. 1991, 1994). Kvalitu kostního hojení posuzujeme na rentgenových snímcích hodnocením tvorby kostního svalku (vyplnění distrakční mezery osifikací) a jeho remodelace v tubulizovanou kortikální kost. Hojení pak vyjadřuje hodnota healing indexu, komplikace v hojení po prolongaci končetiny představují zejména angulace a fraktury prolongátu po odstranění zevního fixátoru.

Ještě před indikací prolongační léčby by měla být posouzena rizika a faktory, které mohou ovlivnit výsledek procedury (Damsin, Pous, Ghanem, 1995). Za podstatné považují 1. závažnost zkratu, kdy za hranici indikace k prolongaci považují 20 cm, 2. kloubní stabilitu a integritu kostí, kde spojení kloubní nestability s kostním defektem dává zřídka očekávané výsledky, 3. stav nohy prodlužované končetiny – ztuhlost, deformita a případně kožní defekty mohou ovlivňovat schopnost zátěže a chůze a 4. podmínky druhostranné končetiny a horních končetin. Podobná kritéria uvádí Koman (1982) a v souvislosti s PFFD poukazuje zejména na velmi důležitou stabilitu kyčelního kloubu. V naší sestavě pacientů jsme zaznamenali subluxe nebo luxace jak kyčle, tak kolena. Kyčelní nestabilitu během prolongace jsme zaznamenali ve skupině A (Pappas III a IV), a to jednou, čtyřikrát to byla dislokace kolena. Ve skupině B (Pappas VII) jsme tuto komplikaci zaznamenali třikrát u kolena. Ve skupině C (Pappas VIII a IX) to byl jediný případ. Jako prevenci subluxe kyčle i kolena používáme při rozsáhlých prolongacích systém pelvi-femorální případně pelvi-femoro-tibiální zevní fixace. Tam, kde jsme předem seznámeni se stavem kolenního kloubu na základě artroskopického nebo MRI vyšetření (aplazie/hypoplazie zkřížených vazů) nebo je klinicky zřejmá instabilita kolenního kloubu, používám běžně přemostění kolena zevním fixátorem s šarnýrovým kloubem k možnosti pohybu kolena ve fixní rovině s prevencí dislokace. Přesto se setkáváme s rigiditou kolenního kloubu, která může pak ovlivňovat zásadně funkční výsledek prolongace. (Barker et al. 2001, Herzenberg et al 1994, Ganger et al 2011).

Již na první pohled je zřejmé, že prolongaci femuru zahajujeme ve skupině PFFD výrazně dříve s ohledem na to, že zkraty končetin již v nízkém věku bývají pro děti s PFFD velmi limitující v pohybu a vývoji a při ukončení skeletální zralosti mohou dosahovat až 40

cm. Prolongaci zahajujeme obvykle ve věku kolem 5 let, kdy už je dítě schopno spolupracovat při náročné a bolestivé léčbě a zejména rehabilitaci, která je nutná k dosažení dobrého funkčního výsledku. V našem souboru prolongovaných pacientů byla prolongační fáze léčby zahájena u 23 pacientů z 57 ve věku 5 let a méně (40,35 %). Rozhodující je také velikost zkratu, který již v nízkém věku bývá nad 3 cm a činí značné mechanické potíže při chůzi a nad 5 cm je velmi těžké jej kompenzovat úpravou obuvi. Při hodnocení healing indexu v našem souboru se ukázalo, že ve věku nad 5 let je průměrná hodnota HI vyšší než u pacientů mladších, rozdíl ale není statisticky významný. Podobnou zkušenost mají Jochymek a spol. (2009), kteří publikovali soubor prolongací femuru u 67 dětí se smíšenou etiologií zkratu, není však patrné, zda se mezi pacienty vyskytují někteří s komplexními skeletálními vadami, podobným PFFD. V porovnání se sestavou zmíněných autorů jsme zaznamenali výrazně vyšší procento komplikací v našem souboru (77,1 % vs. 29,8 %), což může vysvětlovat menší počet pacientů s komplexní vrozenou vadou v sestavě kolegů z Brna.

Z jiných zdrojů je zřejmé, že prolongace u PFFD jsou zatíženy velkým počtem komplikací z důvodu víceetážového postižení končetiny. (Ganger et al. 2011, Grill, Dungal 1991, Koman et al 1982, Herzenberg et al. 1991). Mechanickými podmínkami hojení se zbývali Grill a Dungal při hodnocení souboru 40 pacientů s prolongací femuru z let 1979–1988 a porovnávali hojení prolongátu v systému kruhového (Ilizarov) a jednorovinného fixátoru (Orthofix nebo Wagner). Zjistili nutnost delšího ponechání jednorovinných fixátorů do zhojení novotvořené kosti a více zlomenin po odstranění fixátoru. Pro jednoduchost montáže doporučují jednorovinný fixátor pro méně závažné typy PFFD (Pappas VIII a IX), kdežto pro typy III, IV a VII doporučují kruhový systém s větší biomechanickou pevností a možností přemostění nestabilních kloubů (kyčle i kolena). S objevením se nových typů fixátorů (hexapod) bylo jednou z hypotéz zajištění lepší stability prolongátu při distrakci i hojení moderním hexapodálním systémem, než nabízel dřívější model, kruhový fixátor Ilizarovův. Ganger s kolegy (2011) vyhodnotili soubor 35 prolongací u 30 pacientů a zjistili, že nové techniky ani přibývající zkušenosti nesnižují signifikantně procento komplikací za období 10 let.

Hodnocením 83 prolongací u 57 pacientů s PFFD jsme zaznamenali zvyšující se hodnotu Healing indexu u starších pacientů, jak jsme očekávali. U 26 z nich se jednalo o opakovanou prolongaci stejné kosti a zajímalo nás proto, zda má vliv na hojení i opakování prolongace a po jaké době je tento vliv signifikantně významný. Potvrdilo se, že pacienti, kteří měli odstup mezi 1. a 2. operací  $\geq 7$  let, měli průměrný HI druhé prolongace 3,32. Pacienti, kteří měli odstup  $< 7$  let, měli průměrný HI druhé prolongace 5,07. Tento rozdíl byl

shledán statisticky významným na zvolené hladině pravděpodobnosti 95 %. V publikacích jsme prozatím neobjevili zmínku o tomto faktoru na vliv hojení, všeobecně se o opakovaných prolongacích autoři zmiňují minimálně. Z toho lze vyvodit klinický důsledek pro opakování prolongace za dobu delší než 7 let, pokud bude možné akceptovat délku zkratu a jeho negativní vliv na vývoj asymetrie pánve a sekundárních deformit páteře.

Rozbor komplikací zahrnoval výskyt závažných infektů, angulace nebo zlomeniny po odstranění fixátoru, subluxaci kloubů během prolongace a rigiditu kloubů po prolongaci. Podskupina A (Pappas III a IV) je velmi riziková a u 61,1 % pacientů se vyskytla více než 1 komplikace. Pokud bychom nepočítali infekt kolem hřebů fixátoru jako komplikaci, vyskytly se mechanické komplikace v podobě angulace nebo fraktury u 9 z 18 pacientů (50 %) a subluxace kyčle nebo kolena u 4 z 18 pacientů (22,2 %, u jednoho pacienta šlo o kyčel i koleno). U tří našich pacientů z podskupiny A jsme bohužel museli konstatovat ztrátu efektu prolongace s kompletním kolapsem prolongátu po odstranění zevního fixátoru. Podskupina B (Pappas VII) také vykazuje významné procento komplikací, celkem 88,9 %, u 66,7 % pacientů se vyskytla více než 1 komplikace. Pokud se zaměříme na angulace a fraktury, tak jsme tuto událost zaznamenali u 7 z 9 hodnocených pacientů (77,8 %). Překvapivě je to více než u skupiny A. Možnou příčinou častějšího mechanického selhání u typu Pappas VII po prolongaci je primárně varózní tvar proximálního femuru, který úporně recidivuje i po korekčních osteotomiích, které předcházejí vlastní prolongaci. Důvodem může být tzv. ontogenetická paměť femuru, který je u této vady primárně jako varózní založen a vyvinut a vrací se tak ke svému původně předurčenému tvaru. Tuto skutečnost ověřujeme ve spolupráci s Anatomickým ústavem 1.LF UK v dalších experimentech na kuřecích embryích. Varozita pak znevýhodňuje kost v zatížení a dochází častěji k její angulaci nebo zlomenině v mechanicky nejslabším místě, což bývá bohužel regenerát.

Podskupina C (Pappas VIII a IX) měla nejméně komplikací, i když jejich počet je stále vysoký proti kontrolní skupině. Celkem to bylo 66,7 %, ale snížil se počet pacientů s výskytem více než 1 komplikace na 10 %. Ani tuto skupinu však neminuly deformity a fraktury prolongátu (12 z 30 pacientů, 40 %). Pokud spočítáme procento fraktur po prolongaci pro celou skupinu, činí 49,1 % (28 z 57 pacientů). Podobné výsledky publikoval i Danzinger a spol. (1995) s 45 % fraktur po odstranění zevního fixátoru po prolongaci u pacientů s vrozeným zkratem femuru. Naopak výrazně méně fraktur uvádí Ganger a spol (2011), a to 25,7 % (9 z 35 pacientů).

Komplikace a jejich výskyt jsou také jediným zásadním rozdílem mezi skupinou pacientů s PFFD proti skupině kontrolní. Průměrné hodnoty HI se v obou skupinách statisticky významně nelišily.

Výskyt komplikací při prolongaci končetin u komplexních vrozených vad je dán zřejmě povahou defektu, který zahrnuje i patologii měkkých tkání, kloubní nestabilitu při kostěné dysplazii kyčelního kloubu, aplazii klíčových stabilizátorů kolena a případně rigiditu nohy při tarzální koalici nebo defektech paprsků. Anomálie cévního zásobení se na poruchách hojení svalku podílí zřejmě minimálně, nepodařilo se prokázat statisticky významnou souvislost hojení ani s věkem ani s tíží postižení končetiny. Naopak se ukázala souvislost delšího hojení u opakovaných prolongací, pokud doba mezi operacemi je menší než 7 let. Specifika a komplikace prolongací u vrozených vad končetin plynou tedy patrně více z mechanických abnormalit kostí než biologických faktorů.

## 7. Závěr

Potvrdili jsme hypotézu 1, že profil genové exprese osteo i angiogenních faktorů je odlišný u pacientů s vrozeně krátkým femurem proti kontrolním vzorkům fyziologické kostní tkáně. Jsme si vědomi toho, že výsledky laboratorní experimentální části v této fázi bohužel nedovolují uzavřít problematiku osteogeneze a angiogeneze u studovaných vzorků, natož naše poznatky zobecňovat. Jsme na počátku dlouhé a komplikované práce, abychom mohli s jistotou prezentovat a interpretovat naše výsledky v klinických souvislostech a považujeme tuto studii za odrazový můstek k dalším a více specializovaným analýzám. Věříme, že následující experimenty mohou přispět k porozumění nejen etiologii vrozeně krátkého femuru, ale i obecně vývoji a hojení kosti na buněčné úrovni. Navíc je nutné ověřit výsledky na větším počtu vzorků, aby bylo možné výstupy statisticky analyzovat. To ovšem naráží na významně nízkou frekvenci výskytu vady v populaci.

V plánu laboratorní práce k ověření získaných informací je mikrodisekce buněk z histologických preparátů a z nich izolace buněčně specifické RNA. Tu je pak možno analyzovat kvantitativně metodou RealTime PCR, která je schopna odhalit nejen typy exprimovaných genů, ale i jejich konkrétní množství. Další možností ke získání buněčně, a tedy i tkáňově specifické RNA s reálným obrazem exprimovaných genů, je založení tkáňových kultur. Naším cílem je potvrdit hypotézu, že osteoblasty vrozeně chybně diferencované tkáně vykazují jinou genovou expresi než zdravá a fyziologická kost, a vytipovat klíčové geny, jejichž prezentace v obou typech vzorků se významně liší. Domníváme se, že chybný vývoj kosti je dán poruchou genové regulace podpořenou lokálními faktory. Je ovšem velmi problematické navázat spolupráci s laboratorii, kde by bylo možné experimenty na molekulární a genetické úrovni dále rozvíjet, přestože jsme se pokoušeli hledat i v zahraničí.

Velmi slibnou spolupráci jsme v loňském roce navázali s Anatomickým ústavem 1.LF UK, kde na kuřecích zárodcích probíhá experiment pracující s hypotézou ovlivnění vývoje končetiny selektivním zásahem do cévního zásobení. Společně s tímto experimentem se pokoušíme o studium HOX genů pacientů s PFFD, které řídí kraniokaudální vývoj končetiny.

Klinická část práce nepotvrdila hypotézu 2, a to, že hojení prolongátu a jeho regenerace je u pacientů s vrozeně krátkým femurem delší než u zdravých fyziologických

kostí. Doba hojení se mezi jednotlivými skupinami významně nelišila. Neproklázala se ani souvislost délky kostního hojení s typem defektu stehenní kosti, jak jsme původně předpokládali. Závislost kvality hojení (HI) na věku byla v souboru pacientů s PFFD podmíněna zejména opakovanými prolongacemi. Překvapivě bylo potvrzeno, že při opakovaných prolongacích nehraje roli pouze věk pacienta, ale také odstup od předchozí operace. Pokud se prolongace končetiny opakuje za méně než 7 let, je hojení významně delší.

Komplikace provázející prolongace dlouhých kostí u pacientů s komplexní vrozenou vadou jsou velmi časté a je tedy ke zvážení stanovení bezpečných klinických kritérií pro indikaci takové léčby. Je na místě využít veškerých možností zobrazovacích neinvazivních diagnostických metod (CT, CT angiografie, MRI), které by mohly přispět k méně rizikovému průběhu prolungační léčby. Volba správné operační strategie a zejména zkušenost jsou u takových vrozených vad nutné.

#### **Shrnutí závěrů pro praxi:**

- Exprese genů osteo a angiogeneze se liší ve skupině pacientů s PFFD a kontrolní skupině.
- Není jasná souvislost mezi zjištěnou změnou genové exprese a etiologií vady.
- Chybějící exprese genů angiogeneze včetně VEGF společně se zjištěnou změnou cévního zásobení dolní končetiny ukazuje na významnou roli cévního zásobení v embryonálním vývoji femuru.
- Neproklázala se souvislost mezi hojením prolongátu u pacientů s PFFD v porovnání s kontrolní skupinou.
- Prolongace femuru u pacientů s PFFD je zatížena vysokým procentem mechanických komplikací, ale neproklázala se souvislost s hojením kosti po prolongaci a stupněm postižení femuru.
- Při indikaci prolungační léčby je třeba zohlednit:
  - stabilitu kyčelního a kolenního kloubu – při riziku subluxe zvolit stabilnější systém fixace prolongovaného segmentu (pelvi-femoro-tibiální stabilizaci, kruhový fixátor)
  - délku plánované prolongace – při prolongaci více než 5 cm profylaktická osteosyntéza
  - pokud je nutná opakovaná prolongace, pak respektovat interval delší než 7 let mezi operacemi.

## 8. Literatura

Aitken GT. Proximal femoral focal deficiency: definition, classification and management. In: Proximal femoral focal deficiency: a congenital anomaly. Washington, DC:National Academy of Sciences, 1968: 1-22.

Alman B.A., Krajbich J. I., Hubbard S: Proximal Femoral Focal Deficiency: Results of Rotationplasty and Syme Amputation. J Bone Joint Surg 1995, Vol. 77 A, No 12; 1876-1882.

Barker KL, Simpson AH, Lamb SE: Loss of knee range of motion in leg lengthening. J Orthop Sports Phys Ther, 2001, 31: 238-246.

Boden SD, Fallon MD, Davidson R, Mennuti MT, Kaplan FS. Proximal Femoral Focal Deficiency. Evidence for a Defect in Proliferation and Maturation of Chondrocytes. J Bone Joint Surg 1989; Vol. 71-A, No. 8: 1119-1129.

Bowen JR, Kumar JS, Orellana CA, Andreacchio A, Cardona JJ: Factors leading to hip subluxation and dislocation in femoral lengthening of unilateral congenital short femur. J Pediat Orthop, 2001, 21: 354-359.

Court C, Carlizo H: Radiological Study of Severe Proximal Femoral Focal Deficiency. J Pediat Orthop, 1997, 17: 520-524.

Čihák Radomír a kol: Anatomie 3, Nauka o cévách, Grada Publishing a.s., 2016, 176-189.

Čihák Radomír a kol: Anatomie 1, Grada Publishing, a.s., 2011, 75-89.

Damsin JP, Pous JG, Ghanem I: Therapeutic Approach to Severe Congenital Lower Limb Length Discrepancies: Surgical Treatment Versus Prosthetic Management. J Pediat Orthop Part B, 1995, 4: 164-170.

Danzinger MB, Kumar A, Dewese J: Fractures after femoral lengthening using Ilizarov method, J Pediat Orthop, 1995, 15: 220-223.

Dungl, P. Vrozeně krátký femur. In Dungl, P. a kol. Ortopedie. Praha: Grada Publishing, 2005, s. 888-893.

Dylevský I.: Anatomie dítěte, Nipioanatomie 1. díl, ČVUT Praha, 2014

Farhadi J, Jaquier C, Barbero A, Jakob M, Schaeren S, Heberer M, Martin I. Differentiation-Dependent Up-Regulation of BMP-2, TGF-beta 1, and VEGF Expression by FGF-2 in Human Stromal Cells. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116(5): 1379-1386.

Frydrychová M, Dungl P, Chomiak J, Tvrđík D. Proximální femorální fokální deficiencie – známá fakta a nový výzkum. *Ortopedie* 2007; 1: 103-109.

Frydrychová M, Tvrđík D, Dungl P, Chomiak J. První zkušenosti s molekulární analýzou tkáně pakloubu u vrozeně krátkého femuru (PFFD). *Ortopedie* 2010; 3: 358-362.

Frydrychová M., Dungl P., Ošťádal M., Chomiak J. Analysis of Gene Expression of Pseudoarthrosis Tissue in Congenital short Femur, Initial Study and First Experience. Analýza genové exprese v tkáni pakloubu u vrozeně krátkého femuru, úvodní studie a první zkušenosti. *AChOTČ* 2020, 87, No 5, p. 323-328.

Ganger R, Radler C, Handlbauer A, Chomiak J, Grill F, Dungl P: Komplikace po prolongaci femuru kruhovým fixátorem při vrozeném defektu femuru. *AChOTČ* 2011, 78: 61-66.

Gardner E, O'Rahilly R: The early development of the knee joint in staged human embryos. *J Anat* 1968; 102: 289-299.

Gray DJ, Gardner E: Prenatal development of the human knee and superior tibiofibular joints. *Am J Anat* 1950; 86: 235-287.

Grill F, Dungl P.: Lengthening for congenital short femur: results of different methods. *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73: 439-447.

Grill F, Dungl P, Steinwender G: Congenital short femur. *J Pediatr Orthop B* 1993; 2: 35-41.

Grogan DP, Holt GR, Ogden JA: Talocalcaneal Coalition in Patients Who Have Fibular Hemimelia or Proximal Femoral Focal Deficiency. *J Bone Joint Surg* 1994, Vol. 76 A; 9: 1363-1370.



Hamel J, Winkelmann W, Becker W: A New Modification of Rotationplasty in a Patient With Proximal Femoral Focal Deficiency Pappas Type II. *J Pediatr Orthop Part B*, 1999; 8: 200-202.

Herzenberg JE: Congenital Limb Deficiencies and Limb Lengthening. In: Canale T, Beaty J: *Operative Pediatric Orthopaedics*. St. Louis, Mosby 1991, 187-252.

Herzenberg JE, Scheufele L, Paley D, Bechtel R, Tepper S: Knee range of motion in isolated femoral lengthening. *Clin Orthop*, 1994, 301: 49-54.

Horák M, Chomiak J, Kašpar M, et al. Anomálie cévního zásobení dolní končetiny u pacientů s vrozeně krátkým femurem (PFFD a význam CTAG při jejich diagnostice. *Ces Radiol* 2007; 61: 421-426.

Huser AJ, Kwak YH, Rand TJ, Paley D, Feldman DS: Anatomic relationship of the femoral neurovascular bundle in patients with congenital femoral deficiency. *J Pediatr Orthop*, 2021, Vol. 41, No 2; 111-115.

Choi IH, Kumar SJ, Bowen JR: Amputation or limb-lengthening for partial or total absence of the fibula. *J Bone Joint Surg* 1990, 72-A: 1391-1399.

Chomiak J, Horak M, Masek M, Frydrychova M, Dungl P. Computed Tomographic Angiography in Proximal Femoral Focal Deficiency. *J Bone Joint Surg Am*. 2009; 91: 1954-1964.

Chomiak J., Horák M., Mašek M., Dungl P., Ošťádal M., Frydrychová M., Podškubka A.: Proximální femorální fokální deficiencie: přínos CT, CT angiografie a artroskopie kolenního kloubu. *Ortopedie*, 2010, 4: 120-130.

Chomiak J., Podškubka A., Dungl P., Ošťádal M., Frydrychová M.: Cruciate Ligaments in Proximal Femoral Focal Deficiency: Arthroscopic Assessment, *J Pediatr Orthop*, 2012, Vol 32, No 1, 21-28.

Johansson E, Aparisi T: Missing Cruciate Ligaments in Congenital Short Femur. *J Bone Joint Surg*, 1983, 65-A, No.8: 1109-1115.

Jochymek J, Škvařil J, Ondruš Š: Analýza výsledků kostního hojení prodlužovaných femurů metodou postupné distrakce u dětí a dospívajících. AChOTČ 2009, 76: 399-403.

Karsenty G: The genetic transformation of bone biology. Genes Dev 1999, 13: 3037-3051.

Koman L A, Meyer L C, Warren F H: Proximal Femoral Focal Deficiency. Clin Orthop 1982; 162: 135-143.

Lewin SO, Opitz JM: Fibular A/Hypoplasia: Review and documentation of the fibular developmental field. Am J Genet, 1986; 2 Suppl: 215-238.

Likeš Jiří, Machek Josef: Matematická statistika, SNTL Praha 1988, 165-169.

Manner HM, Radler C., Ganger R., Grill F.: Knee deformity in congenital longitudinal deficiencies of the lower extremity. Clin Orthop Relat Res 2006; 448: 185-192.

Manner HM, Radler C, Ganger R, Grill F: Dysplasia of the cruciate ligaments: radiographic assessment and classification. J Bone Joint Surg Am 2006; 88: 130-137.

Miller LS, Bell DF: Management of congenital fibular deficiency by Ilizarov technique. J Pediatr Orthop, 1992, 12: 651-657.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W: Bone development. Annu Rev Cell Dev, 2000, 16: 191-220.

Pappas AM. Congenital Abnormalities of the Femur and Related Lower Extremity Malformations: Classification and Treatment. J Pediatr Orthop 1983; 3: 45-60.

Pirani S, Beuachamp RD, Li D, Sawatzky B: Soft Tissue Anatomy of Proximal Femoral Focal Deficiency. J Pediatr Orthop 1991; 11: 563-570.

Peng H, Wright V, Usas A et. al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell – expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. J Clin Invest. 2002 September 15; 110(6): 751-759.

Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, Pean AL, Pan W, Verfaillie CM. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 March 18; 100(6): 3305-3310.

Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT. Mechanisms of Fibroblast Growth Factor-2 Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Osteoblastic Cells. *Endocrinology* 2000; 141: 2075-2083.

Sadler W.Thomas: *Langmanova lékařská embryologie, překlad 10. vydání*, Grada Publishing a.s., 2011 (originál: *Langman's medical embryology, 10th edition*, Lippincott Williams&Wilkins, USA, 2006)

Sorge G, Ardito S, Genuardi M, Pavone V, Rizzo R, Conti G, Neri G, Katz BE, Opitz JM. Proximal femoral focal deficiency (PFFD) and fibular A/Hypoplasia (FA/H): A model of a developmental Field defect. *Am J Med Genetics* 1995, 55: 427-432.

Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105(6): 2028-2038.

Tachdjian MO: *Pediatric Orthopaedics*. Ed 2, pp 554-582. Philadelphia, W.B. Saunders, 1990.

Vacek Z.: *Embryologie*, Grada Publishing a.s., 2006

Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen B: Skeletal defects in *Vegf120/120* mice reveal multiple roles for Vegf in skeletogenesis. *Development* 2002, 129: 1893-1904

Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Shipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131: 2161-2171.

## Seznam publikací

### Publikace se vztahem k disertační práci s IF

**Frydrychová M.**, Dungal P., Ošťádal M., Chomiak J. Analysis of Gene Expression of Pseudoarthrosis Tissue in Congenital short Femur, Initial Study and First Experience. AChOTČ 87, 2020, No 5, p. 323-328. **IF 0,40**

Chomiak J, Podškubka A, Dungal P, Ošťádal M, **Frydrychová M.** Cruciate ligaments in proximal femoral focal deficiency: arthroscopic assessment. J Pediatr Orthop. 2012 Jan-Feb;32(1):21-8. doi: 10.1097/BPO.0b013e31823d34db. PubMed PMID: 22173383.  
**IF 1,163**

Chomiak J, Horák M, Mašek M, **Frydrychová M.**, Dungal P. Computed tomographic angiography in proximal femoral focal deficiency. J Bone Joint Surg Am. 2009 Aug;91(8):1954-64. doi: 10.2106/JBJS.H.00902. PubMed PMID: 19651955.  
**IF 3,427**

### Publikace se vztahem k disertační práci bez IF

Chomiak J., Horák M., Mašek M., Dungal P., Ošťádal M., **Frydrychová M.**, Podškubka A. Proximální femorální fokální deficiencie: přínos CT, CT angiografie a artroskopie kolenního kloubu. *Ortopedie*. 2010, 4(3), 121-130. ISSN 1802-1727.

**Frydrychová M.**, Tvrdík D., Dungal P., Chomiak J. První zkušenosti s molekulární analýzou tkáně paklobu u vrozeně krátkého femuru (PFFD). *Ortopedie*, 2010, vol. 4, s. 131-135. ISSN 1802-1727.

**Frydrychová M.**, Dungal P., Chomiak J., Tvrdík D. Proximální femorální fokální deficiencie – známá fakta a nový výzkum. *Ortopedie* 2007, roč.1, č. 3: s. 103-9; ISSN 1802-1727

Horák M., Chomiak J., Kašpar M., Ryznarová Z., **Frydrychová M.**, Dungal P., Mašek M. Anomálie cévního zásobení dolní končetiny u pacientů s vrozeně krátkým femurem (PFFD) a význam CTAG při jejich diagnostice. *Česká radiologie*. 2007, 61(4), 421-426. ISSN 1210-7883.

## **Publikace bez vztahu k disertační práci s IF**

Chomiak J., Ošťádal M., **Frydrychová M.**, Dungl P. Lengthening of the ulna by callotaxis in children with multiple hereditary exostoses: comparison of methods with and without internal fixation. *Journal of Children's Orthopaedics*, 2021, Vol 15, No 4 **IF 1,548**

Včelák J, Macko M, Kubeš R, Němec K, **Frydrychová M.** [Two-Stage Revision for Periprosthetic Infection of the Total Hip Arthroplasty: a Comparison of Two Methods]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2018;85(3):179-185. Czech. PubMed PMID: 30257776.

**IF 0,456**

Kubeš R, Salaj P, Hromádka R, Včelák J, Kuběna AA, **Frydrychová M.**, Magerský Š, Burian M, Ošťádal M, Vaculik J. Range of motion after total knee arthroplasty in hemophilic arthropathy. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018 May 22;19(1):162. doi: 10.1186/s12891-018-2080-0. PubMed PMID: 29788949; PubMed Central PMCID: PMC5964921.

**IF 2,002**

Ošťádal M, Eckhardt A, Herget J, Mikšík I, Dungl P, Chomiak J, **Frydrychová M.**, Burian M. Proteomic analysis of the extracellular matrix in idiopathic pes equinovarus. *Mol Cell Biochem.* 2015 Mar;401(1-2):133-9. doi: 10.1007/s11010-014-2300-3. Epub 2014 Dec 4. PubMed PMID: 25472880.

**IF 2,613**

Chomiak J, Dungl P, Ošťádal M, **Frydrychová M.**, Burian M. Muscle transfers in children and adults improve external rotation in cases of obstetrical brachial plexus paralysis: a comparative study. *Int Orthop.* 2014 Apr;38(4):803-10. doi: 10.1007/s00264-013-2202-0. Epub 2013 Dec 6. PubMed PMID: 24310506; PubMed Central PMCID: PMC3971286.

**IF 2,110**

Burian M, Dungl P, Nanka O, Chomiak J, Ostadal M, **Frydrychova M.**, Kubes R. Anteromedial wedge reduction osteotomy <sup>[SEP]</sup>for the treatment of femoral head deformities. *Hip Int.* 2013 May-Jun;23(3):281-6. doi: 10.5301/hipint.5000017. Epub 2013 Mar 5. PubMed PMID: 23475419.

**IF 0,763**

Ošťádal M, Chomiak J, Dungl P, **Frydrychová M.**, Burian M. Comparison of the short-term and long-term results of the Ponseti method in the treatment of idiopathic pes equinovarus. *Int Orthop.* 2013 Sep;37(9):1821-5. doi: 10.1007/s00264-013-2033-z. Epub 2013 Aug 7. PubMed PMID: 23917854; PubMed Central PMCID: PMC3764295.

**IF 2,019**

Burian M., Dungal P., Chomiak J., Ošťádal M., **Frydrychová M.** Úspěšnost konzervativní léčby vývojové kyčelní dysplazie metodou „over-head trakce“ (Efficiency of Conservative Treatment by Overhead Traction in developmental Dysplasia of the Hip). *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77; s. 371-377, 2010. ISSN 0001-5415 **IF 1.628**

Chomiak J., **Frydrychová M.**, Ostádal M., Matejíček M. [The Ponseti method of treatment of congenital clubfoot--first experiences]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2009 Jun;76(3):194-201. Czech. PubMed PMID: 19595280.  
**IF 1,628**

### **Publikace bez vztahu k disertační práci bez IF**

Stachoň R., Chomiak J., Ošťádal M., **Frydrychová M.**, Fraňo A. Korekce valgózní deformity kolena u dětí pomocí hemiepifyzeodézy: retrospektivní analýza. *Acta Chir Traumatol Cech*, 2021, 88, No. 2, p.87-94.

Chomiak J., **Frydrychová M.**, Dungal P. Diagnostika vývojové kyčelní dysplazie. Část 1 - od novorozeneckého věku do věku před začátkem chůze. *Ortopedie*, 2017, vol. 11, s. 164-169. ISSN 1802-1727.

**Frydrychová M.**, Kassaiová M, Jůzek R, Chomiak J, Dungal P. Vývojová dysplazie kyčelního kloubu. *Solen, Pediatrie pro Praxi* 2016; 17(3)

Ošťádal M., Chomiak J., **Frydrychová M.**, Kassaiová M. a Dungal P. Pes equinovarus - 10 let léčby Ponsetiho metodou. *Ortopedie*. 2015, 9(6), 275-281. ISSN 1802-1727.

Ošťádal M., Chomiak J., Dungal P., **Frydrychová M.**, Vaculík J.: Ponsetiho metoda při léčbě pes equinovarus congenitus (PEC). *Neonatologické listy*, 2011, Roč. 17, č. 2, s. 3-5. ISSN: 1211-1600.

Chomiak J., Horák M., Mašek M., Dungal P., Ošťádal M., **Frydrychová M.**, Podškubka A. Proximální femorální fokální deficiencie: přínos CT, CT angiografie a artroskopie kolenního kloubu. *Ortopedie*. 2010, 4(3), 121-130. ISSN 1802-1727.

Poul J, **Vejrostová M.** Rotational acetabular osteotomy in the treatment of Legg-Calve-Perthes disease. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2001;68(6):357-62. Czech. PubMed PMID: 11847927.

Poul J, **Vejrostová M.** Triple osteotomy of the pelvis in children and adolescents. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2001;68(2):93-8. PubMed PMID: 11706723.

#### Monografie

DUNGL P., BURIAN M., CINEGR P., **FRYDRYCHOVÁ M.**, GELTNER D., CHOMIAK J., KOFRÁNEK I., KOLMAN J., KUBEŠ R., LESENSKÝ J., MAJERNÍČEK M., MATĚJÍČEK M., MATĚJOVSKÝ Z., MATĚJOVSKÝ Z. *Ortopedie*. Praha: Grada, 2014, 1192 s. ISBN 978-80-247-4357-8.

POUL, Jan. *Výsledky chirurgické léčby Leggovy - Calvého - Perthesovy choroby ve srovnání s konzervativními postupy*. Praha: Iga MZ ČR, 2001. Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR. Dostupné také z:  
<http://kramerius.medvik.cz/search/handle/uuid:MED00113749>. Číslo zprávy: ND4502.

## Seznam zkratk použitých v textu

AER	apikální ektodermální lišta (apical ectodermal ridge)
ANPEP	alanyl aminopeptidáza (angiogenní membránový faktor)
BMP	kostní morfogenetický protein
CDH5	kadherin 5
COL18A1	kolagen typ XVIII, podjednotka alfa
CT	počítačová tomografie (computer tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECGF	endoteliální buněčný růstový faktor
FGF	růstový faktor fibroblastů
FGFR	receptor pro růstový faktor fibroblastů
HI	healing index
HOX	homeobox gen
IGF	inzulínu podobný růstový faktor
LAMA5	laminin alfa 5
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	destičkami derivovaný růstový faktor
PECAM	destičkový/endoteliální adhezivní faktor (antigen CD31)
PF4	destičkový faktor 4
PFFD	proximální femorální fokální deficiencie
PTEN	fosfatázový a tensinový homolog
PTGS1	prostaglandin syntáza a cyklooxygenáza
RNA	ribonukleová kyselina
Rtg	rentgen, rentgenový
SHH	sonic hedgehog
TBX	T-box geny
TGF	transformující růstový faktor
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
ZPA	zóna polarizační aktivity



# Příloha 1: Přehled a mapa genů osteogeneze

Oligo GEArray® Human Osteogenesis Microarray

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description	Gene Name
1	Hs.546292	NM_022854	RPS27A	Ribosomal protein S27a	RPS27A
2	Hs.324746	NM_001822	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG
3	Hs.75431	NM_004478	ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	ALPL
4	Hs.272396	NM_016519	AMBN	Ameloblastin, enamel matrix protein	AMBN
5	Hs.1238	NM_001143	AMELY	Amelogenin, Y-linked	AMELY
6	Hs.486653	NM_001154	ANXA5	Annexin A5	Annexin V
7	Hs.386975	NM_000047	ARSE	Arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)	ARSE
8	Hs.512670	NM_199173	BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)	Osteocalcin
9	Hs.821	NM_001711	BGN	Blyscan	Blyscan
10	Hs.1274	NM_008129	BMP1	Bone morphogenetic protein 1	BMP1
11	Hs.73953	NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	BMP2
12	Hs.121507	NM_001201	BMP3	Bone morphogenetic protein 3 (osteogenic)	BMP3
13	Hs.68879	NM_130851	BMP4	Bone morphogenetic protein 4	BMP4
14	Hs.296648	NM_021073	BMP5	Bone morphogenetic protein 5	BMP5
15	Hs.285671	NM_001718	BMP6	Bone morphogenetic protein 6	BMP6
16	Hs.473183	NM_001719	BMP7	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	BMP7
17	Hs.409964	NM_001720	BMP8B	Bone morphogenetic protein 8b (osteogenic protein 2)	BMP8
18	Hs.524477	NM_004329	BMPRIA	Bone morphogenetic protein receptor, type IA	ALK-3
19	Hs.489127	NM_001742	CALCR	CALCITONIN RECEPTOR	CALCR
20	Hs.435615	NM_000388	CASR	Calcium-sensing receptor (hypocalcemic hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism)	CASR
21	Hs.120949	NM_000072	CD36	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36
22	Hs.116471	NM_001797	CDH11	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	CDH11
23	Hs.520339	NM_000493	COL10A1	Collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	COL10A1
24	Hs.523446	NM_006629	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1	COL11A1
25	Hs.101302	NM_004370	COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1	COL12A1
26	Hs.409662	NM_021110	COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)	COL14A1
27	Hs.409034	NM_001855	COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1	COL15A1
28	Hs.369921	NM_001856	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	COL16A1
29	Hs.117938	NM_000494	COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1	COL17A1
30	Hs.517356	NM_030562	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	Endostatin/KNO
31	Hs.437567	NM_001858	COL19A1	Collagen, type XIX, alpha 1	COL19A1
32	Hs.172928	NM_000083	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	COL1A1
33	Hs.489142	NM_000389	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	COL1A2
34	Hs.408182	NM_001844	COL2A1	Collagen, type II, alpha 1 (primary osteoarthritis, spondyloepiphyseal dysplasia, congenital)	COL2A1
35	Hs.443025	NM_000390	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	COL3A1
36	Hs.471525	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	COL4A3
37	Hs.282938	NM_000092	COL4A4	Collagen, type IV, alpha 4	COL4A4
38	Hs.369809	NM_033380	COL4A5	Collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	COL4A5
39	Hs.210283	NM_000093	COL5A1	Collagen, type V, alpha 1	COL5A1
40	Hs.476218	NM_000094	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive)	COL7A1
41	Hs.418012	NM_001862	COL9A2	Collagen, type IX, alpha 2	COL9A2
42	Hs.1584	NM_000095	COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	COMP
43	Hs.1349	NM_000758	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GM-CSF
44	Hs.2253	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	G-CSF
45	Hs.523894	NM_000386	CTSK	Cathepsin K (pseudoxanthoma)	CTSK
46	Hs.156316	NM_001920	DCN	Decorin	Decorin
47	Hs.128556	NM_004407	DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein	Dmp1
48	Hs.447902	NM_014208	DSPP	Dentin sialoposphoprotein	DSPP
49	Hs.419815	NM_001983	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	EGF
50	Hs.488293	NM_005228	EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-abl) oncogene homolog, vian)	EGFR
51	Hs.283949	NM_031889	ENAM	Enamelin	ENAM

Oligo GEArray® Human Osteogenesis Microarray

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description	Gene Name
92	Hs.153863	NM_005585	SMAD5	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila)	MADH5
93	Hs.485087	NM_005904	SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	MADH7
94	Hs.528830	NM_005905	SMAD9	SMAD, mothers against DPP homolog 9 (Drosophila)	MADH9
95	Hs.349204	NM_025237	SOST	Sclerostin	SOST
96	Hs.2316	NM_000346	SOX9	SOX9 (sex determining region Y-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal))	SOX9
97	Hs.111779	NM_003118	SPARC	Secreted phosphoprotein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	ON
98	Hs.313	NM_000582	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein 2, early T-lymphocyte activation 1)	Osteopontin
99	Hs.37048	NM_003154	STATH	Stathephin	STATH
100	NM_020225	NM_012143	TFPI1	Tuftsin interacting protein 11	TFPI1
101	Hs.1103	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1 (Canurati-Erdheimann disease)	TGFb1
102	Hs.133379	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	TGFb2
103	Hs.2025	NM_003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3	TGFb3
104	Hs.494622	NM_004612	TGFBRI	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)	ALK-6/ACVRLK4
105	Hs.82028	NM_003242	TGFBRI2	Transforming growth factor, beta receptor II (700kDa)	TGFbRI2
106	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNFA
107	Hs.489922	NM_020127	TUFT1	Tuftelin 1	TUFT1
108	Hs.66744	NM_000474	TWIST1	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3, Saethra-Chutzgen syndrome) (Drosophila)	TWIST
109	Hs.422585	NM_057179	TWIST2	Twist homolog 2 (Drosophila)	TWIST2
110	Hs.109225	NM_001078	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	VCAM-1/CD106
111	Hs.524368	NM_000376	VDR	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	VDR
112	Hs.73793	NM_003376	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGF
113	Hs.78791	NM_003377	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B	VEGF-B
114	Hs.435213	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	VEGF-C
115	N/A	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	PUC18
116	Blank	Blank	Blank		0
117	Blank	Blank	Blank		0
118	N/A	N/A	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/95)	N/A
119	N/A	N/A	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(56/95)	N/A
120	N/A	N/A	AS1	Artificial Sequence 1	N/A
121	Hs.544577	NM_002046	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
122	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	B2M
123	Hs.509736	NM_007355	HSPCB	Heat shock 90kDa protein 1, beta	HSP90 b
124	Hs.609736	NM_007355	HSPCB	Heat shock 90kDa protein 1, beta	HSP90 b
125	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
126	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
127	N/A	N/A	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	N/A
128	N/A	N/A	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	N/A

Oligo GEArray® Human Osteogenesis Microarray

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description	Gene Name
52	Hs.483635	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	FGF1
53	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	FGF2
54	Hs.37092	NM_005247	FGF3	Fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-abl) oncogene homolog)	INT2
55	Hs.549034	NM_000804	FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	FLG
56	Hs.533683	NM_000141	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crozon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Waels syndrome)	FGFR2
57	Hs.1420	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, fibroblast growth factor receptor 3, fibroblast growth factor receptor 3, fibroblast growth factor receptor 3)	FGFR3
58	Hs.507621	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	VEGFR1
59	Hs.203717	NM_002026	FN1	Fibronectin 1	Fibronectin-1
60	Hs.2171	NM_004982	GDF10	Growth differentiation factor 10	BMP3B
61	Hs.518726	NM_004987	IBSP	Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II)	BNSP
62	Hs.515126	NM_000201	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	CD54
63	Hs.105582	NM_000816	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF-1
64	Hs.20573	NM_000875	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	IGF-1R
65	Hs.549043	NM_000812	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	IGF-II
66	Hs.519304	NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1	CD49a
67	Hs.482077	NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49b, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	LFA1b/CD49B
68	Hs.265929	NM_002204	ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49c, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	CD49C
69	Hs.172631	NM_000632	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)	CD11b
70	Hs.436873	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	Integrin aV
71	Hs.429052	NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDP2, MSK1/2)	CD29
72	Hs.365706	NM_000900	MGP	Matrix Gla protein	MGP
73	Hs.121280	NM_004897	MINPP1	Multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1	MINPP1
74	Hs.2258	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	MMP-10
75	Hs.2936	NM_002427	MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	MMP-13
76	Hs.513617	NM_004630	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	MMP-2
77	Hs.181839	NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MMP-8
78	Hs.151738	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	MMP-9
79	Hs.424014	NM_002445	MSX1	Msh homeo box homolog 1 (Drosophila)	MSX2
80	Hs.89404	NM_002449	MSX2	Msh homeo box homolog 2 (Drosophila)	MSX2
81	Hs.431926	NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	KBF1
82	Hs.376032	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF a
83	Hs.495834	NM_000444	PHEX	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (hypophosphatemia, vitamin D resistant rickets)	PHEX
84	Hs.122116	NM_004348	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	CBFA1
85	Hs.238813	NM_005605	SCARB1	Scavenger receptor class B, member 1	CD36L1
86	Hs.241579	NM_001235	SERPINH1	Sarain (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1 (collagen binding protein 1)	CBP1/2
87	Hs.549050	NM_005900	SMAD1	SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)	SMAD1/MADH1
88	Hs.465081	NM_005901	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)	MADH2
89	Hs.549051	NM_005902	SMAD3	SMAD, mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	MADH3
90	Hs.75862	NM_005903	SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)	MADH4/ID4PC4
91	Hs.167700	NM_005903	SMAD5	SMAD, mothers against DPP homolog 5 (Drosophila)	MADH5

Oligo GEArray® Human Osteogenesis Microarray

Array Layout Table with Gene Symbol and Position Information

	RPS27A	AHSG	ALPL	AMBN	AMELY	ANXA5	ARSE	BGLAP	
	1	2	3	4	5	6	7	8	OHS-026
	BGN	BMP1	BMP2	BMP3	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	
	9	10	11	12	13	14	15	16	
	BMP8B	BMPRIA	CALCR	CASR	CD36	CDH11	COL10A1	COL11A1	
	17	18	19	20	21	22	23	24	
	COL12A1	COL14A1	COL15A1	COL16A1	COL17A1	COL18A1	COL18A1	COL1A1	
	25	26	27	28	29	30	31	32	
	COL1A2	COL2A1	COL3A1	COL4A3	COL4A4	COL4A5	COL5A1	COL7A1	
	33	34	35	36	37	38	39	40	
	COL9A2	COMP	CSF2	CSF3	CTSK	DCN	DMP1	DSPP	
	41	42	43	44	45	46	47	48	
	EGF	EGFR	ENAM	FGF1	FGF2	FGF3	FGFR1	FGFR2	
	49	50	51	52	53	54	55	56	
	FGFR3	FLT1	FN1	GDF10	IBSP	ICAM1	IGF1	IGF1R	
	57	58	59	60	61	62	63	64	
	IGF2	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGAM	ITGAV	ITGB1	MGP	
	65	66	67	68	69	70	71	72	
	MINPP1	MMP10	MMP13	MMP2	MMP8	MMP9	MSX1	MSX2	
	73	74	75	76	77	78	79	80	
	NFKB1	PDGFA	PHEX	RUNX2	SCARB1	SERPINH1	SMAD1	SMAD2	
	81	82	83	84	85	86	87	88	
	SMAD3	SMAD4	SMAD5	SMAD6	SMAD7	SMAD9	SOST	SOX9	
	89	90	91	92	93	94	95	96	
	SPARC	SPP1	STATH	TFPI1	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBRI	
	97	98	99	100	101	102	103	104	
	TGFBRI2	TNF	TUFT1	TWIST1	TWIST2	VCAM1	VDR	VEGF	
	105	106	107	108	109	110	111	112	
	VEGFB	VEGFC	PUC18	Blank	Blank	AS1R2	AS1R1	AS1	
	113	114	115	116	117	118	119	120	
	GAPD	B2M	HSPCB	HSPCB	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C	
	121	122	123	124	125	126	127	128	

# Príloha 2: Přejhled a mapa genů angiogeneze

Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray

Position/UniGene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name	
1	Hs.311640	NM_002954	RPS27A	Ribosomal protein S27a	RPS27A
2	Hs.308861	NM_005126	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1
3	Hs.2463	NM_001148	ANGPT1	Angiotensin 1	Angiotensin 1
4	Hs.115181	NM_001147	ANGPT2	Angiotensin 2	Angiotensin-2
5	Hs.209153	NM_014495	ANGPTL3	Angiotensin-like 3	ANGPTL3
6	Hs.9613	NM_016109	ANGPTL4	Angiotensin-like 4	ANGPTL4
7	Hs.1236	NM_001150	ANPEP	Alanine (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	ANPEP
8	Hs.194654	NM_001702	BAI1	Bran-specific angiogenesis inhibitor 1	BAI1
9	Hs.54460	NM_002986	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	Eotaxin
10	Hs.303648	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	MCP1/SCYA2
11	Hs.76206	NM_001795	CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	Cadherin 5
12	Hs.413175	NM_030682	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	Endostatin/KNO
13	Hs.407817	NM_020091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	COL4A3
14	Hs.2283	NM_000759	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	G-CSF
15	Hs.789	NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	GROα/MGSA
16	Hs.413924	NM_021505	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	SCYE10/HP-10
17	Hs.103982	NM_005400	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	ITAC/IP9/SCYB11
18	Hs.75765	NM_002089	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	MIP-2α/GROβ
19	Hs.89690	NM_002090	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	GRO3
20	Hs.89714	NM_002094	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78/SCYB5
21	Hs.184021	NM_002993	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	GCP-2/SCYB6
22	Hs.77367	NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	MIG
23	Hs.435067	NM_001953	ECGF1	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	PDECGF
24	Hs.154210	NM_001400	EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1
25	Hs.399713	NM_182685	EFNA1	Ephrin A1	EFNA1
26	Hs.158306	NM_001405	EFNA2	Homo sapiens ephrin-A2	Ephrin A2
27	Hs.37054	NM_004952	EFNA3	Ephrin A3	EFNA3
28	Hs.37142	NM_001962	EFNA4	Ephrin A4	EFNA4
29	Hs.30942	NM_004093	EFNB2	Ephrin B2	Ephrin B2
30	Hs.410815	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	EGF
31	Hs.76753	NM_000918	ENG	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	Endoglin
32	Hs.8136	NM_001430	EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1	EPAS1
33	Hs.43908	NM_004444	EPHB4	EphB4	EPHB4
34	Hs.115263	NM_001432	EREG	Eregulin	EREG
35	Hs.76530	NM_000506	F2	Coagulation factor II (thrombin)	Prothrombin
36	Hs.278954	NM_000600	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	FGF1
37	Hs.294242	NM_000601	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	FGF2
38	Hs.166015	NM_020986	FGF6	Fibroblast growth factor 6	HST2
39	Hs.1420	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)	FGFR3
40	Hs.11392	NM_004469	FIGF	C-Fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	VEGF-D/FIGF
41	Hs.347713	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor receptor)	VEGFR1
42	Hs.388245	NM_000673	HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2	HAND2
43	Hs.396530	NM_000801	HGF	Hepatocyte growth factor (heparin-binding EGF scatter factor)	HGF
44	Hs.412416	NM_001390	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF1A
45	Hs.44227	NM_006665	HPSE	Heparanase	Heparanases
46	Hs.410900	NM_002165	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID1
47	Hs.76884	NM_002167	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	ID3
48	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1	IFNA1
49	Hs.83177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFNB1

Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray

Position/UniGene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name	
84	Hs.89640	NM_000459	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (various malformations, multiple cutaneous and mucosal)	Tie-2
85	Hs.170009	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha	TGFα
86	Hs.1103	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)	TGFβ1
87	Hs.169300	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	TGFβ2
88	Hs.2026	NM_003239	TGFB3	Transforming growth factor, beta 3	TGFβ3
89	Hs.28005	NM_004612	TGFBRI	Transforming growth factor, beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)	ALK-5/ACVRLK4
90	Hs.184226	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	TSP1
91	Hs.458354	NM_003247	THBS2	Thrombospondin 2	Thrombospondin2
92	Hs.78824	NM_005424	TIE	Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains	Tie-1
93	Hs.446841	NM_003254	TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiation activity, collagenase inhibitor)	TIMP1
94	Hs.8441	NM_003255	TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2
95	Hs.245188	NM_000362	TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammation)	TIMP3
96	Hs.241670	NM_000594	TNFA	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNFA
97	Hs.101382	NM_002691	TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	B94
98	Hs.355899	NM_016639	TNFRSF12A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	TNFRSF12A
99	Hs.241382	NM_005118	TNFRSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	VEG1
100	Hs.70860	NM_003283	TNNT1	Tropomyosin T1, skeletal, slow	TNNT1
101	Hs.75793	NM_003376	VEGF	Vascular endothelial growth factor	VEGF
102	Hs.78781	NM_003377	VEGFB	Vascular endothelial growth factor B	VEGF-B
103	Hs.78141	NM_006429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	VEGF-C
104	Hs.284216	NM_018046	VG5Q	Angiogenesis factor VG5Q	HSU84971
105	N/A	N/A	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	pUC18
106	Blank	Blank	Blank		0
107	Blank	Blank	Blank		0
108	N/A	N/A	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)48/60	N/A
109	N/A	N/A	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (80% identity)58/60	N/A
110	N/A	N/A	AS1	Artificial Sequence 1	N/A
111	Hs.169476	NM_002046	GAPD	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH
112	Hs.48516	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	B2M
113	Hs.74335	NM_007355	HSPCB	Heat shock 90kDa protein 1, beta	HSP90 b
114	Hs.74335	NM_007355	HSPCB	Heat shock 90kDa protein 1, beta	HSP90 b
115	Hs.426930	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
116	Hs.426930	NM_001101	ACTB	Actin, beta	b-Actin
117	N/A	N/A	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	N/A
118	N/A	N/A	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	N/A

Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray

Position/UniGene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name	
50	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	IFN-γ
51	Hs.303053	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF-1
52	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10	IL-10
53	Hs.873	NM_000882	IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	IL-12A
54	Hs.83077	NM_001562	IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	IL-18
55	Hs.126256	NM_000578	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1β
56	Hs.812234	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL-6
57	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8	IL-8
58	Hs.436873	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD61)	Integrin αV
59	Hs.87149	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/ITGP3A
60	Hs.409202	NM_000214	JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)	JAG1
61	Hs.12337	NM_002253	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor)	FLK1/VEGFR2
62	Hs.11669	NM_000580	LAMA5	Laminin, alpha 5	LAMAS
63	Hs.421391	NM_007015	LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	LECT1
64	Hs.194236	NM_000230	LEP	Leptin (obesity homolog, mouse)	Leptin
65	Hs.82045	NM_002391	MDK	Middle kinase (neurtin growth-promoting factor 2)	Middle kinase
66	Hs.154057	NM_002428	MMP19	Matrix metalloproteinase 19	MMP19
67	Hs.367877	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	MMP-2
68	Hs.151738	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	MMP-9
69	Hs.438100	NM_004657	NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)	NOTCH4
70	Hs.219140	NM_002521	NPPB	Neurotrophin peptide precursor B	BNP
71	Hs.438884	NM_000905	NPR1	Naturalistic peptide receptor A (guanylate cyclase A (atrioatrial peptide receptor A))	NPR1
72	Hs.173548	NM_003873	NRP1	Neuropilin 1	Neuropilin 1
73	Hs.369746	NM_003872	NRP2	Neuropilin 2	Neuropilin 2
74	Hs.422899	NM_007083	NUDT6	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	NUDT6
75	Hs.376032	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFα
76	Hs.1876	NM_002808	PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma virus (v-src) oncogene homolog)	PDGFβ/SIS
77	Hs.78146	NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	CD31
78	Hs.81584	NM_002619	PF4	Platelet factor 4 (chemokine C-X-C motif) ligand 4	CD4/SCYB4
79	Hs.52820	NM_002632	PGF	Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	Placental growth factor
80	Hs.143436	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	uPA
81	Hs.143436	NM_002651	PLG	Plasminogen	PLG
82	Hs.125036	NM_020405	PLXDC1	Plaxin domain containing 1	PLXDC1
83	Hs.528965	NM_021935	PROK2	Prokinectin 2	PROK2
84	Hs.253300	NM_000314	PTEN	Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	PTEN
85	Hs.88474	NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX1
86	Hs.198384	NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-2
87	Hs.44	NM_002825	PTN	Pisiotropin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	NEGF1
88	Hs.283749	NM_001145	RNASE4	Ribonuclease, RNase A family, 4	RNASE4, ANG
89	Hs.173694	NM_002615	SERPINF1	Snake (or cyclase) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antipainin, pigment epithelium derived factor), member 1	PDF
90	Hs.103527	NM_003975	SH2D2A	SH2 domain protein 2A	SH2D2A
91	Hs.68091	NM_021972	SPHK1	Sphingosine kinase 1	SPHK1
92	Hs.301989	NM_015136	STAB1	Stabilin 1	STAB1
93	Hs.408249	NM_017564	STAB2	Stabilin 2	STAB2

Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray

Array Layout Table with Gene Symbol and Position Information

RPS27A								OHS-024							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCL1	CCL2	CDH5	COL18A1	COL4A3	CSF3	CXCL1	CXCL10								
9	10	11	12	13	14	15	16								
CXCL11	CXCL2	CXCL3	CXCL5	CXCL6	CXCL9	ECGF1	EDG1								
17	18	19	20	21	22	23	24								
EFNA1	EFNA2	EFNA3	EFNA5	EFNB2	EGF	ENG	EPAS1								
25	26	27	28	29	30	31	32								
EPHB4	EREG	F2	FGF1	FGF2	FGF6	FGFR3	FIGF								
33	34	35	36	37	38	39	40								
FLT1	HAND2	HGF	HIF1A	HPSE	ID1	ID3	IFNA1								
41	42	43	44	45	46	47	48								
IFNB1	IFNG	IGF1	IL10	IL12A	IL18	IL1B	IL6								
49	50	51	52	53	54	55	56								
IL8	ITGAV	ITGB3	JAG1	KDR	LAMA5	LECT1	LEP								
57	58	59	60	61	62	63	64								
MDK	MMP19	MMP2	MMP9	NOTCH4	NPPB	NPR1	NRP1								
65	66	67	68	69	70	71	72								
NRP2	NUDT6	PDGFA	PDGFB	PECAM1	PF4	PGF	PLAU								
73	74	75	76	77	78	79	80								
PLG	PLXDC1	PROK2	PTEN	PTGS1	PTGS2	PTN	RNASE4								
81	82	83	84	85	86	87	88								
SERPINF1	SH2D2A	SPHK1	STAB1	STAB2	TEK	TGFA	TGFB1								
89	90	91	92	93	94	95	96								
TGFB2	TGFB3	TGFBRI	THBS1	THBS2	TIE	TIMP1	TIMP2								
97	98	99	100	101	102	103	104								
TIMP3	TNF	TNFAIP2	TNFRSF12A	TNFSF15	TNNT1	VEGF	VEGFB								
105	106	107	108	109	110	111	112								
VEGFC	VG5Q	PUC18	Blank	Blank	AS1R2	AS1R1	AS1								
113	114	115	116	117	118	119	12								