

UNIVERZITA KARLOVA

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Osteogeneze a kostní hojení u vrozeně krátkého femuru

MUDr. Mgr. Monika Frydrychová



Praha, 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

Školící pracoviště: Ortopedická klinika 1. LF UK FN Bulovka

Školitel: prof. MUDr. Pavel Dungal, DrSc.

Konzultant: doc. MUDr. Martin Ošťádal, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obrázek na titulní straně: Pacient s vrozeně krátkým femurem a rentgenový obraz pánve a dolních končetin s nápadným zkratem levého stehna

Obsah

| | |
|--------------------------------|----|
| 1. Úvod..... | 6 |
| 2. Hypotézy a cíle práce..... | 7 |
| 3. Laboratorní část | 7 |
| 3.1. Materiál a metodika | 7 |
| 3.2. Výsledky..... | 7 |
| 4. Klinická část..... | 9 |
| 4.1. Materiál a metodika | 9 |
| 4.2. Výsledky..... | 10 |
| 5. Diskuse..... | 11 |
| 6. Závěr | 13 |
| 7. Literatura..... | 14 |

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

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)*. 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.

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 zaměřeni spíše na lokální příčiny. 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 faktory, 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. 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. 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 zařazeno vyšetření cévního zásobení končetiny CT angiografií. 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.)

2. Hypotézy a cíle práce

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.

3. Laboratorní část

3.1. Materiál a metodika

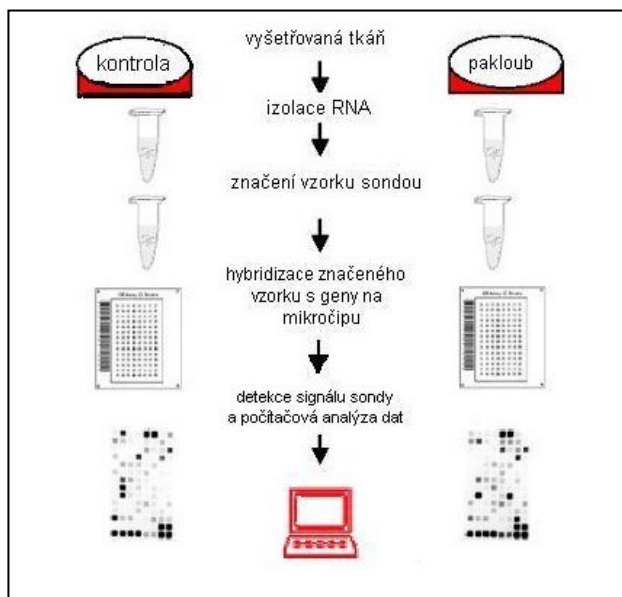
Vzorky fyziologické a patologické kostní tkáně byly odebrány během plánovaného ortopedického výkonu na základě informovaného souhlasu pacientů, respektive jejich rodičů. Tkáň pakloubu byla odebrána při plánované resekci a fúzi pakloubu u pacientů s PFFD.

Během laboratorní studie (2008-2012) jsme vyšetřili celkem 7 vzorků pacientů s PFFD a 3 kontrolní vzorky, některé analýzy byly opakovány. Pro izolaci RNA jsme využili technologie RNeasy Mini Kit (Qiagen) v souladu s doporučeným protokolem. Po izolaci RNA následovala syntéza cRNA (komplementární RNA), značení RNA biotinem a amplifikace. Po purifikaci vzorku amplifikované a značené RNA bylo třeba připravit biočipové membrány k samotné hybridizaci se vzorky (tzv. prehybridizací). 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 softwarem GEArray Expression Analysis Suite (SuperArray). Metoda umožňuje také semikvantitativní analýzu exprimovaných genů v závislosti na intenzitě detekovaného signálu. Schéma experimentu prezentuje obrázek 1.

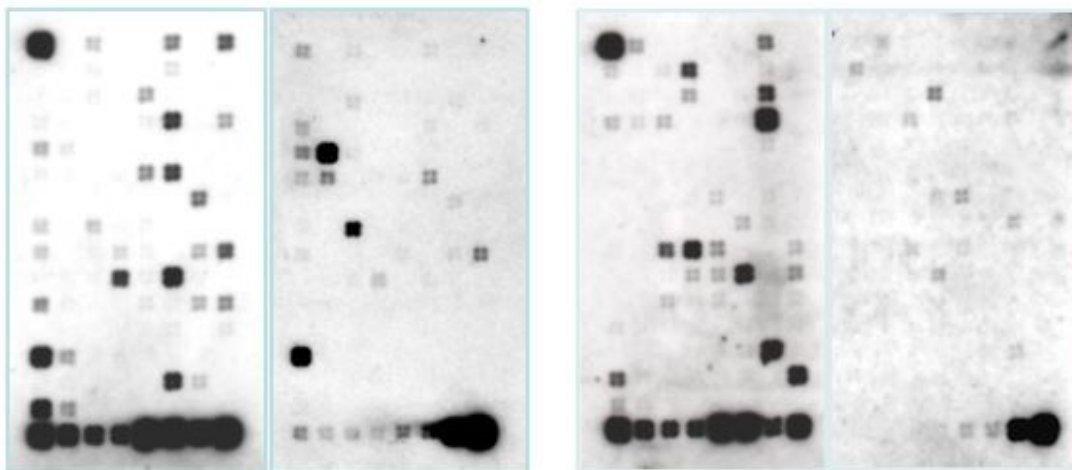
3.2. Výsledky

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. alfa 1, kolagen I podj. alfa 1, 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). Přehled genů zastoupených u vzorků pacientů s PFFD v porovnání s kontrolními vzorky uvádí fotografie mikročipů pacienta s PFFD v porovnání s kontrolním vzorkem (obr. 2a, b) a tabulka 1.



Obr. 1: 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 podrobeno počítačové analýze.



Obr. 2 a, b

Výsledek biočipové analýzy u kontrolního vzorku fyziologické kosti (levý z každé dvojice) a pacienta s PFFD (pravý z každé dvojice). Na obrázku 2 a) jsou výsledky exprese osteogenních faktorů, 2 b) angiogenních faktorů. Na biočipech pacientů s PFFD je patrně méně zachycených chemiluminiscenčních signálů, což vyjadřuje menší množství exprimovaných genů angiogeneze i osteogeneze a potvrzuje očekávaný rozdíl genové exprese.

| | 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 | | |

Tabulka 1: 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.

4. Klinická část

4.1. Materiál a metodika

Retrospektivně jsme analyzovali soubor pacientů registrovaných na naší klinice do roku 2018, což bylo 92 pacientů, 42 chlapců a 50 dívek. Analyzovali jsme průběh prolongace u pacientů s femorální deficiencí a zajímala nás doba prolongace, 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, někteří opakovaně, bylo hodnoceno celkem 83 prolongačních procedur, u kontrolní skupiny 14 prolongací u 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.

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

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).

4.2. Výsledky

Výsledky přehledně shrnuje tabulka, která udává průměrné hodnoty věku, prolongačního zisku a healing indexu u podskupin A,B,C a K (viz legenda k tabulce) a náležitím k opakovaným prolongačním procedurám (označeny v podskupinách římskými číslicemi I-III).

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

Tabulka 1: Soubor pacientů s PFFD, kteří podstoupili prolongaci 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 prolongaci (II a III). Ke každé skupině i prolongaci jsou zaznamenány statistické ukazatele, průměrný věk v době zahájení prolongace, průměrný zisk prolongace a průměrný healing index.

Statistické hodnocení:

- Nebyla prokázána souvislost HI a stupni postižení (Pappasovy klasifikace).
- Závislost na věku pacienta nebyla prokázána, významný rozdíl vykazovala skupina pacientů pod 5 let.
- Nebyl prokázán významný rozdíl průměrných HI mezi pacienty s PFFD a kontrolní skupinou.
- Statisticky významný rozdíl HI byl zaznamenán při druhé prolongaci
- Pokud byl odstup mezi první a druhou prolongací ≥ 7 let, byl HI významně menší než pod 7 let (3,32 vs 5,07).

5. Diskuse

Shodně 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).

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. 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.

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.

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.

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 ≥ 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 %. 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 se závažností 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.

6. 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.

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. Neprokovála se ani souvislost délky kostního hojení s typem defektu stehenní kosti, jak jsme původně předpokládali.

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.
- Neprokovála 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 neprokázala se souvislost s hojením kostí po prolongaci a stupněm postižení femuru.
- Při indikaci prolongační 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 prolougace – při prolongaci více než 5 cm profylaktická osteosyntéza
 - pokud je nutná opakovaná prolougace, pak respektovat interval delší než 7 let mezi operacemi.

7. 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 JI: Factors leading to hip subluxation and dislocation in femoral lengthening of unilateral congenital short femur. J Pediat Orthop, 2001, 21: 354-359.
- Court C, Carlouz 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, Jaquiere 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 paklobu 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., Dungal 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., Dungal 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, Macheck 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, Masek 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., Tvrđík 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., Tvrđík 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.**, Dungal 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, **Frydrychová M**, Kubes R. Anteromedial wedge reduction osteotomy 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., Dungl 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.**, Dungl 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, Dungl P. Vývojová dysplazie kyčelního kloubu. *Solen, Pediatrie pro Praxi* 2016; 17(3)

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

Ošřádal M., Chomiak J., Dungl 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., Dungl P., Ošřádal 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.