

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Lékařská biofyzika



MUDr. Bc. Martin Horák

**Příspěvek k radiodiagnostice a k léčbě vybraných patologických lézí
femuru v dětském a dospělém věku**

**Contribution to radiodiagnosics and to treatment of chosen pathological lesions of
femur in childhood and in adults**

Autoreferát disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Lékařská biofyzika

Předseda oborové rady: prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.

Školící pracoviště: Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK, Salmovská 1, 120 00 Praha 2

Školitel: doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.

Korespondenční adresa:

MUDr. Bc. Martin Horák

Radiodiagnostické oddělení Nemocnice Na Homolce

Roentgenova 2, 150 30, Praha 5

e-mail: martin.horak@homolka.cz

Práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva zdravotnictví České republiky č. MZ 0002384101.

Obsah

Abstrakt (ČJ)	1
Abstract (AJ)	3
1. Úvod	5
1.1. Úvod do problematiky PFFD	5
1.1.1. Klasifikace PFFD	6
1.1.1.1. Klasifikace PFFD sec. Pappas	6
1.1.2. Zobrazovací metody	6
1.1.2.1. RTG vyšetření	7
1.1.2.2. UZ vyšetření	7
1.1.2.3. MR vyšetření	7
1.1.2.4. CT vyšetření	7
1.1.2.5. Arthrografické vyšetření	7
1.2. Úvod do problematiky posttraumatických defektů kloubní chrupavky distálního femuru	8
2. Cíle práce	9
3. Materiál a metody	10
3.1. Soubor pacientů PFFD	10
3.1.1. Použité vyšetřovací metody	10
3.1.1.1. RTG	10
3.1.1.2. CT	10
3.1.1.3. Bioptické vyšetření vzorků kyčelních kloubů	11
3.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru	11
3.2.1. Soubor pacientů	11
3.2.2. Diagnostický a léčebný postup	11
3.2.3. Radiologické vyšetření oblastí postižené chrupavky	11
3.2.4. Histopatologické vyšetření vzorků chrupavky z arthroscopického vyšetření	12
3.2.5. Kontrolní skupina	12
3.2.6. Imunohistochemické vyšetření	12
4. Výsledky	13
4.1. PFFD	13
4.1.1. Reklasifikace typu PFFD podle CT nálezu	13
4.1.2. Mobilita epifýzy hlavice kyčle v acetabulu u typu III sec. Pappas	13
4.1.3. Cévní změny u PFFD	14
4.1.3.1. Změna uložení bifurkace AFC (sledovaný odstup AFP) na postižené straně	14
4.1.3.2. Paradoxní uložení bifurkace AFC	14
4.1.3.3. Vysoké uložení bifurkace AIC na postižené straně	14
4.1.3.4. Anomální cévní zásobení postižené dolní končetiny	14
4.1.3.4.1. Pacient č. 2 mužského pohlaví typ III sec. Pappas vlevo	14
4.1.3.4.2. Pacient č. 3 mužského pohlaví typ III sec. Pappas vpravo	15
4.1.4. Radiační zátěž u vyšetřovaných pacientů s PFFD	16
4.1.5. Histologické změny u pacientů s PFFD	17
4.2. Posttraumatický defekt chrupavky	17

4.2.1. Nálezy u pacientů s transplantací autologních chondrocytů.....	17
4.2.1.1. Histologické nálezy v reziduální kloubní chrupavce z místa kloubních defektů	17
4.2.1.2. Histologická struktura skafoldů použitých při transplantaci.....	17
4.2.1.3. Chrupavka nově vytvořená po transplantaci autologních chondrocytů	18
4.2.1.4. RT-PCR analýza.....	18
4.2.2. Přehled současných zobrazovacích metod při diagnostice defektů kloubní chrupavky.....	18
4.2.3. Nálezy defektů chrupavky zachycené na MR obrazech	19
5. Diskuse	20
5.1. PFFD.....	20
5.1.1. Klinický nález a průběh	20
5.1.2. Diferenciální diagnostika	20
5.1.3. Terapie	20
5.1.4. Cévní zásobení a jeho anomálie.....	21
5.1.5. Radiační zátěž a možné alternativní postupy.....	23
5.1.6. Dávky u PFFD	24
5.1.7. Histopatologické nálezy a možné patofyziologické mechanismy	24
5.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru	25
5.2.1. Histologické nálezy a možné patofyziologické mechanismy	25
5.2.2. Výsledky transplantace autologních chondrocytů s porovnáním dvou různých biomateriálů	25
5.2.3. Biodegradabilita použitých nosičů.....	26
5.2.4. Použití MR při sledování transplantátu.....	26
6. Závěry.....	27
6.1. PFFD.....	27
6.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky	27
7. Obrazová dokumentace	28
8. Seznam použitých zkratk, symbolů a pojmů	29
9. Seznam literatury.....	30
10. Seznam publikací doktoranda	33

Abstrakt (ČJ)

Úvod

Radiodiagnostické vyšetření s využitím moderních specializovaných zobrazovacích metod, zejména CT a MR, má zásadní význam v diagnostice vrozených i získaných chorob pohybového aparátu. V první části se disertace zabývá problematikou některých vrozených defektů proximálního konce femuru, označovaných v literatuře jako vrozeně krátký femur (PFFD). V této části jsou shrnuty vlastní zkušenosti s radiologickými nálezy v předoperačním i pooperačním období, přičemž maximální pozornost je věnována problematice cévního zásobení postižené oblasti.

Druhá část práce se věnuje některým otázkám transplantace autologních chondrocytů fixovaných na dva různé nosiče implantované do posttraumatických defektů kloubní chrupavky distálního femuru. Radiologické nálezy jsou hodnoceny ve vztahu k nálezům histopatologickým.

Cíle

První část studie, po rozdělení pacientů s PFFD podle stávající běžně používané rentgenové klasifikace, si stanovila za cíl upřesnit pomocí CT skenů v rozsahu kyčelních kloubů u každého pacienta diagnózu PFFD, podrobně zhodnotit změny v okolí postižení, zejména průběh cév, vzhledem k věku pacientů vyhodnotit radiační zátěž při opakovaných vyšetřeních RTG metodami a histologicky vyšetřit tkáňové vzorky z oblasti postižení odebrané při korekčních operacích.

Druhá část studie se zabývá pacienty s posttraumatickou lézí kloubní chrupavky distálního femuru detekovatelnou MR vyšetřením. Po následné transplantaci autologních chondrocytů za použití dvou různých skafoldů (Hyalograft C, Fidia Advanced Polymeres, Abano Terme, Itálie a Chondrograft, NTC, FN Brno - Bohunice) těmto pacientům a po opakovaných kontrolách kolenního kloubu (artroskopicky za 10 – 12 měsíců po transplantaci a MR za 4 roky od vstupního vyšetření) byl vytyčen cíl porovnat dosažené výsledky u obou použitých biomateriálů a vzájemně korelovat radiologické i histopatologické nálezy.

Materiál a metody

První soubor 21 pacientů (13 chlapců a 8 děvčat) zahrnoval nově příchozí pacienty, nemocné v průběhu léčby i po ukončené terapii. Pacienti věku 1 – 17 let byli sledováni po dobu čtyř let. Každý pacient byl opakovaně vyšetřen na RTG a na začátku sledování i na CT metodou CTAG. U 6 pacientů byly histologicky vyšetřeny tkáňové vzorky z postižené oblasti získané při rekonstrukční operaci.

Do druhého souboru bylo zařazeno 30 dospělých pacientů (25 mužů a 5 žen) s průměrným věkem 33 let, u nichž byla převážně artroskopicky stanovena diagnóza posttraumatického defektu kloubní chrupavky v oblasti femorálních kondylů. Bioptické vyšetření bylo provedeno ze vzorků odebraných při artroskopickém vyšetření 12 pacientů, kterým byl transplantován Hyalograft C na Ortopedické klinice 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce, a od 18 pacientů léčených transplantací Chondrograftu na Klinice dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN Motol. Každý z 30 pacientů měl postižený kolenní kloub dvakrát vyšetřen pomocí MR - poprvé v průběhu měsíce od provedené transplantace a podruhé s odstupem 4 let od prvního vyšetření. Kontrolním materiálem pro hodnocení normální struktury chrupavky byly hlavice femuru od 7 náhle zemřelých a od 15 nemocných po TEP pro traumatickou zlomeninu krčku. Druhou kontrolní skupinu tvořilo 12 těžce osteoartroticky změněných hlavice femuru odstraněných při TEP. Chrupavka hlavice femuru jako kontrola byla zvolena pro lepší dostupnost materiálu.

Výsledky

Na základě CT nálezu byla u 1 pacienta reklasifikována diagnóza PFFD z typu II na typ III sec. Pappas. CT řezy umožnily sledovat mobilitu hlavice femuru. CTAG vyšetření kromě změn v průměru AFC prokázalo i změny polohy bifurkace AFC na postižené straně a paradoxní

proximální uložení bifurkace AFC na straně kontralaterální. U 2 pacientů se zjistilo anomální cévní zásobení celé postižené dolní končetiny, což dosud nebylo v odborné literatuře zaznamenáno. Zhodnocení radiační zátěže přineslo zjištění, že u výkonnějších přístrojů používaných při moderních metodách se celková radiační zátěž ve srovnání s klasickým RTG vyšetřením zvyšuje, ale získá se nesrovnatelně více informací. Histologické nálezy potvrdily u PFFD poruchu enchondrální osifikace.

U posttraumatických defektů kloubní chrupavky distálního femuru oba transplantační postupy přinesly dobré klinické výsledky. Při histologickém vyšetření nově vytvořené chrupavkové tkáně nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami pacientů, přestože použité nosiče i kultury chondrocytů se zásadním způsobem lišily. Hyalograft C sestával z nediferencovaných mezenchymálních buněk a z vláken esteru kyseliny hyaluronové, Chondrograft byl tvořen fibrinem a částečně diferencovanými chondrocyty. Opakovaným MR vyšetřením se ukázalo, že transplantát byl dobře funkční a ani po 4 letech neměnil svůj charakter ani velikost.

Závěr

U PFFD lze doporučit do vyšetřovacího algoritmu zařadit jedno CT vyšetření formou CTAG. Správným CTAG vyšetřením se snižuje radiační dávka na nezbytné minimum a přitom přínos informací je rozsáhlý včetně určení dalšího směřování terapie.

Transplantace dvou odlišných nosičů, jak s kulturou různě vyzrálých prekurzorů mezenchymálních buněk tak nezralých chondrocytů, vedla k vyhojení posttraumatických defektů kloubní chrupavky a k vytvoření souvislého kloubního krytu velmi podobného vzhledu. Přes pozitivní výsledky transplantace ani v jedné skupině nebyla transformace v hyalinní chrupavku úplná. Je možné, že artroskopický odběr druhého vzorku byl příliš časný a nelze vyloučit, že v pozdější fázi by restaurace chrupavky byla již kompletní.

Klíčová slova

PFFD, CTAG, cévní anomálie, radiační zátěž, vrozený paklob kyčelního kloubu, posttraumatický defekt kloubní chrupavky, kolenní kloub, transplantace autologních chondrocytů, Hyalograft C, Chondrograft, magnetická rezonance, bioptické vyšetření, imunohistochemie

Abstract (AJ)

Introduction

Radiology examination using specialized modern imaging methods, including CT and MRI, is essential in the diagnosis of congenital and acquired diseases of the musculoskeletal system. The first part of the dissertation deals with certain congenital defects of the short femur, known in the literature as proximal femoral focal deficiency (PFFD). This part summarizes our experience with the radiological findings in the preoperative and postoperative period, with the main attention to the vascular supply to the affected area.

The second part of the presentation deals with some aspects of autologous chondrocyte transplantation fixed at two different carriers implanted into post-traumatic articular cartilage defects of the distal femur. Radiological findings are evaluated in the relation to the histopathological findings.

Objectives

The first part of the study after the distribution of patients with PFFD by current commonly used radiographic classification sets the objective in the extent of scans of the hip joints to specify diagnosis PFFD in each patient and to evaluate in detail changes in the area of disability, especially a course of blood vessels. The evaluation of the radiation burden of repeated X-ray measurements was done with respect to the age of the patients. Tissue samples from the area of disability taken during the corrective surgery were examined histologically, to confirm osteocartilaginous defect in the affected area.

In the second part of the study patients with traumatic lesions of the articular cartilage of the distal femur with a detectable MR examination were selected. After a subsequent transplant of autologous chondrocytes using two different scaffolds (Hyalograft C, Fidia Advanced Polymeres, Abano Terme, Italy and Chondrograft, National Tissue Bank, University Hospital Brno – Bohunice) and after repeated exams of the knee (arthroscopically for 10 – 12 months after transplantation and MR for 4 years from baseline) the aim was to compare the results of both biomaterials and mutually correlate radiological and histopathological findings.

Material and Methods

The first group of 21 patients (13 boys and 8 girls) including newly arrived patients, patients during treatment and post therapy was in the age of 1-17. At the beginning of monitoring each patient was repeatedly examined by X-ray and on CT using CTAG method. 6 patients had their tissue samples examined from the affected area obtained during reconstructive surgery.

The second group included 30 adults (25 men and 5 women) with an average age of 33 years who were arthroscopically diagnosed with post-traumatic articular cartilage defects of the femoral condyles. Biopsy was performed from the samples taken during arthroscopic examination. 12 patients received transplants of Hyalograft C on the Department of Orthopedics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague and Hospital Na Bulovce and 18 patients received transplants of Chondrograft, on Department of Orthopedics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague and Motol University Hospital. The control material for the normal structure of the femoral head cartilage was taken from 7 suddenly diseased and from 15 patients after TEP for traumatic fracture of the femoral neck. The second control group consisted of 12 heavily modified osteoarthrotic femoral heads removed during TEP implantation. Each of the 30 patients had the affected knee joint examined by MR twice - the first time during the month after transplantation and again at about 4 years from the first examination.

Results

Based on CT one patient was reclassified from PFFD diagnosis type II to type III sec. Pappas. CT scans allow tracking the mobility of the femoral head. CTAG examination in addition to changes in the diameter of AFC showed also changes of the position of the bifurcation of AFC on the affected side and even paradoxical proximal bifurcation of AFC on the contralateral side. In 2 patients these exams revealed a new abnormal vascular pattern around the affected lower limb which has not been reported in the literature before. Evaluation of the applied radiation dose brought about the finding that powerful new imaging methods used in modern modalities, with the respect to the overall radiation dose compared with the conventional X-ray examination, are higher but they give more valuable information. Histological findings in PFFD confirmed tissue failure in endochondral ossification.

Both transplant procedures for post-traumatic articular cartilage defects of the distal femur have produced good clinical results. Histological examination of the newly formed cartilage tissue showed no significant differences between the two groups of patients despite the difference in carriers and chondrocyte cultures. Hyalograft C consisted of predominantly undifferentiated mesenchymal cells and fibers of hyaluronic acid ester, Chondrograft was formed of fibrin and partially differentiated chondrocytes. Repeated MR examination showed that the transplants were functioning well and after 4 years did not change neither its character nor its size.

Conclusion

In the diagnostic algorithm of PFFD treatment it can be recommended to include one CT examination probably in the form of CTAG. The proper CTAG can lower the radiation dose to the necessary minimum and still reach an enormous benefit of information including the future trend of the therapy.

Transplantation of two different scaffolds with cultures of mesenchymal precursor cells of the various degrees of maturity or immature chondrocytes led to the healing of post-traumatic defects of articular cartilage and to the formation of a joint cover of very similar appearance. However, despite the positive results of the transplantation, neither group reached complete hyaline cartilage transformation. It is possible that the arthroscopic collection of the second sample was taken too early and there is also a possibility that at a later stage the cartilage recovery will be completed.

Key words

PFFD, CTAG, vascular anomaly, radiation proximal femoral focal deficiency, posttraumatic defect of articular cartilage, knee joint, autologous chondrocyte transplantation, Hyalograft C, Chondrograft, magnetic resonance imaging, biopsy examination, immunohistochemistry

1. Úvod

Radiodiagnostické vyšetření má zásadní význam v diagnostice vrozených i získaných chorob pohybového aparátu nenádorového původu. Kromě základního rentgenového (RTG) vyšetření jsou v současnosti za tímto účelem hojně využívány další specializované zobrazovací metody, které v podstatné míře zpřesňují diagnostické závěry. Přesná znalost krevního zásobení a dalších topografických poměrů v oblasti patologické kostní léze usnadňuje volbu nejvhodnějšího operačního přístupu. Na druhé straně korelace rentgenologických a operačních nálezů se závěry bioptického vyšetření umožňuje proniknout v řadě případů k vlastní podstatě problému a někdy přímo ověřit výsledky reparativních a regenerativních pochodů při léčbě defektů tkání např. transplantací technikou.

Disertační práce se zabývá problematikou některých vrozených defektů proximálního konce femuru, označovaných v literatuře jako *vrozeně krátký femur* (PFFD). V této pasáži shrnujeme své zkušenosti s radiologickými nálezy z předoperačního i pooperačního období, přičemž maximální pozornost jsme věnovali problematice cévního zásobení dané oblasti, ve které jsme zaznamenali některé prioritní nálezy (1). Druhá část naší prezentace se věnuje některým otázkám transplantace autologních chondrocytů fixovaných na různé nosiče, implantované do posttraumatických defektů kloubní chrupavky distálního femuru. V této části dizertace hodnotíme radiologické nálezy před i po transplantaci chondrocytů a koreluje je s nálezy histopatologickými. Podkladem ke studiu nám byly dva soubory pacientů z Ortopedické kliniky 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce a z Kliniky dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol. V rámci této spolupráce jsme se pod vedením profesora MUDr. Ctibora Povýšila, DrSc. z Ústavu patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze podíleli na histologickém a imunohistochemickém porovnání dvou různých transplantátů, použitých při léčbě defektů kloubní chrupavky distálního femuru. Při bioptickém vyšetření vzorků odebraných z regenerovaného chrupavkového krytu při kontrolní druhé artroskopii jsme zároveň studovali strukturu nově vzniklé chrupavky. Artroskopickou diagnostiku i vlastní transplantaci provedli docent MUDr. Aleš Podškubka, CSc. a docent MUDr. Milan Handl, Ph.D. z výše zmíněných ortopedických klinik. Výsledky této týmové spolupráce byly shrnuty v publikaci (2).

1.1. Úvod do problematiky PFFD

Vrozeně krátký femur zahrnuje spektrum vývojových poruch dolní končetiny s převahou postižení stehenní kosti, které může být různě závažné. Jedná se o širokou škálu nálezů od úplného chybění femuru současně s nevyvinutým acetabulem přes různé formy zkrácení až po femur téměř normálně vyvinutý, pouze s lehkým zkrácením jeho délky. Pravidelnou součástí všech vývojových stupňů této deformity je také zkrácení až chybění fibuly. Maximum patologických změn je lokalizováno proximálně, proto se používá také názvu proximální femorální defekt - anglicky PFFD - *proximal femoral focal deficiency* (3).

Výskyt vady je udáván s četností 1-2 na 100 000 novorozenců (4, 5, 6). Přidáme-li k tomu všechny případy po narození nenápadné, lze předpokládat, že je incidence mírně vyšší. V České republice se ročně vyskytnou minimálně dva nové případy (7). V 15 % případů se změny nachází oboustranně. V případě lehčích oboustranných forem se může dospět ke správné diagnóze ještě později než u jednostranných změn (8). Muži jsou postiženi častěji než ženy, poměr postižení se ve světové literatuře udává 2:1 ve prospěch mužů (6). Etiologie dosud není jednoznačná, afekce vzniká působením blíže neurčené škodliviny mezi 4.-9. týdnem těhotenství. Mezi asociované abnormality patří defekt fibuly (zkrat či hypoplazie, případně její chybění) v 70-80% případů (7, 9). Postižení jiných orgánů je velmi vzácné a souvislost s PFFD není zcela prokázána. Žádné genetické příčiny nebyly zatím jasně prokázány, ačkoliv již byly zaznamenány případy postižení více osob v širším příbuzenském vztahu (5, 10).

1.1.1. Klasifikace PFFD

U PFFD má zásadní význam správné klasifikační zařazení, musí však být podrobné a konkrétní. Klasifikačních schémat bylo navrženo několik. Aitken rozlišuje typy A-D podle RTG nálezu (9). Během růstu je však někdy nutné provést reklasifikaci, zejména v prvních třech letech života, což je způsobeno zejména zpomalením osifikace chrupavky vrozeného pakloubu femuru.

Jako dobře použitelné se nám jeví dělení podle Pappase, který zařadil kongenitální defekty podle rozsahu postižení do vzestupné řady od I do IX. Hlavním kritériem pro dělení je radiologický nálezn.

1.1.1.1. Klasifikace PFFD sec. Pappas

Tato klasifikace je v České republice nejvíce preferovaná (11). Více typů dovoluje lépe určit stav defektu a pro daný typ postižení umožňuje lépe vybrat odpovídající způsob terapie (schéma). Avšak i u této klasifikace, která využívá členění podle RTG nálezu, se musí část pacientů v průběhu vývoje překlasifikovat, většinou na nižší stupeň postižení. Každá klasifikace podle RTG nálezu je totiž zatížena určitou mírou nepřesnosti, která vyplývá zejména ze zpomalené osifikace epifyzy hlavice i dalších částí skeletu femuru (12).

Typ I: Femur zcela chybí, acetabulum není vyvinuto, ischiopubické kostní struktury jsou málo vyvinuté, proximální tibia je ve výši kyčelního kloubu.

Typ II: Proximální polovina femuru chybí, acetabulum není vyvinuto, koleno má omezený pohyb. Hlavice femuru není vyvinuta. Femur je zkrácen o 70-90 %. Zkrat končetiny v dospělosti dosahuje 40 i více centimetrů.

Typ III: Kyčelní kloub je často nedokonale vytvořen, hlavice femuru je hypoplastická. Mezi hlavicí a diafýzou chybí kostěné spojení. Acetabulum je většinou hypoplastické, výjimečně téměř chybí. Zkrat femuru činí 45-80 %.

Typ IV: Kyčelní kloub je vytvořen, mezi hlavicí a diafýzou je fibroartilaginózní spojení s ostrůvky kalcifikací. Zkrat činí 40-65 %.

Typ V: Defekt femuru postihuje více diafýzu, kde je inkompletní osifikace, současně bývá abnormální krček. Někdy je přidružena aplazie tibie či fibuly. Zkrat dosahuje 45-85 %.

Typ VI: Femur je defektní distálněji. Chybí funkční kolenní kloub. Celkově je femur zkrácený a bývá hypoplastický. Častější jsou i doprovodné změny v oblasti bérce, zejména aplazie fibuly. Zkrat dosahuje 30-60 %.

Typ VII: Nález coxa vara neprogreduje. Pakloub se nevytváří. Proximální diafýza je skleroticky zúžená při zesílení kortexu, koleno bývá valgózní, laterální kondyl hypoplastický, česka má tendenci k luxaci. Celkově bývá femur hypoplastický. Zkrat dosahuje 10-50 %.

Typ VIII: Hypoplastický femur s valgózní krčkou, hlavice bývá v retroverzi. Distální femur má abnormality kondylů. Zkrat může dosáhnout 10-40 %.

Typ IX: Femur je hypoplastický. Typická je nestabilita kolena, zkrat činí 5-20 %.

1.1.2. Zobrazovací metody

Základním nálezem ve všech zobrazovacích metodách je zkrácení proximálního femuru často doprovázené dysplazií nebo přímo absencí jeho hlavice a změny až chybění přiléhajícího acetabula.

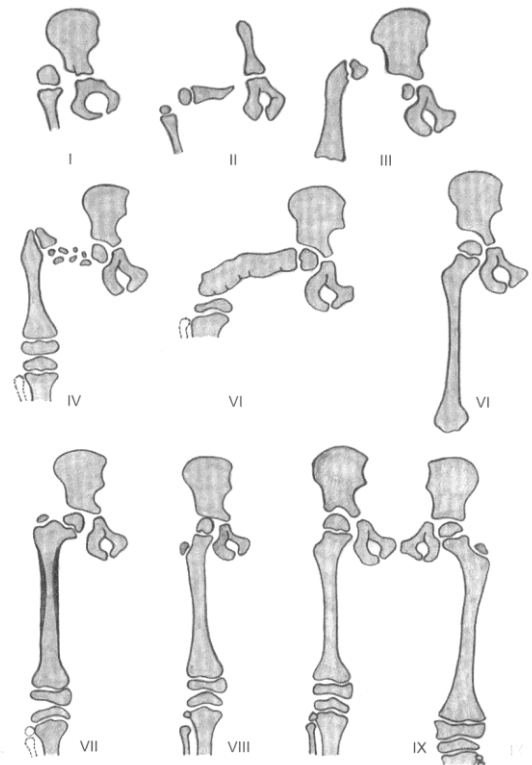


Schéma – Klasifikace PFFD sec. Pappas. Převzato (13).

1.1.2.1. RTG vyšetření

Na rentgenovém snímku v antero-posteriorní (AP) projekci jsou patrné acetabulární změny v různém rozsahu. Obdobně hlavice femuru (femorální kapitální epifýza) bývá zmenšená, dysplastická. Velmi často lze najít opožděnou osifikaci relativně normální hlavice, případně také její úplnou absenci. V případě, že je na RTG snímku dobře formované, avšak prázdné acetabulum, je předpoklad, že v acetabulu existuje malá chrupavčitá hlavice femuru (11, 14).

Dysplazie v dlouhé ose femuru (dysplazie diafýzy femuru) se mění od zpomalené osifikace jinak normálně dlouhého femuru po různou délku zkratu až po téměř kompletní chybění celého femuru. U těžších případů se velmi často vyvíjí pseudoartróza. Na AP projekci je často pozorováno varózní postavení kyčle (13).

Mezi další projekci se zaměřením na kyčle patří snímkování v abdukci – Lauensteinova projekce, která ukazuje posazení kyčlí v acetabulech a dovoluje posoudit možnost subluxe či dokonce luxace kyčle. Další projekce bývají již cílené na konkrétní kyčel či jinou část skeletu a mají upřesnit existující nález PFFD.

Současně se RTG snímkování používá ke sledování účinků chirurgické terapie, a to jak terapie korekční, upravující polohu a sklon skeletu, tak prolongační.

1.1.2.2. UZ vyšetření

Ultrazvuk lze použít jako doplněk klinického vyšetření, při kterém lze přímo sledovat fixaci či mobilitu epifýzy hlavice v acetabulu při současném pasivním pohybu kyčlí (15).

1.1.2.3. MR vyšetření

MR slouží stejně jako CT ke zlepšení základní diagnostiky určené podle RTG snímků. I na základě MR se může změnit – reklasifikovat – typ postižení. MR umožňuje zobrazit neosifikovanou chrupavčitou epifýzu hlavice femuru, která na RTG snímcích nebude patrná. Stejně tak je možné najít schovanou i již kalcifikovanou epifýzu v oblasti acetabula. MR obecně umožňuje lépe zobrazit velikost a uložení chrupavky sledovaného pakloubu v postiženém kyčelním kloubu. K tomu lze využít různých druhů MR sekvencí, které se v několika rovinách nabírají během vyšetřování.

Na MR sekvencích lze dobře zobrazit také svaly postižené kyčle. Tato metoda je také vhodná v diagnostice nestability v kolenním kloubu, při které chybějí křížová ligamenta případně i menisky. Obecně lze konstatovat, že MR je vhodná pro zobrazení struktur měkkých tkání (16).

1.1.2.4. CT vyšetření

CT vyšetření výborně zobrazí kostní struktury i drobná osifikační centra v průběhu postiženého femuru. Nastavením správného jasového okna a vhodného filtru tvrdosti (kernelu) je možné zvýraznit vybrané struktury jako skelet, měkkou tkáň či tuk.

Použití CT vyšetření u pacientů s PFFD se jeví jako vhodné řešení pro vyobrazení kostí v prostoru. K tomu slouží další typy zobrazení zejména třídimenzionální obrazy typu „volume rendering technique“ (VRT) a „maximum intensity projection“ (MIP). VRT dokáže velmi dobře zobrazit průběh cév při CT angiografii (CTAG), kdy se aplikuje intravenózně jodová kontrastní látka. MIP obrazy jsou vhodnější na zobrazení cév než skeletu. Jsou černobílé a jejich hlavní výhodou je 3D obraz bez prostorového zkreslení, ke kterému dochází u VRT obrazů. Proto lze na MIP obrazech přesně měřit vzdálenosti či průměry.

Při zobrazování cév na CTAG lze docílit pomocí softwaru rozvinutí cév, zhodnotit jednotlivé dělení, uložení a jejich šíři na postižené i nepostižené straně (1, 17).

Používání CT přístroje k vyšetřování pacientů s PFFD není ve světě běžné a autoři se tématu CT vyšetřování vyhýbají. Důvodem mohou být obavy z radiační zátěže, která u CT vyšetření bývá vyšší než u klasických RTG snímků.

1.1.2.5. Arthrografické vyšetření

V České republice se arthrografie obvykle v základním vyšetřovacím algoritmu nyní již obvykle u pacientů s PFFD neprovádí. Její využití je vyhrazeno speciálním případům, jako jsou

pacienti již s ukončenou chirurgickou rekonstrukční terapií, kdy je třeba zhodnotit stav dysplastického kloubu.

1.2. Úvod do problematiky posttraumatických defektů kloubní chrupavky distálního femuru

Posttraumatické defekty kloubní chrupavky představují jeden z nejzávažnějších problémů ortopedické chirurgie (18), neboť kloubní chrupavka má minimální potenci pro regeneraci. V souvislosti s nimi se často vyvinou degenerativní změny postiženého kloubu. Výrazem určitých regenerativních změn je nález fibrózní chrupavky, která je však méně kvalitní. Mechanicky je totiž méně odolná a její chemické složení je odlišné od hyalinní chrupavkové tkáně. Je tedy zřejmé, že léčení defektů kloubní chrupavky může předejít rozvoji osteochondrózy v postiženém kloubu. V posledních několika desetiletích byla vypracována řada léčebných postupů a technik, které měly přispět k hojení kloubních defektů (19, 20, 21, 22, 23, 24).

V současné době transplantace autologních chondrocytů (autologous chondrocyte transplantation – ACT) představuje nejmodernější metodu využívanou při léčbě posttraumatických defektů kloubní chrupavky (21, 22, 25, 26, 27, 29).

Jako nosiče chondrocytů jsou využívány biologické materiály. V současnosti uplatňovaný postup využívá trojrozměrný nosič s kulturou chondrocytů, který je možno v místě aplikace dostatečně pevně zafixovat. Takovýto skafold je dostatečně pevný, a proto vhodný pro příslušný chirurgický výkon. Navíc jej lze snadno upravit podle velikosti a hloubky defektu. Chrupavkovou tkáň představující vysoce hydratovaný materiál dobře nahradí v první fázi především hydrogely. Seznam komerčně vyráběných a klinicky ověřovaných produktů je v současné době již velmi dlouhý (30).

Ve spolupráci se dvěma pražskými ortopedickými klinikami ve Fakultní nemocnici v Motole a v Nemocnici Na Bulovce a Ústavem patologie 1.LFUK a VFN v Praze jsme studovali složení dvou odlišných biomateriálů osazených kulturou autologních chondrocytů, které byly transplantovány dvěma skupinám pacientů s posttraumatickými defekty chrupavek kolenního kloubu. Obě skupiny nemocných jsme vyšetřili radiologicky a nálezy jsme korelovali s výsledky bioptického vyšetření vzorků nově vytvořené chrupavky. Tyto vzorky byly odebrány při artroskopii po 10 - 12 měsících od transplantace. Naše nálezy, shrnuté v této disertační práci, byly také publikovány ve Folia Biologica (2).

2. Cíle práce

První část studie po rozdělení pacientů s PFFD podle stávající běžně používané rentgenové klasifikace si stanovila za cíl upřesnit pomocí skenů v rozsahu kyčelních kloubů u každého pacienta diagnózu PFFD, podrobně zhodnotit změny v okolí postižení, zejména průběh cév a vzhledem k věku pacientů vyhodnotit radiační zátěž při opakovaných vyšetřeních RTG metodami i histologicky vyšetřit tkáňové vzorky z oblasti postižení, odebrané při korekčních operacích.

Ve druhé části studie byli vybráni pacienti s posttraumatickou lézí kloubní chrupavky detekovatelnou MR vyšetřením. Po následné transplantaci autologních chondrocytů za použití dvou různých skafoldů (Hyalograft C, Fidia Advanced Biopolymeres, Abano Terme, Italy a Chondrograft, NTC, FN Brno – Bohunice) těmto pacientům a po opakovaných kontrolách kolenního kloubu (artroskopicky za 10 – 12 měsíců po transplantaci a MR za 4 roky od vstupního vyšetření) byl vytyčen cíl porovnat dosažené výsledky u obou použitých biomateriálů a vzájemně korelovat radiologické i histopatologické nálezy.

3. Materiál a metody

3.1. Soubor pacientů PFFD

Soubor 21 pacientů (13 chlapců a 8 děvčat), zahrnující nově přichozí pacienty, nemocné v průběhu léčení i po ukončené terapii byl sledován ve věku 1 – 17 let. Každý pacient byl opakovaně vyšetřen na RTG a na začátku sledování i na CT včetně aplikace kontrastní látky metodou CTAG. Primární klasifikace sec. Pappas byla stanovena na základě RTG vyšetření. U 6 pacientů byly histologicky vyšetřeny tkáňové vzorky z postižené oblasti, získané při rekonstrukční operaci.

3.1.1. Použité vyšetřovací metody

3.1.1.1. RTG

V průběhu sledování každého nemocného počet 10-25 provedených RTG vyšetření odpovídá počtu 15-87 expozic. Expoziční parametry byly nastaveny podle velikosti vyšetřované oblasti v poměru k věku a váze. Napětí se nacházelo v rozmezí 60-80 kV s průměrem 75 kV a modus 80 kV. Proud na rentgenové lampě se nacházel v rozpětí 80-200 mAs s průměrem 95 mAs a modus 80 mAs. Celkově vyšší hodnoty odpovídaly vyšetřením u pacientů v druhé věkové dekádě.

Základní snímkovací projekce byly předozadní – antero-posteriorní (AP) a tzv. Lauensteinova projekce – projekce antero-posteriorní s kyčlemi v abdukci. Dále byly prováděny cílené snímky na kyčel v AP a šikmé projekci, snímky na femur v AP a bočné projekci, případně snímky dalších částí dolní končetiny – kolena, bérce, hlezna. Speciální snímkování bylo prováděno pro zhodnocení a výpočet zkratu dolní končetiny, tzv. ortoradiografie, kdy na snímku se promítá buď kalibrovaná síť pruhů, nebo se zhruba doprostřed snímku současně promítá měřítko v centimetrech, umožňující odpočet rozdílů mezi končetinami. Ortoradiografické snímky se buď snímkuje vcelku na protáhlý detektor, případně se počítačově snímky skládají do jednoho dlouhého obrazu, nebo se vyšetření rozfázuje na tři samostatné oblasti – kyčle, kolena a bérce s hlezny.

3.1.1.2. CT

Každý pacient byl vyšetřen helikálním skenem v oblasti kyčlí a stehen s cílem přesného zobrazení všech tkání v dané lokalizaci. K vyšetřování byly použity CT přístroje Somatom Sensation 16 (Siemens, Forchheim, Německo) a od roku 2006 Somatom Sensation 40 (Siemens, Forchheim, Německo). Samotný vyšetřovací protokol se změnou CT přístroje příliš nezměnil, jen byl přizpůsoben možnostem novějšího rychlejšího typu. Náběr dat byl prováděn kolimací 0,75 mm resp. u nového přístroje 0,6 mm, pitch 0,9. Rychlost rotace lampy byla 0,5 s. Nastavení napětí bylo voleno v rozmezí 100-120 kV podle věku a váhy pacienta. Nastavení proudu na lampě bylo korigováno použitím dávky šetřícího modu CareDose pro objemovou modulaci proudu vzhledem k objemu tkáně pacienta, kterým rentgenové záření v daný moment prochází. Referenční proud byl použit v rozmezí 83-134 mAs pro 100 kV a 66-124 mAs pro 120 kV (31).

Náběr dat byl prováděn nativně a po podání kontrastní látky Iomeprolum 400 (Iomeron 400, Altana Pharma) v dávce 2ml/kg rychlostí 3-4ml/s v arteriální fázi. Vzhledem k velikosti dětí nebylo nutné provádět samostatnou žilní fázi, neboť na zkrácené končetině je obrat krve rychlejší a tudíž žíly se plní ještě před ukončením skenování. Kontrastní látka byla podávána tlakovým injektorem Ulrich Missouri (Ulm, Německo) do kubitální žíly. Na správné načasování byla použita technika „Bolus tracking“ při sledování místa prvního vysycení na bifurkaci aorty formou kruhového regionu zájmu „Region of Interest“ (ROI) (32). Pacienti do pěti let byli vyšetřeni v krátké celkové anestezii. Větší děti již většinou nebylo nutné do celkové anestezie uvádět.

Oba CT přístroje (označené jako multidetektorové) nabírají primárně objemové datasety sloužící pro další rekonstrukci obrazu. Základní skeny ve všech rovinách byly počítány přímo z hrubých dat ve formě multiplanárních rekonstrukcí (MPR) šíře vrstvy 5 mm a na novějším přístroji 3 mm. MPR skeny byly pořízeny bez překryvu – inkrement 5 mm, resp. 3 mm. Současně byly počítány tenké MIP (maximum intensity projection) skeny v koronární rovině přímo z hrubých dat v šíři 10 mm s vybraným překryvem 7 mm, tedy posun pouhé 3 mm. Pro další použití při

výpočtech byly přepočítány tenké řezy umožňující postprocessing šíře 0,75 mm, inkrement 0,7mm, kernel B10 (resp. u novějšího přístroje šíře 0,6mm a inkrement 0,6mm).

3D rekonstrukce skeletu byla prováděna z nativního i postkontrastního náběru dat. Úplný obrazový dataset byl zpracováván ve volume rendering technique obrazech (VRT) ve vhodném náklonu. V případě odstranění skeletu metodou „Bone Removal“, případně formou prahování denzit tzv. Editace objektu, bylo zopakováno zobrazení cév VRT rekonstrukcí a doplněna objemová MIP rekonstrukce. Pro standardizaci mimo vhodně nakloněné VRT a MIP projekce se provádělo u každého vyšetření uložení rekonstrukcí ve formě „Radial Range“ rotace v ose Z po 10° v celém rozsahu 360°, kdy se pořídila postupně projekce 36 snímků.

3.1.1.3. Bioptické vyšetření vzorků kyčelních kloubů

U šesti pacientů bylo provedeno histologické vyšetření po proběhlé rekonstrukční operaci. K vyšetření byly dodány extirpované části tkáně z oblasti defektu proximálního femuru někdy se změnami ve smyslu pseudoartrózy. Vzorky byly zpracovány v celém rozsahu, po odvápnění.

3.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru

3.2.1. Soubor pacientů

Do druhého souboru bylo zařazeno 30 dospělých pacientů (25 mužů a 5 žen) s průměrným věkem 33 let, u nichž byla převážně artroskopicky stanovena diagnóza posttraumatického defektu kloubní chrupavky v oblasti femorálních kondylů. Bioptické vyšetření bylo provedeno ze vzorků odebraných při artroskopickém vyšetření 12 pacientů, kterým byl transplantován Hyalograft C na Ortopedické klinice 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce a od 18 pacientů léčených transplantací Chondrograftu na Klinice dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN Motol. Kontrolním materiálem pro normální strukturu chrupavky byly hlavice femuru od 7 náhle zemřelých a od 15 pacientů po TEP pro traumatickou zlomeninu krčku. Druhou kontrolní skupinu tvořilo 12 těžce osteoartroticky změněných hlavic femuru odstraněných při TEP. Každý z 30 pacientů měl postižený kloub dvakrát vyšetřen MR - poprvé v průběhu měsíce od provedené transplantace a podruhé s odstupem 4 let od prvního vyšetření.

3.2.2. Diagnostický a léčebný postup

V první fázi byl artroskopicky verifikován defekt kloubní chrupavky. V průběhu tohoto vyšetření byl odebrán drobný vzorek ze spodiny defektu kloubní chrupavky distálního femuru, kterou tvořila tenká vrstva reziduální chrupavky. Současně byl odebrán drobný vzorek chrupavčité tkáně z nezatěžované oblasti chrupavkového krytu pro potřeby kultivace. Chondrocyty izolované z nezatěžované chrupavčité tkáně byly expandovány v jednovrstevné kultuře, přeneseny na skafold Hyalograft C (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) a kultivovány po dobu 14 dnů v Itálii.

Druhý typ skafoldu Chondrograft (NTC, FN Brno – Bohunice) měl za základ nosiče fibrin a byl připraven v laboratoři Dr. Adlerem. Odebraná chrupavka byla rozkrájena na drobné fragmenty a po natrávení chrupavkové matrix byly izolovány chondrocyty, které narostly v jedné vrstvě a byly spojeny s fibrinovým lepidlem, aby vytvořily solidní graft (2).

Skafoldy s buněčnou kulturou byly implantovány do místa defektu, když předtím byla jejich spodina vyčištěna kyretáží až do úrovně subchondrální kostní tkáně.

V průběhu druhého artroskopického vyšetření, provedeného 10-12 měsíců po transplantaci autologních chondrocytů, byl trepanem odebrán vzorek nově vytvořené chrupavky z místa původního posttraumatického chondrálního defektu. Kvalita nově vytvořené chrupavkové tkáně byla ověřena při histologickém vyšetření.

3.2.3. Radiologické vyšetření oblastí postižené chrupavky

Každý pacient byl dvakrát vyšetřen pomocí magnetické rezonance v oblasti postiženého kolena přístrojem Magnetom Avanto 1,5 Tesla (Siemens, Erlangen, Německo). K vyšetření byla

použita dedikovaná osmikanálová kolenní cívka pro jedno koleno SMS Hi-Res Knee Coil (Invivo, Gainesville, FL, USA). První vyšetření proběhlo v průběhu měsíce od provedené autotransplantace, druhé následovalo s odstupem čtyř let od prvního vyšetření.

Během MR vyšetření byly použity sekvence podle protokolu na kolenní kloub: T1 tirm SAG, T1 se COR, PD SAG, T2 tse SAG, T2 tse fs TRA, PD COR, T2 tse COR, T2 trufi3d SAG. Zvolené sekvence dobře pokrývají oblast zájmu ve všech třech základních rovinách. Sekvence T1 se a T2 tse ukazují struktury kolena, vazy, šlachy, skelet. T1 se sekvence ukazuje navíc prokrvácené partie, T2 tse zmnožené kolekce tekutiny. T1 tirm, T2 tse fs a T2 trufi3d jsou sekvence potlačující různým fyzikálním způsobem tuk během vyšetření, proto mnohem lépe ukazují množství vody v tkáních a prosáknutí všech struktur. Tyto sekvence dobře zobrazují strukturu chrupavky a její změny.

Vzhledem k charakteru vyšetření byla tloušťka vrstvy volena u spin-echových sekvencí 3-4 mm (T1 tirm, T1 se, PD, T2 tse), u 3D gradientní sekvence (T2 trufi3d) 1 mm. Zejména poslední jmenovaná sekvence (T2 trufi3d) prokázala svoje výborné vlastnosti tkáňového kontrastu, kdy chrupavka má vyšší signál než okolní struktury. Roviny řezů byly voleny tak, aby chrupavka byla pokud možno co nejvíce zachycena na obrazech kolmo na kloub, kde se nachází. Celková doba vyšetření nepřesahovala 20 minut s průměrnou dobou vyšetření 15 minut.

3.2.4. Histopatologické vyšetření vzorků chrupavky z artroskopického vyšetření

Vzorky kloubní chrupavky získané při prvním i druhém artroskopickém vyšetření stejně jako zbytky skafoldů použitých při transplantaci byly zpracovány bez odvápnění. Před zpracováním byly po dobu 48-72 hodin fixovány v 10 % pufovaném formolovém roztoku. Po odvodnění a zalití do parafinu byly nakrájeny histologické řezy o síle 5 mikronů. Řezy byly barveny hematoxylinem eozinem pro potřeby vyhodnocení struktury a buněčné organizace chrupavčité tkáně. Obsah proteoglykanů byl hodnocen v řezech obarvených Safraninem O a alcianovou modří. Uspořádání kolagenních vláken bylo vyhodnocováno při vyšetření v polarizovaném světle.

V každém bioptickém vzorku byl hodnocen charakter chrupavčité tkáně, která byla klasifikována jako hyalinní chrupavková tkáň, fibrózní chrupavka nebo smíšená chrupavková tkáň. Dále byly sledovány následující parametry:

1. Histologická organizace chrupavčité tkáně a subchondrální kosti
2. Proporční zastoupení hyalinní a vazivové chrupavkové tkáně
3. Porovnání cytologických a imunohistochemických charakteristik celulární komponenty transplantátů a struktury nosičů

3.2.5. Kontrolní skupina

Hlavice femuru byly po fixaci ve formolovém roztoku nařezány na tenké lamely o síle 3-5mm tak, aby zůstala zachována povrchová vrstva kloubní chrupavky a část kostní tkáně. Tyto vzorky byly po fixaci odvápněny v nasyceném roztoku EDTA při teplotě 40°C. Vedle toho byly z hlavic odebrány části pouze chrupavčitého krytu, aby vyšetřovaná tkáň nemusela být odvápnována a předešlo se tak arteficiálnímu poškození.

3.2.6. Imunohistochemické vyšetření

Při imunohistochemickém vyšetření byl použit avidin-biotinový komplex (ABC) a následující monoklonální protilátky proti S-100 proteinu (1:600, DAKO, Glostrup, Denmark), S-100 A1 a A2 proteinu (Ready to use, Neomarkers), S-100 proteinu A4 a A6 (1:200, Neomarkers), S-100 proteinu P (1:40, RND system), S-100 proteinu A10 (Ready to use, Neomarkers), alfa aktinu hladké svaloviny (1:100, Sigma St. Louis, MO), svalovému specifickému aktinu HHF35 (1:100, DAKO), desminu (1:200, DAKO), CD68 (1:50, DAKO); CD34 (1:50, DAKO), Ki67 (1:50, DAKO) a proti lidskému kolagenu II. typu (1:100, Santa Cruz, CA, USA). Dále byly vyšetřeny markery kostní a chrupavčité tkáně D2-40, osteonektin a osteokalcin.

4. Výsledky

4.1. PFFD

V našem souboru (tabulka 1) byl typ I sec. Pappas zastoupen jednou, typ II sec. Pappas dvěma případy, typ III sec. Pappas osmi případy, typ IV sec. Pappas dvěma případy. Čtyři případy byly zahrnuty do typu VII sec. Pappas, jeden případ do typu VIII sec. Pappas a tři případy do typu IX sec. Pappas. Pravá strana byla více postižena než levá, a to ve 14 případech. Noha byla normální u 18 případů, zatímco těžká hypoplazie tibie a fibuly včetně dvoupraprscité nohy byla u jednoho pacienta (pacient č. 5). U dvou pacientů (pacient č. 11 a č. 15) byla noha složena ze čtyř praprsků. U jednoho případu typ IX sec. Pappas (pacient č. 13) se nacházely tři- resp. čtyřpraprscité ruce. Pacient č. 10 s PFFD typu VII sec. Pappas měl na druhé nepostižené končetině pes equinvarus.

Pacient č.	Pohlaví (muž – M, žena – F)	Rok narození	Věk v době CT vyšetření (roky)	Typ PFFD sec. Pappas	Postižená strana	CT vyšetření: vztah k chirurg. terapii	Chirurgická terapie (návrh nebo uskutečňovaná)
1	F	2004	3	I	R	před začátkem	„knee for hip“ – King II
2	M	2002	3	III	L	před začátkem	PA rekonstrukce
3	M	2000	5	III	R	před začátkem	PA rekonstrukce
4	M	1998	7	II	R	před začátkem	Ortotická pomůcka
5	M	2004	2	III	R	před začátkem	Ortotická pomůcka
6	F	2006	1	III	R	před začátkem	Ortotická pomůcka
7	M	2003	4	IV	L	před začátkem	PA rekonstrukce
8	M	2002	3	IV	R	před začátkem	PA rekonstrukce
9	M	2003	3	VII	R	před začátkem	Prodloužení femuru
10	M	2002	5	VII	L	před začátkem	Valgizační osteotomie femuru
11	M	2000	7	VIII	R	před začátkem	Prodloužení femuru
12	F	2002	4	IX	L	před začátkem	Salterova osteotomie
13	M	2001	6	IX	R	před začátkem	Salterova osteotomie
14	F	2004	4	IX	R	před začátkem	Prodloužení femuru
15	M	1991	16	II	L	v průběhu	„knee for hip“ – King II
16	F	1987	20	II	L	v průběhu	„knee for hip“ – King II
17	F	1990	17	III	R	v průběhu	PA rekonstrukce a prodloužení femuru
18	F	1993	13	III	R	v průběhu	PA rekonstrukce a prodloužení femuru
19	M	1995	11	III	R	v průběhu	PA rekonstrukce a prodloužení femuru
20	M	1998	8	III	R	v průběhu	PA rekonstrukce a prodloužení femuru
21	F	2000	7	VII	R	v průběhu	Valgizační osteotomie a prodloužení femuru

Tabulka 1 – soubor pacientů s PFFD, základní údaje.

4.1.1. Reklasifikace typu PFFD podle CT nálezu

U pacienta č. 4 došlo k reklasifikaci PFFD změn z typu II na typ III. Zatímco v klasickém RTG obraze bylo acetabulum prázdné, na CT vyšetření byla zastižena malá epifýza hlavice femuru v hypoplastickém acetabulu. Na RTG snímku je zpětně možné epifýzu hlavice femuru vystopovat, ale s určitostí ji bez znalosti CT obrazu zhodnotit nelze. Vzhledem k pevné fixaci epifýzy hlavice k acetabulu reklasifikace však ve svém konečném důsledku neměla vliv na plánovanou chirurgickou terapii.

4.1.2. Mobilita epifýzy hlavice kyčle v acetabulu u typu III sec. Pappas

U pacientů se změnami typ III sec. Pappas je pro terapii nejdůležitější určení, zda je epifýza k acetabulu fixována či zda je volně mobilní. Pouhým klinickým vyšetřením toto není většinou

možné stanovit. Na CT řezech je však možné přesně vysledovat, zda hlavice přirůstá ke skeletu acetabula, či zda je mezi těmito kostěnými útvary alespoň minimální prostor vyplněný chrupavkou, čímž může zajistit volnou mobilitu zhruba v očekávaném rozsahu jako u normálního kyčelního kloubu.

Celkově soubor zahrnoval 8 případů typ III sec. Pappas. V této skupině byly identifikovány tři epifýzy hlavic fixované k acetabulu a pět epifýz v acetabulu volně mobilních.

4.1.3. Cévní změny u PFFD

U dvanácti případů ukázalo CTAG vyšetření typický průběh cév na postižené dolní končetině. Hypoplastický pakloub kyčle byl zásoben větvemi z arteria femoralis, která je pokračováním arteria iliaca externa (AIE). U dvou případů bylo zastiženo abnormální cévní zásobení postižené končetiny, kterému se detailně věnujeme níže.

U sedmi případů bylo CT vyšetření provedeno několik měsíců až let po začátku chirurgické léčby. U všech sedmi pacientů cévy probíhaly normálně.

4.1.3.1. Změna uložení bifurkace AFC (sledovaný odstup AFP) na postižené straně

Arteria femoralis communis (AFC) se dělí ve své bifurkaci na arteria femoralis profunda (AFP) a na arteria femoralis superficialis (AFS). U všech pacientů s typem I – IV sec. Pappas (13 ze všech 21 sledovaných) a dvou pacientů typ VII sec. Pappas byla nalezena proximálněji uložená bifurkace AFC. Zatímco normální odstup se pohybuje u dětí průměrně 30mm distálně od horizontály procházející Y-chrupavkou, u sledovaných pacientů se bifurkace nacházela proximálněji k vybrané anatomické horizontále. U čtyř případů (pacienti č. 4, 16, 19 a 20), typ I, II, III a VII sec. Pappas byla přímo v úrovni horizontály a u šesti případů (pacienti č. 1, 2, 3, 6, 7, 15), typ I – IV sec. Pappas byla dokonce výše uložená než daná horizontála. Tento nálezk ukazuje na komplexnost postižení, kdy zkrat končetiny je doprovázen i relativním posunem uložení cév (tepen) v dané oblasti pánve a kyčle. Změny jsou daleko výraznější u těžších forem typ I – IV sec. Pappas, nálezk i zde odpovídá tíži postižení. Změna u typu VII sec. Pappas může být souhrou více faktorů.

4.1.3.2. Paradoxní uložení bifurkace AFC

Ve třech případech byl odstup AFP z AFC umístěn ve srovnání se stranou postiženou proximálněji na straně kontralaterální, tedy nepostižené. Případy se týkaly vyšších typů VII a IX (pacient č. 12, 13 a 21), tedy méně významného postižení, které je také uloženo více distálně. Příčiny tohoto nálezu se nepodařilo spolehlivě objasnit.

4.1.3.3. Vysoké uložení bifurkace AIC na postižené straně

Pacient č. 17 typ III sec. Pappas měl kromě výše uloženého odstupu AFP z AFC také vysoko uloženou bifurkaci na AIC. AIE odstupovala již v úrovni horní hrany obratlového těla L5, což činilo rozdíl proti nepostižené straně 35mm. Protože sledovaný rozdíl v posunu odstupu AFP z AFC proti horizontále na Y-chrupavce byl 31mm, lze konstatovat, že došlo k celému posunu na tepenných strukturách postižené DK. Absolutní délka obou AIE se lišila stranově o méně než 4mm.

4.1.3.4. Anomální cévní zásobení postižené dolní končetiny

Dva chlapci s postižením typ III sec. Pappas měli mimo výše zmiňované změny průměru AFC či bifurkace AFC také dosud nepopsanou cévní anomálii, o níž jsme již jako první referovali ve svých publikacích (1, 7, 33).

4.1.3.4.1 Pacient č. 2 mužského pohlaví typ III sec. Pappas vlevo

Již podle RTG snímků byl patrný zkrat LDK odpovídající třem čtvrtinám délky stehna. CT vyšetření ukázalo v oblasti levé kyčle proximální dislokaci hypoplastického stehna a jeho propojení s malou kostěnou epifýzou hlavice femuru pruhem měkké tkáně. Epifýza hlavice femuru byla vyhodnocena jako volně mobilní, což se později ověřilo i klinicky (obraz 1).

Vyšetření CTAG prokázalo hypoplastickou AIE, která pokračovala na zmenšené stehno jako tenká femorální arterie. Tato tepna se dělila ještě nad úrovní horizontály proložené Y-chrupavkami na laterální větévku, nejspíše AFP a na mediální větévku, kterou jsme považovali za AFS. Laterální

větev AFP směřovala k pakloubu, kde nejspíše zásobovala měkké tkáně stehna včetně svalů quadriceps femoris a biceps femoris a končila před kolenním kloubem. Mediální větev (AFS) zásobovala převážně adduktory stehna a končila také před kolenním kloubem.

Zbytek postižené levé dolní končetiny byl zásoben atypicky z povodí arteria iliaca interna (AII) přes arteria glutea inferior (AGI). Tato tepna přecházela na stehno přes foramen ischadicum major dorsálně a nacházela se posteriorně od kyčle, následně pokračovala směrem do Hunterova kanálu jako arteria poplitea (AP) a dále na bérce, kde se již dělila na tři bérce tepny. Arteria tibialis anterior a arteria tibialis posterior byly relativně přiměřené velikosti. Třetí tepna byla velmi tenká, nejspíše se jedná o arteria fibularis. Samotná trifurkace byla posunuta relativně distálně, zhruba do poloviny bérce. Naproti tomu trifurkace na nepostižené druhé končetině byla uložena v horní třetině bérce.

Tepna v úseku od foramen ischadicum major až na bérce zřetelně doprovázela nesyťící se pruhovitou strukturu – nervus ischiadicus. Úsek na dorsální straně stehna zřejmě odpovídá arteria comitans nervi ischiadici neboli arteria ischiadica. Za normálních podmínek je tato tepna doprovázející ischiadický nerv velmi tenká a na běžném CT vyšetření nerozlišitelná. Z arteria ischiadica odstupovala na stehně jen jedna významnější větev, která zezadu zásobuje adduktorovou skupinu svalů.

Naše vyšetření neprokázalo žádné anastomózy mezi arteria glutea inferior či arteria ischiadica s arteria femoralis superficialis či arteria femoralis profunda.

Arteria poplitea na postižené končetině byla doprovázená žílou - vena poplitea, která drénuje krev z hlubokých žil nohy a bérce. Nad kolenem tato žíla sledovala průběh arteria ischiadica a doprovázela tedy ischiadický nerv. Žílu v zadním průběhu stehna lze proto nazvat vena comitans nervi ischiadici, případně vena ischiadica. Na hýždi žíla pokračovala jako vena glutea inferior a po průchodu foramen ischadicum major jako vena iliaca interna.

Hypoplastická femorální žíla zřetelně drénovala jen svaly přední a mediální strany stehna včetně vena saphena magna a pokračovala jako vena iliaca externa. Tato hypoplastická žíla tedy doprovázela hypoplastickou femorální tepnu.

Cévní zásobenění na kontralaterální nepostižené dolní končetině bylo v zastiženém úseku normální. Vzhledem k centrování na zkrácenou postiženou končetinu distální část nepostižené dolní končetiny – bérce a noha – nebyly zastiženy.

4.1.3.4.2. Pacient č. 3 mužského pohlaví typ III sec. Pappas vpravo

Již podle RTG snímků byl patrný zkrat PDK odpovídající dvěma třetinám délky stehna. CT vyšetření ukázalo přesnější situaci v oblasti pravé kyčle, kde kromě skeletu kyčle chyběla také zhruba proximální polovina femuru. I zde byla patrná dislokace distální části stehna proximálně, celá PDK byla v zevní rotaci. Malá osifikovaná volně mobilní epifýza hlavice byla propojená se zbytkem femuru pruhem měkké tkáně. Epifýza hlavice femuru byla uložena v acetabulu, měkké tkáně však nebyly dosti pevné a došlo ke zkratu celé PDK proximálně o zhruba 7-10 cm.

Obdobně jako u předchozího případu byla AIE na postižené straně hypoplastická a pokračovala na stehno jako arteria femoralis communis. Její rozdělení na AFS a AFP bylo také uloženo proximálněji, zhruba o 8 mm nad úroveň horizontály proložené Y-chrupavkami. Laterální větev, nejspíše AFP, směřovala k pakloubu, pravděpodobně zásobovala měkké tkáně stehna včetně svalu quadriceps femoris a končila nad kolenním kloubem na stehně. Mediální větev, AFS, zásobovala adduktorovou skupinu svalů a zejména výrazný, relativně hypertrofický musculus sartorius. S tímto svalem tepna mírně přesahovala distálně pod kolenní kloub (obraz 2).

Celý zbytek postižené pravé dolní končetiny byl zásoben atypicky z větve arteria iliaca interna (AII) přes arteria glutea inferior (AGI), přecházející na stehno přes foramen ischadicum major dorsálně a nacházející se posteriorně od kyčle. Následně tepna pokračovala do popliteální fossy jako arteria poplitea (AP). Na bérce se dělila na tři bérce tepny, z nichž arteria tibialis anterior a arteria tibialis posterior byly relativně přiměřené velikosti. Velmi tenká až vlasovitá třetí

tepna nejspíše odpovídala arteria fibularis. U tohoto pacienta se trifurkace nacházela v proximální třetině bérce.

Úsek tepny na dorsální straně stehna i u tohoto pacienta doprovázela nesytící se pruhovitá struktura - nervus ischiadicus, proto arterii lze rovněž označit jako arteria ischiadica. Z ní odstupovala distálněji na stehně pouze jedna významnější větev, zezadu zásobující musculus biceps femoris. Ani v tomto případě při CTAG vyšetření přítomny žádné zobrazitelné anastomózy.

Anatomický průběh žil se lišil od pacienta č. 2, neboť v celém průběhu na stehně žádná výrazná žíla dorsálně uhýbající tepnu arteria ischiadica nedoprovázela. Arteria poplitea byla sledována popliteální žílou, jež však pokračovala adduktorovým kanálem jako vena femoralis, sbírala krev z vena saphena magna a dále běžela pánví jako vena iliaca externa. Tím si tato žíla zachovávala stejný průběh jako na nepostižené kontralaterální končetině.

Zastižená část cévního zásobení na kontralaterální nepostižené dolní končetině nebyla změněna. Protože však vyšetření bylo i zde centrováno na zkrácenou postiženou končetinu, distální část nepostižené dolní končetiny – distální stehno a níže – jsme nezastihli.

U obou podrobně popsanych případů nebyl atypický průběh cév doprovázen žádnou další mimocévní úchylnou kromě typické anomálie skeletu při typ III sec. Pappas.

4.1.4. Radiční zátěž u vyšetřovaných pacientů s PFFD

V průběhu mnoholetého sledování je každý pacient opakovaně vyšetřován různými zobrazovacími metodami. Většinou se jedná o RTG vyšetření, v našem případě jsme zvolili vyšetření CT. Oba postupy využívají k zobrazení rentgenové záření, proto jejich použití by mělo být vždy řádně odůvodnitelné (přesně ve smyslu ALARA). Vyšetření musí být adekvátně indikované s očekávaným přínosem a s nejnižší dávkou záření, která ještě zajistí dostatečně kvalitní snímek.

Dávky záření byly spočítány jednak u CT vyšetření, zpravidla provedeného na začátku sledování, jednak u RTG vyšetření, kde dávky byly počítány v přibližně stejné době. Aby současně bylo možné porovnat pacienty s relativně velkým věkovým rozptylem (1-20 let), pacienti byli rozděleni do čtyř skupin podle věku dosaženého v době vyšetření – do 4 let, 5-9 let, 10-14 let a nad 15 let. Poslední skupina měla dávky počítány již jako kategorie dospělých. Dávky záření (mSv) byly počítány u RTG snímků samostatně pro RTG pánve a samostatně pro RTG femuru. Důvodem bylo jiné množství měkké tkáně prozářené během RTG vyšetření a tedy i jiné tabulkové parametry umožňující dávku vypočítat (tabulka 2). Dávky na CT vyšetření byly počítány podle nastavených parametrů na rentgence včetně spočítaných parametrů Dávkového indexu CT (CTDI) a Výsledné délkové dávky (DLP) (tabulka 3).

		Dávka (mSv)			
		Pánev		femur	
věk (rok)	počet	průměr	SD	Průměr	SD
0-4	7	0,05	0,037	0,02	0,009
5-9	8	0,06	0,036	0,03	0,021
10-14	3	0,09	0,045	0,05	0,025
>15	3	0,05	0,014	0,03	0,015

Tabulka 2 – Dávka záření přijatá po expozici jednoho RTG snímku, rozděleno podle věku do čtyř kategorií

		Dávka (mSv)		Nastavení CT			Naměřené hodnoty			
věk (rok)	počet	průměr	SD	kV	mAs	SD (mAs)	CTDI	SD (CTDI)	DLP	SD (DLP)
0-4	7	4,5	2,7	100	78	34,3	4,6	2,3	102	61,0
5-9	8	3,6	1,8	110	62	27,5	3,2	1,4	122	60,9
10-14	3	4,1	1	110	74	36,6	4,4	1,6	189	45,9
>15	3	2,9	2,3	120	57	22,3	4,3	1,7	223	77,8

Tabulka 3 – Dávka záření přijatá po provedení CT vyšetření jedním skenem (jednou helikálou), rozděleno podle věku do čtyř kategorií

4.1.5. Histologické změny u pacientů s PFFD

U pacientů č. 1, 7, 8 (tabulka 1) převažovaly struktury chrupavkové tkáně plynule přecházející ve tkáň vazivovou. Mezibuněčná hmota měla všechny rysy hyalinní chrupavky, avšak buňky neměly typické znaky lakunárních buněk, pouze na periférii ložiska se podařilo identifikovat ojedinělé chondrocyty s lakunárními rysy. Vyšetření k průkazu relativně specifického markeru chrupavkových buněk S-100 proteinu vyznělo překvapivě negativně. Tvorbu kosti se podařilo prokázat pouze v drobných okrcích uvnitř masy chrupavky, kde byly zaznamenány ostrůvky cévnaté vazivové tkáně imponující jako základ osifikujícího centra. V jiném případě (pacient č. 3) byla větší resekovaná část tvořena převážně kostí, která na některých místech v periferních oblastech přecházela v méně vyžralou chrupavčitou tkáň. Na povrchu kostních trámčů byly zřetelné osteoblastické lemy. Přítomnost osteoklastů svědčila pro probíhající přestavbové změny.

Na řadě míst v kostní tkáni perzistovaly drobné ostře ohraničené ostrůvky chrupavčité tkáně bez známek probíhající enchondrální osifikace. Chrupavková tkáň byla opět s protilátkami proti S-100 proteinu a alfa aktinu hladké svaloviny negativní. V kostní tkáni se místy nacházel větší prostor tvořený cévnatou vazivovou tkání, který připomínal primitivní dřevnou dutinu.

Při histologickém vyšetření odebraných vzorků z oblasti defektu femuru nebyly nikde nalezeny změny, které by svědčily pro ischemické poškození některé z tkání vyskytujících se v dané oblasti.

4.2. Posttraumatický defekt chrupavky

4.2.1. Nálezy u pacientů s transplantací autologních chondrocytů

4.2.1.1. Histologické nálezy v reziduální kloubní chrupavce z místa kloubních defektů

V obou skupinách byly vyšetřeny vzorky reziduální kloubní chrupavky odebrané ze spodiny kloubního defektu, jež v těchto případech sestávala z dolní vrstvy kloubní chrupavky normální struktury, včetně zbytků kalcifikované chrupavkové zóny. V ostatních případech odebraný materiál byl tvořen buněčnou fibrózní chrupavkovou tkání s příměsí původní hyalinní chrupavky. V oblastech s hyalinní chrupavkou bylo možné pozorovat známky degenerativních změn, běžně se vyskytujících u osteoartrózy. V takovýchto případech byla zaznamenána povrchová fibrilace a fragmentace kloubní chrupavky, ve které se nacházely i známky tzv. klonálního seskupování chondrocytů v drobné uzlovité formace.

Hlavní rozdíl proti normální kloubní chrupavce spočíval ve výskytu chondrocytů exprimujících alfa aktin hladké svaloviny. Při použití protilátek proti různým isoformám S-100 proteinu byla prokázána nejintenzivnější pozitivita při použití protilátky proti S-100 A6 proteinu.

4.2.1.2. Histologická struktura skafoldů použitých při transplantaci

Histologické vyšetření obou typů skafoldů použitých při transplantaci ukázalo zřetelné rozdíly v jejich složení, a to jak z hlediska charakteru buněčné komponenty, tak i pokud se jedná o strukturální charakteristiky nosiče.

Hyalograft C sestával z fibrilární sítě biomateriálu vytvořeného z esteru hyaluronové kyseliny. V této síti byly zcela nepravidelně rozmístěny vlastní buňky, jejichž koncentrace se místo od místa lišila. Drobné buňky často vázané na fibrily biomateriálu připomínaly svým vřetenitým tvarem i expresí alfa aktinu buňky hladké svaloviny, fibroblasty a myofibroblasty a byly negativní v reakcích k průkazu různých isoform S-100 proteinu. Zdá se, že tyto buňky se nejvíce blížily svými hlavními charakteristikami nezralým mezenchymovým elementům připomínajícím některými svými rysy kmenové mezenchymové buňky a myofibroblasty. Proliferační index nemohl být stanoven, neboť reakce s protilátkou proti Ki67 vyzněla málo přesvědčivě.

Chondrograft (NTC Brno) byl tvořen nosičem sestávajícím z vláken fibrinu a z relativně pravidelně distribuovaných kulatých buněk, které se podobaly poměrně diferencovaným chondrocytům. Tyto buňky exprimovaly alfa aktin hladké svaloviny. Chondrogenní původ buněk potvrdily výsledky imunohistochemického vyšetření, při kterém byla nalezena exprese různých

isoforem S-100 proteinu. Nejintenzivnější imunohistochemická reakce byla zaznamenána při použití protilátky S-100A6 proteinu. Proliferační index byl dosti vysoký, pohyboval se kolem 5 % při použití protilátky proti Ki67.

4.2.1.3. Chrupavka nově vytvořená po transplantaci autologních chondrocytů

Nově vytvořená kloubní chrupavka odebraná 10 - 12 měsíců po transplantaci autologních chondrocytů vázaných na Hyalograft C měla převážně hyalinní charakter. Všechny buňky byly vitální, neboť obsahovaly dobře se barvící jádra zřetelně ohraničená proti cytoplazmě. Kolumnární uspořádání chondrocytů v dolní vrstvě chrupavkového krytu nebylo vyznačené. Tento nálezný svědčil pro neúplnou zralost nově tvořeného chrupavkového krytu.

Nově vytvořená chrupavka obsahovala značné množství proteoglykanů, jak bylo možné verifikovat při barvení alciánovou modří a Safraninem O. Imunohistochemický průkaz kolagenu II vyzněl rovněž pozitivně, přestože byly k dispozici pouze vzorky fixované formolem. Při vyšetření v polarizovaném světle byly pozorovány v oblastech vazivové chrupavky nepravidelně orientované svazky kolagenních fibril. Naproti tomu oblasti sestávající z hyalinní chrupavky se svojí strukturou nelišily od normální chrupavkové tkáně tohoto typu.

Zóny kalcifikované chrupavky nacházející se v těsném sousedství kostního plató byly rovněž inkompletně vytvořeny. Ve všech biopsiích bylo však možné pozorovat perfektní integraci chrupavky do kosti. V subchondrální kosti byly zaznamenány známky probíhající remodelace, pro což svědčila přítomnost osteoklastů, pozitivních v reakci k průkazu CD68 a výskyt osteoblastických lemů na povrchu kostních trámců.

V oblastech s převažující vazivovou chrupavkou většina chondrocytů obsahovala v cytoplazmě alfa aktin hladké svaloviny a byla S-100 protein pozitivní. Všechny ostatní imunohistochemické reakce vyzněly negativně.

Ve dvou případech byl zaznamenán neobvyklý nálezný reprezentovaný fokální akumulací makrofágů s nápadně modře se barvící cytoplazmou, které byly pozorovány jak mezi buňkami nově vytvořené cytoplazmy, tak i v intertraberkulárních prostorách subchondrální kosti. Domníváme se, že makrofágy obsahovaly ve své cytoplazmě zbytky fagocytovaného fibrilárního materiálu nosiče, který sestával z vláken esteru kyseliny hyaluronové. Svědčilo by pro to naše zjištění, že cytoplazma těchto buněk se zřetelně zbarvila v reakci s alciánovou modří.

Nálezy po transplantaci Chondrograftu byly verifikovány u všech pacientů při vyšetření bioptických vzorků odebraných během druhého artroskopického vyšetření. V průměru se chrupavka jevila o něco více vyzrálá a byla převážně tvořena lakunárními buňkami na rozdíl od první skupiny pacientů. Vazivová chrupavka se vyskytovala pouze v malých oblastech bioptických vzorků. Výsledky vyšetření k průkazu alfa aktinu hladké svaloviny a S-100 proteinu byly podobné jako u první skupiny, t.j. alfa aktin pozitivní chondrocyty se vyskytovaly převážně v oblastech s vazivovou chrupavkou a S-100 protein byl pozitivní ve většině buněk.

4.2.1.4. RT-PCR analýza

Při RT-PCR analýze byl detekován ve všech vyšetřených vzorcích alfa aktin hladké svaloviny a beta a gamma aktin. Tím byly ověřeny výsledky imunohistochemického vyšetření, prokazující alfa aktin hladké svaloviny v chondrocytech v normální chrupavce i v chrupavce poškozené.

4.2.2. Přehled současných zobrazovacích metod při diagnostice defektů kloubní chrupavky

Základním vyšetřením je RTG snímek v AP a bočné projekci. Na tomto snímku se dobře zobrazí anatomické postavení skeletu kolenního kloubu, šíře kloubní štěrbin i subchondrální kostní změny. Na kloubních plochách i v jejich okolí je možné zachytit degenerativní změny. Bližší hodnocení měkkých tkání v okolí kloubu stejně jako kloubní chrupavky však není možné.

CT nativní vyšetření umožní přesnější zhodnocení skeletu kolena, detailnější změny struktury a může již ukázat zmnoženou kolekci tekutiny v okolí či přímo v kolenním kloubu. Z hrubých dat u MDCT přístrojů lze přepočítat všechny požadované roviny. Degenerativní změny

skeletu a jeho okolí lze dobře hodnotit. Bližší hodnocení měkkých tkání v okolí kloubu je však možné jen orientačně. Tato metoda příliš neumožňuje ani hodnocení nitrokloubních struktur zejména menisků, vazů a kloubní chrupavky.

Ultrazvukové vyšetření umožňuje posoudit množství tekutiny v kloubu a jeho okolí. Měkké tkáně i chrupavka kloubní je poměrně dobře identifikovatelná, lze hodnotit i změny v její tloušťce. Skelet však ultrazvukovým vyšetřením nelze blíže posoudit, neboť ultrazvuk se od kostí odráží. Další nevýhodou ultrasonografického vyšetření je jeho nízká zpětná reprodukovatelnost, kdy posuzování změn je výrazně subjektivní a hodnocení musí provádět velmi erudovaný lékař.

Magnetická rezonance je výbornou metodou zobrazující kloubu obecně. Kromě dobrého rozlišení a možnosti zobrazení v libovolných rovinách využívá i výrazného tkáňového kontrastu, který se mění v závislosti na použité sekvenci. Vhodně zvolenými sekvencemi je možné zobrazit měkké tkáně včetně nitrokloubních struktur, jako jsou vazy, menisky a kloubní chrupavky. Zároveň lze sledovat charakter skeletu včetně subchondrálních reaktivních změn. MR umožňuje dobrou i zpětnou reprodukovatelnost výsledků. Její nevýhodou kromě známých kontraindikací jsou artefakty z kovů, pokud bylo vyšetřované místo již operováno. Nelze pominout ani pohybové artefakty. U některých pacientů může být negativně vnímána i délka vyšetření, neboť běžné vyšetření trvá 15-20 minut a udržet bolavé koleno ve strnulé nehybné poloze může být obtížné.

4.2.3. Nález defektů chrupavky zachycené na MR obrazech

Dvě třetiny defektů chrupavky byly u našich pacientů na mediálním kondylu femuru, jedna třetina na jeho laterálním kondylu. Defekt se projevuje na PD a zejména na T2 trufi3d sekvenci jako proužek vyššího signálu – světlejší na snímku – než okolní nepostižená chrupavka. Výška chrupavky v místě defektu bývá buď snižena, nebo dokonce chrupavka zcela mizí. Při vymizení chrupavky se objevuje subchondrálně reaktivní kostní edém, který se prokáže na PD či T2 sekvencích se saturací tuku zvýšením signálu v daném místě skeletu.

Po autologní transplantaci vykultivované chrupavky se nachází na MR obrazech signálový obraz podobný jizevnaté tkáni případně i s obrazem struktur subchondrální kosti. Obraz transplantátu je bez vyšších signálových změn sledujících prosáknutí vodou. Tento nález do jisté míry odpovídá histologické struktuře transplantátu, kde chondrocyty jsou uloženy v matrix fibrilární sítě esteru kyseliny hyaluronové, případně mezi vlákny fibrinu. Proto se v obou druzích kultur přítomnost transplantátu jeví jako hyposignální pruh na T2 sekvencích a isosignální pruh stejný jako skelet na T1 sekvenci.

Porovnáním transplantátu po čtyřech letech bylo shledáno, že transplantát nezměnil svůj charakter ani velikost a u všech vyšetřených pacientů byl dobře funkční, uložený na svém místě. U pěti pacientů nebyl při operaci defekt transplantátem zcela překrytý, přesto při kontrole nejevil známky zvětšení. Nejspíše i v místě ponechaného defektu transplantát zastoupil funkci chrupavky.

Většina kolenních kloubů vykazovala degenerativní změny, které se projevovaly přístřením a návalky na okrajích kondylů femuru i tibie. U jedenácti pacientů byla přítomna léze menisku a u devíti pacientů byl kolenní kloub již ošetřen operačně v předchozím období plastikou předního zkříženého vazů. Tomu odpovídá i mechanismus, kdy traumatická událost poškodí na prvním místě přední zkřížený vaz. Tento vaz musí být pro zajištění stability kolenního kloubu nahrazen a teprve s odstupem doby se vyvine chondromalacie směřující až k úplnému defektu kloubní chrupavky.

5. Diskuse

5.1. PFFD

5.1.1. Klinický náález a průběh

Kongenitální defekt femuru je nápadný hned po narození, hypoplazie se odkryje až během růstu. U typických a nejčastěji se vyskytujících defektů (Pappas II, III, IV) je stehno krátké, masivní, nožka postižené strany stojí často v úrovni protilehlého kolena, nebo končí v úrovni proximálního bérce (13). Často je patrné chybění fibulárního paprsku nohy, chodidlo je ve valgózním postavení.

Dítě se většinou vyvíjí uspokojivě, začíná se stavět v normální době, ale pro defekt končetiny není schopno chůze. Zkrat se postupně zvětšuje, bez léčení se na konci růstového období pohybuje mezi 5cm u typu IX, až po 40cm u typů II a III. Kvalita života jedinců s PFFD závažných typů je velmi negativně ovlivněna.

5.1.2. Diferenciální diagnostika

V diferenciální diagnostice je nutné vyloučit *vrozenou dysplazii kyčle*, jejíž zejména těžší formy mohou napodobovat PFFD, pokud je současně dislokována hlavice femuru.

Traumatická epifyzeolýza hlavice femuru může být přítomna u novorozenců. Hlavním poznávacím znakem proti PFFD je edém v epifýze femuru případně i edém v okolí měkkých tkání proximálního stehna. Edém skeletu lze velmi dobře diagnostikovat na MR (34).

Kongenitálně zkrácený femur je samostatná jednotka, kdy sice mohou být přítomna coxa vara, ale nelze zde nalézt abnormality v oblasti acetabula, hlavice či krčku femuru (35).

Meningokoková sepe v časném dětství může způsobit embolické epizody, které se mohou projevit jako ischemie skeletu postihující i proximální femur. Často se zde pak najde fragmentovaná, deformovaná hlavice femuru případně i krčku. Dochází ke zkrácení kyčle. Vzhledem k tomu, že sepe postihuje celý organismus, jsou septické emboly a jejich projevy patrné i jinde v organismu, často i v jiných orgánech (6).

5.1.3. Terapie

Management PFFD potřebuje vždy multidisciplinární tým složený z pediatra, ortopeda, protetika a fyzioterapeuta. Vzhledem k tomu, že PFFD představuje široké spektrum vývojových poruch femuru, je i terapie u každého jednotlivého případu odlišná.

Na prvním místě musí terapie řešit zkrácenou délku femuru. Méně zřetelné, avšak stejně důležité je i zajištění uspokojivé funkce kyčle. Konzervativní léčba spočívá v protetické péči. Zkratky do 5-7 cm je možno řešit úpravou obuvi, větší zkratky ortoprotézou.

Operační léčení je svízelné. První ortopedická operace se neprovádí dříve než ve věku tří let, kdy lze již relativně přesně určit povahu a typ PFFD. Na prvním místě se sleduje stabilita případně nestabilita postižené kyčle a dále pohyblivost hlavice umístěné v acetabulu. U stabilního kyčelního kloubu je indikována postupná prolongace, která má však také svá specifika. Pokud se nachází epifýza hlavice v hypoplastickém acetabulu, které bývá strmé, bývá prvním krokem v terapii Salterova osteotomie pánve. U PFFD se oba tyto výkony – Salterova osteotomie i valgizační osteotomie kyčle – neprovádí současně. Je to dáno složitějšími anatomickými vztahy, které by v případě snahy urychlit terapii nemusely mít dobrý efekt (36).

U typů s defektním paklobem proximálního femuru (Pappas II, III, IV) je terapie vůbec nejobtížnější. Byla navržena řada postupů, vyhlídky na funkční rekonstrukci alespoň přiměřeně kratší končetiny jsou však po těchto výkonech mizivé. Pokud je zachovalá osifikovaná epifýza hlavice femuru, i když bývá menší velikosti a je prokazatelně mobilní v acetabulu, provádí se rekonstrukce pseudoartrózy (PA rekonstrukce), při které se chrupavčitá tkáň vytne a diafýza femuru se spojuje s epifýzou hlavice. Takové spojení sice posune dlouhou osu končetiny mediálně k tělu, ale u většiny pacientů s tímto druhem léčby se dosahuje velmi dobrého efektu (37, 38).

Terapeutický postup trvá s přestávkami celé dětství a je rozdělen na jednotlivé kroky.

V 1. roce je snaha ozřejmit vývoj kyčelního kloubu a zhotovit prozatímní bérceovou ortoprotézu, ve které se dítě naučí většinou dobře chodit. Ve 3 letech začíná vlastní operační léčba. Nejprve se pelvifemorální zevní fixací stáhne proximální konec diafýzy pod úroveň kyčelního kloubu (1. etapa), poté následuje napojení diafýzy na hlavici a resekcce pakloubu (2. etapa). Po zhojení se ponechá dítě chodit s ortoprotézou a kolem 5. roku věku se zahájí postupná prolongace v pelvifemorálním systému k prevenci poškození hlavice či její luxace (3. etapa). Po ukončení prodlužování asi po 300 dnech je aparát odstraněn a regenerát zajištěn proti kontrakci silným Kirschnerovým drátem nebo subkutánní úzkou dlahou. Prolongace v této době může dosáhnout i více než 100 % původní délky femuru. V dalším období se odstraňují přidružené deformity (4. etapa). Prodloužený femur zaostává v růstu, proto je kolem 9. roku věku potřebná další prolongace (asi o 7 až 10 cm) a po dosažení tělesné výšky 150 cm je indikována epifyzeodéza kolem zdravého kolena na druhostranné končetině (5. etapa). Po ukončení růstu je třeba zejména u děvčat odstranit rozsáhlé jizvy, vytvořit přirozené kožní rýhy jako genitofemorální a gluteofemorální a uvolnit podle možnosti pohyb kolena (6. etapa).

Někdy je nutné pro lepší uchycení a používání protézy částečně amputovat nohu (39). Při rozhodnutí pro amputaci je vhodné ji provést v co nejnižším věku, kdy má dítě přirozenou potřebu se samo stavět a kdy je schopné lépe se přizpůsobit nastalé situaci. Pokud mají rodiče dítěte možnost vidět pozitivní výsledky u jiných postižených dětí, souhlas k amputaci udělí daleko snadněji (40). Současně nižší věk dítěte umožní lepší adaptabilitu na nastalou situaci nejen na úrovni pohybové, ale také psychologické.

Hojné písemnictví, věnované problematice PFFD, se zabývá téměř výlučně charakteristikou skeletálních struktur (41). Studie, všímající si i změn měkkých tkání jsou ojedinělé (42) a týkají se okolních svalových skupin. Sami jsme jako první ve světovém písemnictví zaznamenali u svých dvou nemocných abnormální vaskularizaci v postižené oblasti (1, 7, 33, 43). V diskusi se proto podrobněji věnujeme této problematice.

5.1.4. Cévní zásobení a jeho anomálie

Naše studie jako první přináší doklad, že změny skeletu při PFFD bývají současně doprovázeny i úchylkami cévního zásobení. Potvrzuje tak předpoklad komplexnosti zásahu do vývoje dolní končetiny. Diagnostikovali jsme zmenšení průměru i délky cév v porovnání s nepostíženou stranou i jiné uložení bifurkace hlavní tepny (AFC či dokonce AIC). Atypický cévní průběh jsme pozorovali u dvou z osmi vyšetřených případů PFFD typ III sec. Pappas. U těchto dvou pacientů hlavní zásobující tepnou pro dolní končetinu byla arteria comitans nervi ischiadici, jejíž označení jako arteria ischiadica je v souladu s údaji v písemnictví (44, 45, 46). Tato tepna odstupovala z arteria iliaca interna, postupovala jako větev arteria glutea inferior a pokračovala dále k bérce jako arteria poplitea. Femorální řečiště mělo nevelké povodí, odpovídající krevnímu zásobení pouze části svalů zmenšeného stehna a oblasti vrozeného pakloubu.

Naše vyšetření neprokázalo anastomózy mezi arteria glutea inferior či arteria ischiadica s arteria femoralis superficialis nebo profunda, jaké jsou v písemnictví popisovány u některých patologických stavů, spojených s chronickou ischemií dolní končetiny (44, 45).

Šíře průměru tepen byla přímo úměrná stupni postižení. Výrazněji zúžené tepny jsme diagnostikovali u typů I – IV sec. Pappas. U typů VII – IX sec. Pappas byly arterie jen nepatrně zúžené, což zcela odpovídalo objemu krve zásobované tkáni. U těžších forem je výrazná redukce celého stehna, zatímco u mírných forem je objem vaskularizované oblasti na obou dolních končetinách obdobný.

U typu PFFD I – IV sec. Pappas a jednoho pacienta typu VII sec. Pappas byla bifurkace AFC uložena proximálněji než na nepostížené straně a nejproximálněji lokalizované bifurkace AFC jsme zastihli nad úrovní tříselného vazů. U ostatních pacientů se bifurkace AFC nacházela v úrovni nepostížené strany, případně paradoxně ještě distálněji než na zdravé kontralaterální končetině. U proximálně uložených bifurkací lze předpokládat celkový zkrat cév, změny opačným směrem, byť relativně malé, nelze objektivně objasnit. Domníváme se, že se jedná o varietu, která se však

v našem souboru vyskytla relativně často (3 z 21 případů) a ve vztahu pouze k mírným formám typu VII – IX sec. Pappas je poměr ještě vyšší (3 z 10 případů). Obdobné cévní variety jsou popisované i v literatuře (44).

Vysvětlení pro anomálii cévního zásobení lze hledat v ontogenezi. Všichni nižší savci mají jako hlavní tepnu zásobující dolní končetinu právě arteria ischiadica (46), teprve u vyšších savců se stala hlavní zásobující tepnou arteria femoralis. U lidí byly popsány vzácné případy cévního zásobení normální dolní končetiny cestou arteria iliaca interna, arteria glutea inferior, arteria ischiadica (45). Někdy byly přítomny různé formy anastomóz mezi femorální a ischiadickou tepnou, případně obě dominantní tepny pokračovaly na bérec a zásobovaly příslušné oblasti každá ve svém povodí (4, 47). U pacientů s chronickou cévní nedostatečností a aterosklerózou byla v písemnictví zaznamenána sekundárně hypertrofovaná arteria ischiadica, neboť při pozvolném uzávěru AIC, AIE, AFC případně AFS cévní zásobení příslušné oblasti je zajišťováno jinou možnou cestou – cestou AII, AGI a arteria ischiadica (48).

U dvou sledovaných pacientů (pacient č. 2 a č. 3 v tabulce 1) s anomálním cévním zásobením se po bifurkaci AFC laterální tepna stává AFP a zásobuje oblast pakloubu a vybraných svalových skupin, zejména musculus quadriceps femoris, případně i musculus biceps femoris. Mediálně odstupující tepna se stává AFS a zásobuje zejména svaly adduktorové skupiny stehna. Obě tepny prakticky končily nad kolenní šterbinou, pouze AFS u pacienta č. 3 přesahovala pod kolenní šterbinu v rozsahu hypertrofického musculus sartorius. Žádná z femorálních tepen, AFS ani AFP, nepokračovala na bérec a dále na nohu a hlavní cévní zásobení zajišťovala arteria ischiadica. Tento nálezný odpovídá přetrvávání cévního zásobení dolní končetiny v embryonálním období (47). Embryonální cévní zásobení dolní končetiny je nejdříve zprostředkováno primitivní tepnou, tzv. axiální arterií (44, 45, 47), jež pokračuje jako arteria ischiadica a dále jako arteria poplitea s větvemi dosahujícími až na nohu. Toto uspořádání je přítomné kolem 4. týdne gestace, AIE se objevuje až v 5. týdnu a během 5. až 6. týdne se dělí na arteria epigastrica inferior a na arteria femoralis. V 7. týdnu gestace se arteria femoralis dělí na mediální a laterální větev. Mediální větev postupně anastomózuje s arteria ischiadica a tím se arteria femoralis začne podílet na cévním zásobení dolní končetiny. Již v 8. týdnu gestace přesáhne kalibr femorální tepny průměr tepny ischiadické. V této době dochází také k diferenciaci jednotlivých svalů. Na konci 8. týdne gestace se přerušuje kontinuita arterie ischiadica a od této chvíle je dolní končetina pod úrovní kolena zásobena krví jen cestou arteria femoralis. Embryonální axiální arterie a arteria ischiadica dále perzistují jako arteria glutea inferior, respektive jako tenká arteria comitans nervi ischiadici končící na stehně dorsálně (44, 45).

Z popisu vývoje cévního zásobení embrya je zřejmé, že kritický čas na propojení mezi femorální a ischiadickou tepnou je okolo 6. až 7. týdne gestace. Pokud se v této době arteria femoralis nespojí svojí mediální větví s arteria ischiadica, přetrvá arteria ischiadica jako dominantní tepna zásobující dolní končetinu.

Přítomnost cévních anomálií u PFFD svědčí pro komplexnost vývojových změn. Samotné PFFD zahrnuje nejen defekty kyčelního kloubu, proximálního femuru, pánve a acetabula, ale také doprovodné změny patelly, zkřížených vazů kolene, femorálních kondylů, fibuly a nohy (49). Oprávněně lze proto předpokládat, že změny mohou postihovat i struktury svalů, cév a nervů.

Z literatury je známo, že dominantní arteria ischiadica je velice vzácným nálezem (45). Prevalence PFFD v populaci je asi 2 případy na 100 000 obyvatel (5, 6, 45). V naší sestavě jsme diagnostikovali dva případy z 21 pacientů a domníváme se, že přítomnost cévních změn u PFFD bude mít vyšší frekvenci než v běžné populaci. U každého nového pacienta zejména s těžšími formami PFFD typu I – IV sec. Pappas je vhodné vyšetřit i možnost přítomnosti cévní anomálie.

Cévní variety menšího rozsahu, přítomné u téměř všech našich pacientů s PFFD, nemají vliv na změnu strategie terapie včetně chirurgické léčby. U dvou našich detailně popsaných případů (pacient č. 2 a 3), musí chirurg velmi pečlivě naplánovat postup při jakémkoliv prováděném výkonu

na proximálním femuru či kyčli. Každý zásah chirurga vyžaduje velkou obezřetnost, aby nedošlo k narušení krevního zásobení postižené končetiny (7).

Na možnost atypického průběhu cév je nutné myslet i při použití vysoké sádrové spiky či při vytváření různých protetických a ortotických pomůcek. Pomůcka totiž musí respektovat cévní uložení a nevyvolávat chronické tlakové změny, které by zhoršovaly krevní zásobení končetiny. Protože ani v jednom našem případě se nevytvořily výraznější anastomózy mezi řečištěm arteria ischiadica a arteria femoralis, při poškození dominantní tepny je výrazné riziko vzniku závažných poruch v jejím povodí.

Vizualizace cév použitím CTAG je velmi uspokojivou metodou, kdy šíře cévy okolo 0,5 mm je dobře hodnotitelná. Při předpokladu, že rozlišovací schopnost se bude v dalších letech dále zvyšovat, lze předpokládat postupné rozlišení šíře cév minimálně do 0,3 mm případně 0,2 mm. CTAG však nezobrazuje jen cévy, ale po aplikaci kontrastní látky intravenózně se poměrně dobře zobrazují i svaly, zejména při použití softwarů k odstranění kosti z vyšetřené objemu dat pacienta. Vyšetření pomocí CT je velmi rychlé a jednoduché a jeho trvání běžně nepřesahuje 10 minut. Samotný sken CTAG trvá podle velikosti pacienta 3 až 7 sekund. Na nejnovějším CT přístroji, který má naše pracoviště nyní k dispozici, lze již vyšetřit oblast pánve a dolních končetin u dětí ve stejné či dokonce lepší kvalitě během 1 či 2 sekund. Při vyšetřeních v trvání jen několika sekund není ani u poměrně malých dětí nutné používat anestezii, zejména pokud se pro vyšetřované děti navodí příjemná přátelská atmosféra. Podle vlastní zkušenosti lze přátelskou atmosférou i formou určité hry přimět ke spolupráci a provést CT vyšetření bez anestezie asi u jedné poloviny dětí ve věku 3 až 6 let a u většiny dětí starších. Děti do 3 let je však lepší vyšetřit v krátké celkové anestezii.

5.1.5. Radiční zátěž a možné alternativní postupy

Nevýhodou CTAG a vůbec vyšetřování pomocí CT je radiční zátěž. I když tato zátěž se s modernizací CT přístrojů výrazně snižuje, podstatou vyšetření zůstává použití rentgenového záření. Podle našeho názoru přínos informací z CT včetně CTAG vyšetření převyšuje doprovodnou radiční zátěž. Přesné prostorové posouzení PFFD změn i informace o stavu cévního řečiště umožňují najít pro každého pacienta nejvhodnější terapeutickou metodu. Pokud před začátkem léčby se místo několika RTG snímků provede CT vyšetření, radiční zátěž je vyšší zhruba 10x, ale informační hodnota CT vyšetření může být ještě daleko významnější. Svědčí pro to i náš průkaz přítomnosti drobné osifikované epifýzy hlavice v acetabulu při CT vyšetření, kterou v různých projekcích opakovaně RTG snímky nedokázaly rozpoznat. Lze předpokládat, že při podobném nálezu u pacientů s volně mobilní epifýzou se operační postup naplánovaný pouze na základě RTG obrazu po upřesňujícím CT vyšetření může přiměřeně modifikovat.

Alternativou k CTAG vyšetření pro eliminaci radiční zátěže by mohlo být použití UZ a MR metod. Ultrasonografie přináší přiměřenou informaci o měkkých tkáních a o průsvitu cév, podle našich zkušeností však není vhodná pro přesnější posuzování cévního řečiště. UZ však neumožňuje ani dostatečné hodnocení kostních změn a 3D modelace skeletu je zcela nemožná. Nevýhodou této metody je i relativně subjektivní posuzování, velmi závislé na erudici vyšetřujícího lékaře. Pacienti z našeho souboru nebyli ultrazvukem vyšetřováni.

Další alternativou CT je MR vyšetření, jež využívá změny v magnetickém poli způsobené přítomností těla pacienta. Metoda pomocí tkáňového kontrastu může výborně zobrazit měkké tkáně včetně svalů, cév a nervů. Umožňuje provést MR angiografii, zejména po aplikaci gadoliniové kontrastní látky i s možností zobrazení cév ve 3D MIP obrazech. Jeho nevýhodou je délka samotného vyšetření, která běžně trvá 20 až 40 minut, a proto většina dětí do 8 let musí být vyšetřena v celkové anestezii. Další nevýhodou je odlišné zobrazení skeletu, neumožňující vytvářet 3D obrazy pouze skeletu, případně společné 3D zobrazení skeletu a cév. MR vyšetření nedovolují ani četné kontraindikace. Absolutní kontraindikace – kardiostimulátor či kochleární implantát – jsou u dětských pacientů velmi vzácné, relativní kontraindikací jsou různé kovové předměty, uložené po začátku terapie ve sledované oblasti. MR se může použít jen na začátku vyšetřovacího algoritmu

jako alternativa CT vyšetření (6, 50). V této době však ještě nelze vždy jednoznačně určit, zda informace z MR vyšetření budou dostačující pro směřování dalšího terapeutického postupu.

5.1.6. Dávky u PFFD

Dávky záření přijaté během CT vyšetření jsou stále vysoké, relativně vyšší u menších dětí. Jedno CT vyšetření (případně CTAG vyšetření) v roce 2005 odpovídalo zhruba 60-100 jednotlivým expozicím při RTG snímkování. Proti době, kdy byla u našich pacientů tato vyšetření pořízena (rok 2005-2008), došlo v současnosti k radikálním změnám v CT protokolech. Při vyšetření v roce 2014 je možné dosáhnout použitím rychlého multidetektorového přístroje případně multidetektorového přístroje se dvěma rentgenkami extrémně krátkého času akvizice dat. Tato doba dosahuje trvání 1s. U dlouhých akvizic zabírajících obě dolní končetiny a pánev má náběr dat trvání 2-3s. Je zřejmé, že zkrácení doby záření redukuje množství záření přijaté vyšetřovanou oblastí.

Současným snížením voltáže na 80-100kV a nastavením iterativních algoritmů pro rekonstrukci obrazu z hrubých dat lze snížit dávku na 1mSv u pacientů nad 15 let a na 1,5mSv u pacientů mladších 15 let. Vhodným nastavením lze dosáhnout téměř 70% snížení radiační zátěže při zachování stejné či obdobné kvality obrazu jako u klasického nastavení parametrů na CT společně s klasickou rekonstrukcí obrazových dat pomocí zpětné projekce (51).

Z uvedeného vyplývá, že dávka obdržená při CT vyšetření se během osmi let (od roku 2005) snížila o 50-80%. Lze tedy předpokládat, že v roce 2014 by jedno CTAG vyšetření u dětí dávkou odpovídalo ekvivalentu 20-40 jednotlivých expozic pořízených na RTG. Pokud porovnáme ekvivalent obdržené dávky se získanou informací, která je násobně větší než z prostých RTG snímků, je použití CTAG vyšetření zcela adekvátní a lze doporučit jeho zařazení do vyšetřovacího algoritmu.

5.1.7. Histopatologické nálezy a možné patofyziologické mechanismy

Z nepřímých známek je možno na základě histologického nálezu usuzovat, že výstavba kostní tkáně v místě postižení probíhala značně chaoticky. Kostní tkáň nepochybně vznikala na podkladě chrupavčité komponenty, která měla všechny rysy hyalinní chrupavky nevyzrálého typu, jaká se vyskytuje v epifýzách dlouhých kostí v prenatálním období. Vyzrání v lakunární buňky, jak tomu bývá v epifyzárních centrech, bylo vyznačeno jen v minimální míře. Chrupavčitá tkáň vykazovala některé znaky embryonální chrupavky a navíc chondrocyty vůbec neexprimovaly S-100 protein.

Tyto skutečnosti ukazují, že nevyzrálost chrupavčité komponenty v místě vývojové poruchy by mohla hrát určitou roli při vzniku tohoto typu lézí. Dalším faktorem, který by se mohl při vzniku defektu uplatňovat, jsou změny vaskularizace. Pokud však nejsou k dispozici větší topograficky dostatečně přehledné tkáňové vzorky, nelze význam tohoto fenoménu blíže posoudit.

Negativní výsledek pátrání ve tkáních z místa defektu po případných reziduích nekrózy nenavzděčuje tomu, že by se při rozvoji této vývojové poruchy v prokazatelné míře uplatňovalo ischemické poškození některé z tkáňových komponent. Nelze však vyloučit, že ischemické změny proběhly v embryonálním období vývoje, kdy následně v rámci reparativních pochodů došlo k jejich odstranění.

Ischemické poškození epifýzy hlavice femuru vede ke zvýšené produkci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), který stimuluje invazi cév a tvorbu granulační tkáně v oblasti nekrotické epifyzární chrupavky. Toto umožňuje resorpci nekrotické chrupavčité tkáně a obnovení enchondrální osifikace, vedoucí k dalšímu růstu a vývoji femuru (52). Tyto závěry vyplynuly z experimentů na pigletech. Ačkoliv výsledky pokusů nelze zjednodušeně převádět do humánní medicíny, určitá podoba histologických nálezů u našich pacientů svědčí pro možnou účast podobných molekulárních mechanismů, které však nemusí být iniciovány pouze ischemickými pochody. V případě dvou našich pacientů s anomálním cévním větvením (pacient č. 2 a 3) je však nutno s touto možností počítat.

5.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru

5.2.1. Histologické nálezy a možné patofyziologické mechanismy

Chrupavka odebraná ze spodiny chrupavkových defektů sestávala ze směsi hyalinní a vazivové chrupavky. Četné chondrocyty obsahovaly alfa aktin hladké svaloviny, jak bylo popsáno již dříve (53). Tento nález nasvědčuje tomu, že imunofenotyp chondrocytů se může v rámci adaptačních mechanismů měnit podle různých situací. Chondrocyty pravděpodobně získávají některé rysy buněk hladké svaloviny v průběhu hojivého procesu, aby vytvořily vazivovou chrupavku jako první stupeň hojení. Na základě těchto nálezů předpokládáme, že fenotyp chondrocytů je variabilní a může být modulován různými stimuly zevního prostředí (53).

5.2.2. Výsledky transplantace autologních chondrocytů s porovnáním dvou různých biomateriálů

Nově vyvinuté léčebné postupy založené na transplantaci autologních chondrocytů představují významný pokrok při léčení posttraumatických defektů kloubní chrupavky a jsou ve světě i u nás běžně využívány. Tkáňové inženýrství aplikující kombinace buněk a nosičů s různými bioaktivními faktory přineslo mnoho nových slibných praktických i teoretických poznatků jak restaurovat tkáňové defekty. Hlavním cílem naší práce bylo porovnat nově vytvořenou chrupavčitou tkáň vznikající po transplantaci dvou odlišných nosičů autologních chondrocytů do místa defektů v oblasti kondylů femuru. Hyalograft C je produkt italské proveniencí tvořený autologními chondrocyty vypěstovanými na 3D nosiči tvořeném HYAFF11 (24, 26, 54, 55, 56), což je benzylester kyseliny hyaluronové. Tento biokompatibilní a biodegradabilní materiál byl opakovaně použit při léčení defektů kloubní chrupavky a dosažené výsledky transplantace jsou vynikající. Proto je tento postup v podstatě běžnou součástí klinické praxe na řadě především zahraničních pracovišť.

Imunohistochemické studie stejně jako RT-PCR analýza prokázaly v pokusech in vitro, že chondrocyty osazené na HYAFF11 exprimují a produkují kolagen typu II a agrekan (26, 54), avšak cytologické charakteristiky buněk, které jsou součástí transplantátů, nebyly podle našeho zjištění blíže zmíněny. Podobná situace je i v případě brněnské kultury, u které je nosičem fibrinové lepidlo. Podle našeho zjištění je buněčné složení obou kultur zcela odlišné. Přesto, že buňky byly kultivovány na 3D nosičích, jejich diferenciací nedosáhla úroveň nativních chondrocytů. Buňky kultivované na vláknech esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft C) nejspíše odpovídají nezralým mezenchymovým buňkám, připomínajícím fibroblasty a myofibroblasty, a to především svým tvarem a expresí alfa-aktinu hladké svaloviny. Nepozorovali jsme známky jakékoliv diferenciací směrem k chondrocytům. Naproti tomu buňky Chondrograftu (NTC Brno) vykazovaly některé znaky chondrocytů, neboť měly okrouhlý tvar a exprimovaly S-100 protein i alfa aktin hladké svaloviny a zároveň se vyznačovaly vysokým stupněm proliferační aktivity při vyšetření s protilátkou proti Ki67.

Oba transplantační postupy přinesly z krátkodobého pohledu dobré klinické výsledky. Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami pacientů při makroskopickém ani mikroskopickém vyšetření nově vytvořené chrupavkové tkáně. U všech pacientů došlo ke zlepšení klinického obrazu onemocnění a při artroskopickém vyšetření byl makroskopický obraz v místě původního defektu zcela nebo téměř normální.

K dispozici byly bioptické vzorky od 30 pacientů s nově vytvořenou kloubní chrupavkou, které byly hodnoceny za použití standardního histologického, histochemického a imunohistochemického vyšetření. Tato vyšetření umožnila přesně určit strukturální charakteristiky chondrocytů i charakter mezibuněčné hmoty s ohledem na přítomnost proteoglykanů. Z nálezů bylo možno odvodit, že chondrocyty nebo jejich prekurzory vypěstované in vitro a přenesené na zcela odlišné nosiče daly vzniknout nové chrupavkové tkáni po transplantaci do defektu kloubního krytu. Nabyli jsme dojmu, že po transplantaci brněnského chondrograftu byla nově vytvořená chrupavka mírně vyzářejší a tvořená převážně lakunárními buňkami.

Na základě výsledků předchozích prací publikovaných v literatuře (26, 29, 55, 56) bylo známo, že chrupavka vznikající po transplantaci Hyalograftu C vyzrává kolem 11 měsíce.

5.2.3. Biodegradabilita použitých nosičů

Samostatnou problematiku představuje otázka biodegradability používaných nosičů. Zdá se, že fibrinové lepidlo bylo kompletně odbouráno, takže se nepodařilo identifikovat žádná rezidua tohoto materiálu ani v nově vytvořené chrupavčité tkáni ani v přilehlých strukturách subchondrální kosti. Tento závěr se zdá být vcelku logický, neboť se jedná o materiál svými vlastnostmi velmi blízký biologickému materiálu, tj. fibrinu. U druhého nosiče tvořeného vláknitého esteru kyseliny hyaluronové může být situace komplikovanější, i když v literatuře jsme nenašli konkrétnější zmínky o jeho degradaci v biologických podmínkách. Nálezy u našich dvou případů však nasvědčují tomu, že jeho degradace pravděpodobně bude trvat déle a nemusí být v časovém úseku 10-12 měsíců vždy kompletní. V těchto případech byl zaznamenán výskyt makrofágů s nápadně bazofilní cytoplazmou, v níž byly prokázány hojné kyselé mukopolysacharidy. Podařilo se je znázornit v histochemické reakci k průkazu těchto látek při barvení alcianovou modří. Tyto buňky jsme zaznamenali především ve dřevných intertrabekulárních prostorách subchondrální kostní tkáně, ale i mezi chondrocyty přímo v nově vytvořené chrupavce. Jejich makrofagický původ potvrdilo imunohistochemické vyšetření s pozitivitou CD 68, které v nich prokázalo přítomnost bohatého lyzozomálního aparátu. Nikde nebyly zaznamenány vláknité formace, které se zřejmě v průběhu resorpční reakce zcela rozpustily. Bližší objasnění celého procesu biodegradace nebylo možné, neboť tato otázka by vyžadovala experimentální studii na zvířatech a ta není reálná pro omezené množství velmi drahého transplantátu.

V současné době zatím není známa metoda, která by umožňovala vytvořit fenotypicky stabilní populaci buněk s typickými charakteristikami jednotlivých zón kloubní chrupavky. Rozdíly v organizaci matrix a jejím složení v jednotlivých zónách vyplývají nepochybně z funkční variability různých typů chondrocytů, vytvářejících odlišné zóny kloubního chrupavkového krytu. Objevují se proto snahy různou manipulací s progenitorními buňkami vytvořit kultury se známkami zonální diferenciaci. V poslední době jsou komerčně připravovány a analyzovány nové typy kultur, které by mohly vyhovovat těmto požadavkům. (23, 30). Zároveň je potřebné pátrat po faktorech, které by po transplantaci urychlily proces vyzrávání nově vytvořené chrupavkové tkáně.

5.2.4. Použití MR při sledování transplantátu

U dvou třetin našich pacientů byl defekt chrupavky lokalizován na mediálním kondylu a v jedné třetině na laterálním kondylu femuru. Na PD a zejména na T2 trufi3d sekvenci se defekt projevoval jako proužek vyššího signálu a na snímku byl světlejší než okolní nepostižená chrupavka. Výška chrupavkového krytu v místě defektu byla buď snižena, nebo dokonce chrupavka zcela vymizela. Při úplném vymizení chrupavky se subchondrálně objevoval reaktivní edém, vyvolávající na sekvencích PD a T2 se saturací tuku zvýšení signálu ve skeletu kondylů.

Po provedené autologní transplantaci vykultivovaných chondrocytů se nacházel na MR zobrazených signálový obraz podobný jizevnaté tkáni nebo připomínající obraz subchondrálního skeletu. Zobrazení transplantátu neukazovalo signálové změny svědčící pro jeho prosáknutí. Do jisté míry to odpovídá histologické struktuře skafoldu s uložením chondrocytů v matrix fibrilární síti esteru kyseliny hyaluronové případně mezi vlákny fibrinu. Obraz obou typů transplantátu má proto charakter hyposignálního pruhu na T2 sekvencích a isosignálního pruhu (stejného jako skelet) na T1 sekvenci. Podobné nálezy zaznamenal již Takahashi, jež však na rozdíl od nás nevyšetřoval kloubní změny opakovaně v rozmezí několika let (57).

Opakovaným vyšetřením po čtyřech letech jsme zjistili, že transplantát neměnil svůj charakter ani velikost. U všech vyšetřených pacientů byl transplantát dobře funkční, uložený na svém místě. U pěti pacientů již při prvním vyšetření transplantát nepřekrýval defekt v plném rozsahu, přesto se při kontrole velikost původního defektu nezvětšovala. Transplantát

pravděpodobně nahradil funkci chrupavkového krytu i v okraji přechodu do ponechaného zbytku defektu.

Většina kolenních kloubů vykazovala známky degenerativních změn, které se projevovaly přiosťřením a návalky na okrajích kondylů femuru i tibie. U jedenácti pacientů byl kolenní kloub již v předchozím období ošetřen plastikou předního zkříženého vazy. Tomu odpovídá i mechanismus vzniku defektu. Traumatická událost primárně poškodí přední zkřížený vaz, který musí být pro zajištění stability kolenního kloubu nahrazen. Teprve po určitém čase se vyvine chondromalacie směřující až k úplnému zániku kloubní chrupavky.

6. Závěry

6.1. PFFD

Pacienti s PFFD mají vzácné vrozené postižení skeletu kyčle, proximálního femuru a často i přidružené skeletální defekty. Podařilo se nám ukázat, že změny u PFFD jsou komplexní a postihují i cévní zásobení. Současně nepoužívanější klasifikace PFFD sec. Aitken a sec. Pappas jsou založené rentgenové diagnostice, ta samotná však neumožňuje hodnocení měkkých tkání, tedy ani cév. Bylo by proto výhodné zavést do vyšetřovacího algoritmu jedno CT vyšetření dosahující úrovně CTAG vyšetření, při němž se zobrazí současně se skeletem i měkké tkáně a hlavně cévy. Správným CTAG vyšetřením se minimalizuje radiační dávka na nezbytné minimum a přitom přínos informací je obrovský. Je možné přesněji určit typ PFFD, což někdy vede k reklasifikaci nálezu. V některých případech lze objevit na RTG nerozpoznatelné dosud skryté struktury, zejména osifikovanou epifýzu hlavice femuru na postižené straně. CT vyšetření umožňuje určit mobilitu osifikované hlavice proximální femorální epifýzy a zejména zobrazí prostorové uspořádání pakloubu na 3D obrazech v různých projekcích. Při použití kontrastní látky a vyšetřením metodou CTAG lze získat informace o průběhu cév, rozložení cévního stromu, případně lze určit různé formy variet či anomálií. Tato informace je nesmírně důležitá pro další plánování terapie ať už konzervativní (ortotika, protetika) nebo chirurgické.

Pro ušetření dávky záření se jeví nejvýhodnější použití pouze jednoho skenu při CT vyšetření, a to s aplikací kontrastní látky metodou CTAG. U ní jsou zastíženy všechny struktury a různými vizualizačními metodami je lze od sebe dobře odlišit. Současně s vyšetřením CT lze snížit množství v různých projekcích pořízených RTG snímků a tím eliminovat případné zdvojování radiační zátěže při použití obou metod. Svůj význam mají i metody bez radiační zátěže - UZ či MR, a to UZ pro sledování pohyblivosti epifýzy hlavice femuru a MR pro informaci o situaci před začátkem chirurgické terapie. Domníváme se, že výhody plynoucí z rychlého a efektivního vyšetření pomocí CT převažují nad jeho vyšší radiační zátěží, která navíc s uváděním nových CT přístrojů neustále klesá.

CT vyšetření lze doporučit jako standard zejména pro těžší formy PFFD, tedy typ I – IV sec. Pappas, neboť takto získané informace umožňují lépe směřovat terapii pacientů.

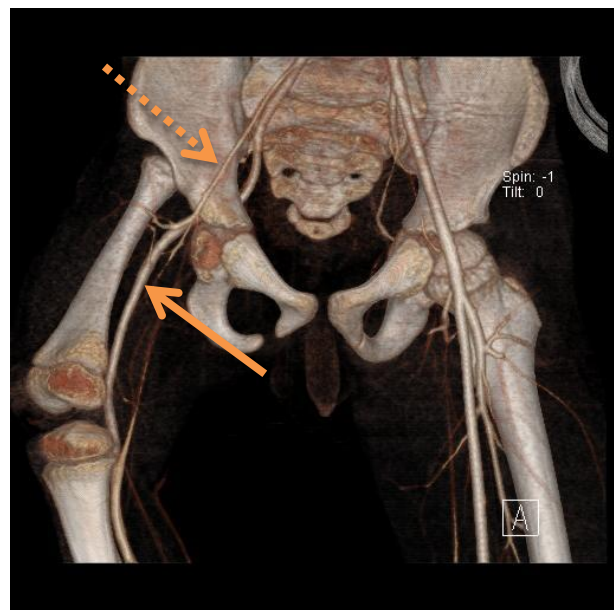
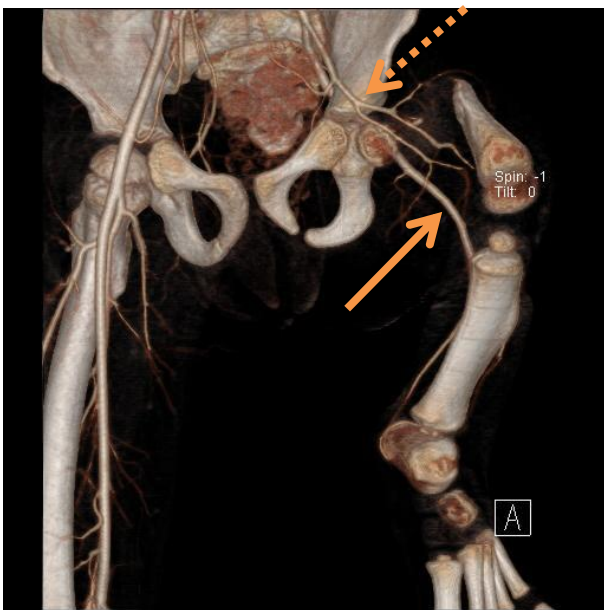
6.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky

Porovnání histologické struktury dvou odlišných nosičů použitých při léčbě posttraumatických defektů kloubní chrupavky transplantací autologních chondrocytů prokázalo zásadní rozdíly v jejich složení. Hyalograf C připravený v Itálii sestával z vláken esteru kyseliny hyaluronové a nezralých vřetenitých mezenchymových buněk, které vykazovaly zřetelnou pozitivitu alfa aktinu hladké svaloviny při negativitě markeru chondrocytů S-100 proteinu. Tyto buňky bylo možno charakterizovat jako prekurzory mezenchymových buněk s některými rysy myofibroblastů. Naproti tomu Chondrograft připravený v brněnském tkáňovém centru obsahoval jako základ fibrin, ve kterém byly distribuovány buňky oválného tvaru, pozitivní v reakcích

k průkazu alfa aktinu hladké svaloviny i S-100 proteinu. Můžeme proto konstatovat, že tyto elementy se svým tvarem i imunofenotypem nejvíce blížily charakteristikám chrupavkových buněk typu chondrocytů či prechondrocytů. Celkově je možno shrnout, že transplantace těchto dvou odlišných nosičů s kulturou různě vyvrážděných prekursorů mezenchymových buněk nebo nezralých chondrocytů vedla k vyhojení posttraumatických defektů kloubní chrupavky a k vytvoření souvislého kloubního krytu velmi podobného vzhledu. Chrupavková tkáň však po 10-12 měsících neměla homogenní strukturu, nýbrž byla směsí hyalinní a vazivové chrupavky. V nově vzniklé chrupavčité tkáni měly významné zastoupení alfa aktin a S-100 protein pozitivní chondrocyty, které pravděpodobně mají značnou regenerační schopnost ve srovnání s chondrocyty bez tohoto kontraktálního materiálu charakteru alfa aktinu hladké svaloviny. Nemůžeme se vyjádřit, zda by v pozdějším období došlo ke kompletní přeměně chrupavkové tkáně v hyalinní chrupavku či nikoliv, pokud nemáme možnost vyšetřit nově vytvořenou tkáň po časovém úseku delším než 10 měsíců od transplantace.

Přes pozitivní výsledky transplantace je nutno konstatovat, že ani v jedné skupině nebyla transformace v hyalinní chrupavku kompletní. Je možné, že artroskopický odběr druhého vzorku byl příliš časný a nelze vyloučit, že v pozdější fázi by restaurace chrupavky byla již kompletní. To znamená, že chrupavkový kryt by byl tvořen pouze hyalinní chrupavčitou tkání, která je nejodolnější na mechanické vlivy. Zatím však není známo, v jakém časovém limitu po transplantacích tohoto typu je možno očekávat kompletní vyzrání nově vytvořené kloubní chrupavky v její hyalinní formu.

7. Obrazová dokumentace



Obraz 1 – Pacient č. 2: typ III sec. Pappas vlevo – VRT anteriorní pohled, CTAG arteriální fáze. Atypické cévní zásobení dolní končetiny pomocí arteria ischiadica (šipka). Femorální tepna je hypoplastická (přerušovaná šipka).

Obraz 2 – Pacient č. 3: typ III sec. Pappas vpravo – VRT anteriorní pohled, CTAG arteriální fáze. Atypické cévní zásobení dolní končetiny pomocí arteria ischiadica (šipka). Femorální tepna je hypoplastická (přerušovaná šipka).

8. Seznam použitých zkratek, symbolů a pojmů

ACT	Transplantace autologních chondrocytů – Autologous chondrocyte transplantation
AFC	Arteria femoralis communis
AFP	Arteria femoralis profunda
AFS	Arteria femoralis superficialis
AGI	Arteria glutea inferior
AIC	Arteria iliaca communis
AIE	Arteria iliaca externa
AII	Arteria iliaca interna
ALARA	Tak nízko, jak lze rozumně dosáhnout – As Low As Reasonably Achievable
AP	Arteria poplitea
CT	Počítačová tomografie (výpočetní tomografie) – Computed tomography
CTDI	Dávkový index CT – CT dose index
COR	Koronární rovina – Coronal plane
DLP	Výsledná délková dávka na CT – Dose length product on CT
DK	Dolní končetina – Lower extremity
FN	Fakultní nemocnice – University Hospital
HE	Hematoxylin-eosin barvení – Hematoxylin-eosin staining
LDK	Levá dolní končetina – Left lower extremity
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy – Medical faculty of Charles University
MIP	Projekce maximální intenzity – Maximum intensity projection
MPR	Multiplanární rekonstrukce – Multiplanar reconstruction
MR	Magnetická rezonance – Magnetic resonance
MRI	Zobrazení magnetickou rezonancí – Magnetic resonance imaging
NTC	Národní tkáňové centrum – National tissue center
PD	Proton denzní MR sekvence – Proton density MR sequence
PD FS	Proton denzní MR sekvence se saturací tuku – Proton density MR sequence with fat saturation
PDK	Pravá dolní končetina – Right lower extremity
PFFD	Vrozeně krátký femur – Proximal femoral focal deficiency
ROI	Oblast zájmu – Region of interest
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – Real time polymerase chain reaction
RTG	Rentgenový, příp. rentgenový snímek – X-ray
SAG	Sagitální rovina – Sagittal plane
STIR	Inverzní MR sekvence saturující tuk (krátké tau inverzního návratu) – Fat saturating inversion recovery MR sequence (short tau inversion recovery)
T1 se	T1 vážená spin-echová MR sekvence – T1 weighted spin echo MR sequence
T2 dess	T2 gradientní MR sekvence duálního echa v rovnovážném stavu – T2 gradient echo steady state MR sequence
T2 trufi3d	T2 gradientní MR sekvence pravého rychlého echa v rovnovážném stavu při volné precesi – T2 gradient echo true fast imaging with steady state free precession MR sequence
T2 tse	T2 vážená turbo spin-echová MR sekvence – T2 weighted turbo spin echo MR sequence
TE	Echo čas u MR sekvencí – Echo Time used in MR sequences
TEP	Totální endoprotéza – Total endoprosthesis
TI	Čas inverse u MR sekvencí – Inversion Time used in MR sequences
TIRM	Inverzní MR sekvence saturující tuk (rychlý inverzní návrat magnetizace) – Fat saturating inversion recovery MR sequence (turbo inversion recovery magnitude)
TR	Repetiční čas u MR sekvencí – Repetition Time used in MR sequences
TRA	Transverzální rovina – Transversal plane
UZ	Ultrazvuk – Ultrasound
VRT	Volumová renderovací technika – Volume rendering technique

9. Seznam literatury

1. Horák M, Chomiak J, Kašpar M, Ryznarová Z, Mašek M, Frydrychová M, Dungl P. Anomálie cévního zásobení dolní končetiny u pacientů s vrozně krátkým femurem (PFFD) a význam CTAG při jejich diagnostice. *Ces. Radiol.* 2007; 61: 417-421.
2. Horák M, Handl M, Podškubka A, Kaňa R, Adler J, Povýšil C. Comparison of the Cellular Composition of Two Different Chondrocyte -Seeded Biomaterials and the Results of their Transplantation in Humans. *Folia Biol.* 2014; 1: 1-9.
3. Gillespie R, Torode IP. Classification and management of congenital abnormalities of the femur. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1983; 65: 557-568.
4. Anton CG, Applegate KE, Kuivila TE, Wilkes DC. Proximal Femoral Focal Deficiency. *Seminars in Musculoskeletal Radiology* 1999; 3: 215-225.
5. Oppenheim WL, Setoguchi Y, Fowler E. Overview and comparison of Syme's amputation and knee fusion with the van Nes rotationplasty procedure in proximal femoral focal deficiency. In: Herring JA, Birch J, eds. *The Child with a Limb Deficiency*. Chicago, Ill.: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1998
6. Manaster BJ, Roberts CC, Petersilge CA, Moore S, Hanrahan CJ, Crim J. *Diagnostic Imaging - Musculoskeletal: non-traumatic diseases*. Altona: Amirsys 2010; 4: 48-51
7. Chomiak J, Horak M, Masek M, Frydrychova F, Dungl P. Computed tomographic angiography in proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2009; 91(8): 1954-1964.
8. Bryant DD III, Epps CH. Proximal femoral focal deficiency: evaluation and management. *Orthopedics* 1991; 14: 775-784.
9. Aitken GT. Proximal femoral focal deficiency—definition, classification and management. In: Aitken (ed). *Proximal femoral focal deficiency: a congenital anomaly. A symposium on proximal femoral focal deficiency*. Washington DC: National Academy of Sciences National Research Council; 1969: 1-22.
10. Koman LA, Meyer LC, Warren FH. Proximal femoral focal deficiency: natural history and treatment. *Clin. Orthop.* 1982; 162: 135-143.
11. Pappas AM. Congenital abnormalities of the femur and related lower extremity malformations. *J. Pediatr. Orthop.* 1983; 3: 45-60.
12. Court C, Carlouz H. Radiological Study of Severe Proximal Femoral Focal Deficiency. *J. Pediatr. Orthop.* 1997; 17: 520-524.
13. Dungl P, et al., *Ortopedie*. Praha: Avicenum: Grada Publishing 2005: 888-894.
14. Dora C, Buhler M, Stover MD. Morphologic characteristics of acetabular dysplasia in proximal femoral focal deficiency. *J. Pediatr. Orthop. B.* 2004; 13(2): 81-87.
15. Oh KY, Frias AE, Byrne JLB, Kennedy AM. Unilateral short femur-what does this mean? Report of 3 cases. *Ultrasound Q.* 2008; 24(2): 89-92.
16. Stoller DW, Bertan S, et al. *Magnetic Resonance Imaging in Orthopaedics and Sports Medicine*. LWW, Baltimore 2006; 3rded(1): 41-305.
17. Chomiak J, Horák M, Mašek M, Dungl P, Ošťádal M, Frydrychová M, Podškubka A. Proximální femorální fokální deficiencie: přínos CT, CT angiografie a arthroscopie kolenního kloubu. *Ortopedie* 2010; 4(3): 150-155.
18. Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP. Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systemic review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008; 466: 952-962.
19. Brittberg M, Lindall A, Nilssen A. Treatment of deep cartilage defects in the knee without autologous chondrocytes transplantation. *N. England J. Med.* 1994; 331: 889-895.
20. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1997; 79B: 831-836.

21. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J. Orthop. Res.* 1994; 12: 485-497.
22. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of chondral defect in a canine model. *J. Orthop. Res.* 2003; 21: 272-281.
23. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury, Int. J. Care Injured* 2008; 39S1: S58-S65.
24. Tognana E, Borrione A, De Luca C, Pavesio A. Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs* 2007; 186: 97-103.
25. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Iacono F, Marcacci M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation: a prospective 7-year follow-up study. *Am. J. Sports Med.* 2011; 39: 2153-2160.
26. Hollander AP, Dickinson SC, Sims TJ, Soranzo C, Pavesio A. Quantitative analysis of repair tissue biopsies following chondrocyte implantation. *Tissue engineering of cartilage and bone Novartis Foundation on Symposium* 2003; 249: 218-233.
27. Hollander AP, Dickinson SC, Sims TJ, Brun P, Cortivo R, Kon E, Marcacci M, Zanasi S, Borrione A, De Luca C, Pavesio A, Soranzo C, Abatangelo G. Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue Engineering* 2006; 12: 1778-1798.
28. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. *J. Bone Joint Surg.* 2004; 86: 455-464.
29. Podškubka A, Povýšil C, Kubeš R, Šprindrich J, Sedláček R. Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocytes transplantation on a hyaluronic Acid ester scaffolds (Hyalografts C). *Acta chir. Orthop. Traumatol. Czech.* 2006; 73: 251-263.
30. Coates EE, Fisher JE. Phenotypic variations in chondrocytes subpopulations and their response to In Vitro culture and external stimuli. *An. Biomed. Eng.* 2010; 38: 3371-3388.
31. Ferda J, Novák M, Kreutzberg B. *Výpočetní tomografie.* Praha: Galén 2002.
32. Ferda J. *CT angiografie.* Praha: Galén 2004.
33. Horák M, Ryznarová Z, Kašpar M, Mašek M, Chomiak J, Frydrychová M. An abnormal vessel supply of an affected lower extremity in patients with proximal femoral focal deficiency. *European Radiology - ECR 2008 Book of Abstracts* 2008; 18(Suppl. 1): 247.
34. Maldjian C, Patel TY, Klein RM, Smith RC. Efficacy of MRI in classifying proximal focal femoral deficiency. *Skeletal Radiol.* 2007; 36: 215-220.
35. Westberry DE et al: Proximal focal femoral deficiency (PFFD): management options and controversies. *Hip Int.* 19 Suppl. 2009; 6: S18-25.
36. Hall JE, Bochmann D. The surgical and prosthetic management of proximal femoral focal deficiency. In Aitken GT, ed. *Proximal femoral focal deficiency. A congenital anomaly.* Washington D.C.: National Academy of Science 1969; 77-99.
37. Kostuik JP, Gilepsie R, Hall JE, Hubbard S. Van Nes Rotational osteotomy for treatment of proximal femoral focal deficiency and congenital short femur. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1975; 57: 1039-1046.
38. King RE. Surgical correction of proximal femoral focal deficiency. *Inter. Clin. Info Bull.* 1965; 4: 1.
39. Panting AL, Williams PF. Proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1978; 60(1): 46-52.
40. Epps CH. Proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1983; 65(6): 867-870.
41. Goldman AB, Schneider R, Wilson PD Jr. Proximal Focal Femoral Deficiency. *J. Can. Assoc. Radiol.* 1978; 29: 101-107.

42. Pirani S, Beuachamp RD, Li D, Sawatzky B. Soft Tissue Anatomy of Proximal Femoral Focal Deficiency. *J. Pediatr. Orthop.* 1991; 11: 563-570.
43. Chomiak J, Podškubka A, Dungl P, Ošťádal M, Frydrychová M. Cruciate Ligaments in Proximal Femoral Focal Deficiency: Arthroscopic Assessment. *J. Pediatr. Orthop.* 2012; 32(1): 21-28.
44. Warwick R, Williams PL, et al., Gray's anatomy. 35th ed. Edinburg: Longman 1973; 162-163, 673-678
45. Standring S, et al. Gray's anatomy. The anatomical basis of clinical practice. 39th ed. Elsevier Churchill Livingstone 2005; 1450, 1470.
46. Čihák R, et al., Anatomie Vol. III. Praha: Avicenum: Grada Publishing 1997; 115.
47. Senior HD. The development of the arteries of the human lower extremity. *Am. J. Anat.* 1919; 25: 55-95.
48. Krajina A. Angiografie. Hradec Králové: Nucleus 1999.
49. 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.
50. Laor T, Burrows PE. Congenital anomalies and vascular birthmarks of the lower extremities. *Mag. Res. Imaging Clin. N. Am.* 1998; 6: 497-519.
51. Kozubíková P, Horák M. Porovnání klasického rekonstrukčního algoritmu zpětné projekce (FBP) a algoritmu iterativní rekonstrukce (IRIS). *Ces. Radiol.* 2011; 65(3): 577-583.
52. Kim HK, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J. Bone Miner. Res.* 2004; 19: 2041-2048.
53. Povýšil C, Kaňa R, Tvrđík D, Horák M, Vaculík J, Podškubka A, Kubeš R. Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic and transplanted articular cartilage. *Pathol. Res. Pract.* 2008; 204: 885-890.
54. Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Gidolin D, Gordini DD, Cortivo R. Chondrocyte aggregation and reorganization into three- dimensional scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46: 337-346.
55. Giroto D, Urbani S, Brun P, Renier D, Barbucci R, Abatangelo G. Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials* 2003; 24: 3265-3275
56. Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF 11): molecular immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002; 23: 1187-1195.
57. Takahashi T, Tins B, McCall IW, Richardson JB, Takagi K, Ashton K. MR appearance of autologous chondrocyte implantation in the knee: correlation with the knee features and clinical outcome. *Skeletal Radiol.* 2006; 35: 16-26.

10. Seznam publikací doktoranda

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

a. publikace s IF

1. Chomiak J, **Horák M**, Masek M, Frydrychova F, Dungal P. Computed tomographic angiography in proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2009; 91(8): 1954-1964. **IF: 3,23.**
2. Povýšil C, Kaňa R, Dundr P, Tvrđík D, **Horák M**, Vaculík J, Podškubka A, Kubeš R. Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic, and transplanted articular cartilage. *Pathol. Res. Pract.* 2008; 204(12): 883-890. **IF: 1,219.**
3. **Horák M**, Handl M, Podškubka A, Kaňa R, Adler J, Povýšil C. Comparison of the Cellular Composition of Two Different Chondrocyte -Seeded Biomaterials and the Results of their Transplantation in Humans. *Folia Biol.* 2014; 1: 1-9. **IF: 1,08.**

b. publikace bez IF

1. **Horák M**, Chomiak J, Kašpar M, Ryznarová Z, Mašek M, Frydrychová M, Dungal P. Anomálie cévního zásobení dolní končetiny u pacientů s vrozeně krátkým femurem (PFFD) a význam CTAG při jejich diagnostice. *Ces. Radiol.* 2007; 61(4): 417-421.
2. Chomiak J, **Horák M**, Mašek M, Dungal P, Ošťádal M, Frydrychová M, Podškubka A. Proximální femorální fokální deficiencie: přínos CT, CT angiografie a arthroscopie kolenního kloubu. *Ortopedie* 2010; 4(3): 150-155.
3. Kozubíková P, **Horák M**. Porovnání klasického rekonstrukčního algoritmu zpětné projekce (FBP) a algoritmu iterativní rekonstrukce (IRIS). *Ces Radiol.* 2011; 65(3): 577-583.
4. Povýšil C, Dundr P, Tvrđík D, Podškubka A, Kaňa R, **Horák M**. Dezmin-pozitivní a alfa-aktin pozitivní chondrocyty v defektech lidské kloubní chrupavky. *Ces-Slov. Patol.* 2005; 41(4): 133-136.

c. abstrakta s IF

1. Chomiak J, **Horák M**, Mašek M, Frydrychová M, Dungal P, Adamec O, Ošťádal M. The role of CT-angiography in diagnosis and treatment strategy of proximal femoral focal deficiency (PFFD) Pappas II and III. *J. Child. Orthop.* 2007; 74(Sup 1). **IF: 1,04.**
2. **Horák M**, Ryznarová Z, Kašpar M, Mašek M, Chomiak J, Frydrychová M. An abnormal vessel supply of an affected lower extremity in patients with proximal femoral focal deficiency. *Eur. Radiol. ECR 2008 Book of Abstracts 2008: 18(Sup 1): 247. IF: 3,651.*

Přednášky související s disertací

1. **Horák M**. CT AG - PFFD - cévní anomálie. Bulovecké dny 2008. Čejkovice 21.- 22. 2. 2008.
2. **Horák M**, Ryznarová Z, Kašpar M, Mašek M, Chomiak J, Frydrychová M. An abnormal vessel supply of an affected lower extremity in patients with proximal femoral focal deficiency. European Congress of Radiology 2008. Wien, Rakousko 7. - 11. 3. 2008.
3. **Horák M**. An abnormal vessel supply of an affected lower extremity in patients with proximal femoral focal deficiency (PFFD). Covidien 2010. Athény, Řecko 12 - 16. 9. 2010.

Přehled dalších publikovaných článků

a. publikace s IF

1. Povýšil C, Kohout A, Urban K, **Horák M**. Differentiated adamantinoma of the fibula: a rhabdoid variant. *Skelet. Radiol.* 2004; 33(8): 488-492. **IF: 1,74.**

2. Poole K, Treece G, Mayhew P, Vaculík J, Dungl P, **Horák M**, Štěpán J, Gee A. Cortical Thickness Mapping to Identify Focal Osteoporosis in Patients with Hip Fracture. PLoS ONE 2012; 7(6): 1-7. **IF: 3,73**.
3. Brzobohatá H, Prokop J, **Horák M**, Jančárek A, Velemínská J. Accuracy and Benefits of 3D Bone Surface Modelling: A Comparison of Two Methods of Surface Data Acquisition Reconstructed by Laser Scanning and Computed Tomography Outputs. Collegium Antropolog. 2012; 36(3): 801-806. **IF: 0,61**.
4. Bejdova S, Krajicek V, Veleminska J, **Horak M**, Veleminsky P. Changes in the sexual dimorphism of the human mandible during the last 1200 years in Central Europe. HOMO – J. Comp. Hum. Biol. 2013; 64(1): 1-17. **IF: 0,96**.

b. publikace bez IF

1. Povýšil C, Matějovský Z, **Horák M**. Klasický adamantinom, diferencovaný adamantinom a osteokartilaginozní dysplazie dlouhých kostí. Cas Lek. Ces. 2004; 143(5): 329-335.
2. **Horák M**, Kašpar M, Bohutová J, Páv L. Stenóza arteria carotis interna velkým rohem jazyčky diagnostikovaná přehledně na CTAG karotid – Kazuistika. Ces. Radiol. 2006; 60(2): 104-107.
3. Škvařilová B, Povýšil C, **Horák M**, Kyzlinková K. Trephinations - Old Surgical Intervention. Acta Chirurg. Plast. 2007; 49(4): 103-108.
4. Vaculík J, **Horák M**, Malkus T, Majerníček M, Dungl P, Podškubka A. Stabilita osteosyntézy nestabilních petrochanterických zlomenin DHS a PFN v randomizované studii v závislosti na denzitě hlavice femuru. Ortopedie 2008; 2(3): 64-69.
5. Povýšil C, Kaňa R, **Horák M**. Expres S-100 proteinu v osteogenních nádorech a tumoriformních osteoplastických lézích. Ces-Slov. Patol. 2008; 45(3): 59-61.
6. **Horák M**, Ryznarová Z, Kašpar M, Matějovský Z, Mašek M, Adamová M, Dungl P. Hodnocení účinku chemoterapie u pacientů s osteosarkomem pomocí CT perfuze. Ces. Radiol. 2008; 62(3): 302-308.
7. **Horák M**, Ryznarová Z, Kašpar M, Vašina T, Koutníková H. Ileus tenkého střeva způsobený polknutou pečkou. Ces. Radiol. 2008; 62(4): 366-369.
8. Mašek M, Holečková P, Drechslerová J, **Horák M**, Kašpar M. Zobrazovací metody v diagnostice a léčbě renálního karcinomu včetně intervenčních metod. Onkologie 2009; 1(3): 125-128.
9. **Horák M**, Bárta J, Andrášková H, Kostrhunová K, Pleschingerová L, Ryznarová Z, Kašpar M. Breast biopsy guided by magnetic resonance - first experiences. Ces. Radiol. 2009; 63(1): 56-60.
10. Ryznarová Z, **Horák M**, Dvořák J, Mašek M, Adamová M, Kašpar M. Význam magnetické rezonance v diagnostice karcinomu prostaty a první zkušenosti s využitím MR spektroskopie. Ces. Radiol. 2009; 63(1): 80-88.
11. **Horák M**, Ryznarová Z, Komárek V, Weichet J. Pneumatosis Cystoides Coli. Ces. Radiol. 2009; 63(4): 310-314.
12. Povýšil C, Dungl P, Skácelová H, Vaculík J, **Horák M**, Povýšilová V. Histopatologické změny skeletu u pacientů se zlomeninami krčku kosti stehenní. Ortopedie 2009; 3(6): 270-273.
13. **Horák M**, Krystlík Z, Vaculík J, Mašek M, Kašpar M, Koutníková H, Dungl P. Účinnost podané chemoterapie u pacientů s osteosarkomem lze posoudit použitím CT perfuze. Ortopedie 2010; 4(4): 189-194.
14. Bejdová Š, Velemínská J, Bejda P, **Horák M**, Velemínský P. Tvar dolní čelisti u velkomoravské populace za využití metod 3-D geometrické morfometrie. Slov. Antropol. 2010; 13(1): 1-5.

15. **Horák M**, Beňo P, Prokopová P. Ileus tenkého střeva způsobený fytobezoárem zapříčeným v Meckelově divertiklu. *Ces. Radiol.* 2012; 66(1): 233-243.

c. abstrakta s IF

1. **Horák M**, Ryznarová Z, Kašpar M. CT perfusion can effectively monitor the effect of chemotherapy in patients with osteosarcom. *Skelet. Radiol.* 2009; 38(Sup 1): 622. **IF: 1,57.**