

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicíně

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**

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.

Praha, 2014

Prohlášení

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

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

V Praze, 20. 05. 2014

Martin Horák

Podpis

Identifikační záznam

HORÁK, Martin. *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]*. Praha, 2014. 101 stran práce, 70 stran příloh. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky. Školitel doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc.

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.

Poděkování

Doc. RNDr. Pavle Poučkové, CSc. – Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK jako školiteli

Prof. MUDr. Ctiborovi Povýšilovi, DrSc. – Ústav patologie 1. LF UK jako konzultantovi

Doc. MUDr. Jiřímu Chomiakovi, CSc. – Ortopedická klinika 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce

Prof. MUDr. Pavlu Dunglovi, DrSc. – Ortopedická klinika 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce

Doc. MUDr. Aleši Poškubkovi, CSc. – Ortopedická klinika 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce

Doc. MUDr. Milanu Handlovi, Ph.D. – Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol

Doc. MUDr. Jiřímu Adlerovi, CSc. – Národní tkáňové Centrum, FN Brno

Prof. MUDr. Josefu Vymazalovi, DSc. – Radiodiagnostické oddělení Nemocnice Na Homolce

Prof. MUDr. RNDr. Jiřímu Benešovi, CSc. – Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK

Ing. Petře Kozubíkové – Oddělení lékařské fyziky Nemocnice Na Homolce

Seznam publikací doktoranda

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

a. publikace s IF

1. Chomiak J, **Horák 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. **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, Dungl 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, 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.
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, Dungl 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(Suppl. 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(Suppl. 1): 247. **IF: 3,651.**

Přednášky související s disertací

Horák M. CT AG - PFFD - cévní anomálie. Bulovecké dny 2008. Čejkovice 21.- 22. 2. 2008.

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.

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 Antropologicum 2012; 36(3): 801-806. **IF: 0,61.**
4. Bejdova S, Krajicek V, Velemínska J, **Horak M**, Velemínský 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 jazyky diagnostikovaná přehledně na CTAG karotid – Kazuistika. *Ces. Radiol.* 2006; 60(2): 104-107.
3. Škvařilová B, Povýšil C, **Horák M**, Kyzlinková K. Trephinations - Old Sugrical Intervention. *Acta Chirurg. Plast.* 2007; 49(4): 103-108.
4. Vaculík J, **Horák M**, Malkus T, Majerníček M, Dungal P, Podškubka A. Stabilita osteosyntézy nestabilních pertrochanterických 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, Dungal 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, Andrýsková 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, Dungal 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, Dungal 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 fyto bezoárem zapříčným 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(Suppl. 1): 622.
IF: 1,57.

Seznam použitých zkratk, 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
Alfa-SMA	Alfa aktin hladké svaloviny – Alfa smooth muscle actin
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

Obsah

Abstrakt (ČJ)	5
Abstract (AJ)	7
1. Úvod	10
1.1 Úvod do problematiky vrozeného defektu proximálního konce femuru (PFFD)	11
1.1.1. Definice PFFD	11
1.1.2. Embryologický vývoj osifikace femuru.....	12
1.1.3. Etiologie a incidence PFFD	12
1.1.4. Klasifikace PFFD	14
1.1.4.1. Klasifikace PFFD sec. Aitken	14
1.1.4.2. Klasifikace PFFD sec. Pappas.....	15
1.1.4.3. Klasifikace PFFD sec. Paley	18
1.1.5. Zobrazovací metody.....	18
1.1.5.1. RTG vyšetření	19
1.1.5.2. UZ vyšetření	19
1.1.5.3. MR vyšetření	20
1.1.5.4. CT vyšetření	21
1.1.5.5. Artrografické vyšetření	22
1.1.6. Histologické vyšetření.....	22
1.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru v dospělém věku.....	23
2. Vymezení cílů práce	25
2.1. PFFD.....	25
2.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru	25
3. Materiál a metody.....	27
3.1. PFFD.....	27
3.1.1. Soubor pacientů PFFD	27
3.1.2. Použité vyšetřovací metody	27

3.1.2.1. RTG.....	27
3.1.2.2. CT.....	28
3.1.3. Sledování radiační zátěže u pacientů s PFFD	29
3.1.4. Bioptické vyšetření vzorků kyčelních kloubů.....	29
3.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru	31
3.2.1. Soubor pacientů	31
3.2.2. Kontrolní materiály	31
3.2.2.1. Hlavice femuru s normální kloubní chrupavkou.....	31
3.2.2.2. Hlavice femuru s osteoartrózou.....	32
3.2.3. Diagnostický a léčebný postup	32
3.2.4. Radiologické vyšetření oblastí postižené chrupavky	32
3.2.5. Histopatologické vyšetření vzorků chrupavky z artroskopického vyšetření	34
3.2.6. Kontrolní skupina.....	34
3.2.7. Imunohistochemické vyšetření	35
4. Výsledky.....	36
4.1. PFFD.....	36
4.1.1. Změny skeletu u PFFD	38
4.1.1.1. Reklasifikace typu PFFD podle CT nálezu	39
4.1.1.2. Mobilita epifýzy hlavice kyčle v acetabulu u typu III sec. Pappas	39
4.1.2. Cévní změny u PFFD.....	42
4.1.2.1. Změna v průměru AFC na postižené a nepostižené straně	45
4.1.2.2. Změna uložení bifurkace AFC (sledovaný odstup AFP) na postižené straně. 46	
4.1.2.3. Paradoxní uložení bifurkace AFC	47
4.1.2.4. Vysoké uložení bifurkace AIC na postižené straně.....	47
4.1.2.5. Anomální cévní zásobení postižené dolní končetiny	48
4.1.2.5.1. Pacient č. 2 mužského pohlaví typ III sec. Pappas vlevo.....	48
4.1.2.5.2. Pacient č. 3 mužského pohlaví typ III sec. Pappas vpravo	51

4.1.3. Radiační zátěž u vyšetřovaných pacientů s PFFD	53
4.1.4. Histologické změny u pacientů s PFFD.....	54
4.2. Posttraumatický defekt chrupavky	56
4.2.1. Nálezy v kontrolní skupině	56
4.2.1.1. Kloubní chrupavka nezměněná osteoartrózou	56
4.2.1.2. Kloubní chrupavka od pacientů s osteoartrózou	56
4.2.2. Nálezy u pacientů s transplantací autologních chondrocytů.....	56
4.2.2.1. Histologické nálezy v reziduální kloubní chrupavce z místa kloubních defektů	56
4.2.2.2. Histologická struktura skafoldů použitých při transplantaci.....	57
4.2.2.3. Chrupavka nově vytvořená po transplantaci autologních chondrocytů.	58
4.2.2.4. RT-PCR analýza.....	60
4.2.3. Přehled současných zobrazovacích metod při diagnostice defektů kloubní chrupavky.....	60
4.2.4. Nálezy defektů chrupavky zachycené na MR obrazech	61
5. Diskuse	63
5.1. PFFD.....	63
5.1.1. Klinický nález a průběh	63
5.1.2. Diferenciální diagnostika	63
5.1.3. Terapie	64
5.1.4. Cévní zásobení a jeho anomálie.....	68
5.1.5. Radiační zátěž a možné alternativní postupy.....	71
5.1.6. Dávky u PFFD	73
5.1.7. Histopatologické nálezy a možné patofyziologické mechanismy	74
5.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru	76
5.2.1. Histologické nálezy a možné patofyziologické mechanismy	76
5.2.2. Výsledky transplantace autologních chondrocytů s porovnáním dvou různých biomateriálů	77

5.2.3. Role S-100 proteinu v identifikaci chondrocytů.....	78
5.2.4. Aktiny jako základ buněčného skeletu a možný význam exprese alfa smooth muscle aktinu u chondrocytů	80
5.2.5. Biodegradibilita použitých nosičů	84
5.2.6. Použití MR při sledování transplantátu.....	85
6. Závěry.....	87
6.1. PFFD.....	87
6.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky	88
7. Seznam literatury.....	89
8. Přehled obrazové dokumentace v textu.....	100
9. Přehled tabulek v textu	101
10. Obrazová příloha	102
11. Příložené publikované práce	139

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 léčení 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 hlavic femuru odstraněných při TEP. Chrupavka hlavic femurů 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 vyžralých 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 pakloub 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. Jedná se o dnes již běžně užívané vyšetření výpočetní tomografií (CT) a magnetickou rezonancí (MR). Přes značný pokrok se současná radiodiagnostika chorob pohybového aparátu neobejde bez úzké spolupráce s řadou jiných medicínských oborů jako je ortopedie, onkologie, chirurgie, patologie a jiné. Přesná znalost krevního zásobení a dalších topografických poměrů v oblasti patologické kostní léze usnadňuje volbu nejvhodnějšího a co nejvíce fyziologického operačního postupu bez zbytečného poškození zdravých sousedních struktur a při zachování původního cévního zásobení. 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. transplantační technikou, jako je tomu v případě transplantací chondrocytů do posttraumatických defektů kloubních chrupavek.

Předložená disertační práce prezentuje naše zkušenosti s 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 (Horák M. et al., 2007). Druhá část naší prezentace se věnuje některým otázkám autologní transplantace 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. LF UK 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 (Horák M. et al., 2014).

Pro větší názornost jsme do textové části přímo zařadili pouze několik ilustračních fotografií. Obrazová dokumentace in extenso je v samostatné obrazové příloze.

1.1 Úvod do problematiky vrozeného defektu proximálního konce femuru (PFFD)

Nemocnice Na Bulovce je jednou z několika nemocnic v České republice, kde se soustřeďuje péče o pacienty s vrozeným postižením skeletu. Kromě pracovníků ortopedické kliniky nedílnou součástí péče o tyto pacienty je multioborová spolupráce, zahrnující i specialisty z dalších oborů jako je radiodiagnostika, histopatologie, anesteziologie a resuscitace, rehabilitace a ortoprotetika.

Jednou z vrozených změn skeletu, která je v Nemocnici Na Bulovce úspěšně léčena, je vrozeně krátký femur.

1.1.1. Definice 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 femuru spojenými někdy i s hypoplasíí acetabula, až po femur téměř normálně vyvinutý, pouze s lehkým zkrácením jeho délky. Při časté současné agenezi zkřížených vazů na postižené končetině bývá narušena i stabilita kolenního kloubu. Pravidelnou součástí všech vývojových stupňů této deformity je také zkrácení až chybění fibuly. Méně častými doprovodnými anomáliemi jsou hypoplasie a lateralizace pately, valgózní koleno, na noze chybění jednoho či více laterálních paprsků, talokalkaneární koalice či kulový hlezenní kloub (Dunl P. et al., 2005). Maximum patologických změn je téměř výlučně lokalizováno proximálně, proto se používá také názvu proximální femorální defekt - anglicky PFFD - *proximal femoral focal deficiency* (Gillespie R., Torode I.P., 1983).

1.1.2. Embryologický vývoj osifikace femuru

Femur osifikuje z pěti chrupavčitých jader: z diafýzy, dvou epifýz a dvou apofýz, které se nacházejí po jednom v každém trochanteru. V oblasti diafýzy femuru začíná osifikace v 7. týdnu embryonálního vývoje. Distální epifýza osifikuje v 9. měsíci prenatálního vývoje a je jednou ze známek donošenosti plodu. Proximální epifýza uložená v hlavici femuru osifikuje v 6. měsíci postnatálně. Apofýzy osifikují postupně, ve velkém trochanteru kolem 3. - 4. roku věku a v malém trochanteru kolem 8. - 11. roku věku. Pro růst je důležitější distální epifýza, která je růstově aktivnější. Epifýzové a apofýzové štěrby se uzavírají dříve na proximální straně femuru, u malého trochanteru po 14. roce, u velkého trochanteru po 16. roce, u hlavice femuru po 17. roce věku a na distální straně po 18. roce věku. Jak tvorba osifikačních jader tak splývání osifikačních plotének probíhá zpravidla dříve u dívek (Čihák R. et al., 1987).

1.1.3. Etiologie a incidence PFFD

Výskyt vady je udáván s četností 1-2 na 100 000 novorozenců (Oppenheim W.L. et al., 1998, Anton C.G. et al., 1999, Manaster B.J. et al., 2010). Přidáme-li k tomu všechny případy po narození nenápadné, lze předpokládat, že je incidence ještě vyšší. V České republice se ročně vyskytnou minimálně dva nové případy (Chomiak J. et al., 2009). Nejčastěji se jedná o typ II, III a IV v klasifikaci sec. Pappas. Další jsou méně časté – typ I, II, V, VI sec. Pappas. U mírných forem VII, VIII a IX sec. Pappas, které se většinou zachytí až v pozdější době než je věk novorozenecký a kojenecký, se předpokládá i určitá poddiagnostikovanost (Anton C.G. et al., 1999).

V 15 % případů se změny nacházejí oboustranně. V případech lehčích oboustranných forem se může dospět ke správné diagnóze ještě později než u jednostranných změn (Bryant D.D., Epps C.H., 1991).

Muži jsou postiženi častěji než ženy, poměr postižení se ve světové literatuře udává 2:1 ve prospěch mužů (Manaster B.J. et al., 2010).

Etiologie dosud není jednoznačná, afekce vzniká působením blíže neurčené škodliviny mezi 4. - 9. týdnem těhotenství. Nelze vyloučit virovou infekci, radiaci, chemické, lékové či mechanické vlivy, působící v době gestace (Panting A.L., Williams P.F., 1978). Může jít i o kombinaci výše uvedených faktorů, zdá se však, že agresivita noxy a doba jejího působení je určující pro rozsah poškození, nikoliv pro lokalizaci. Vysoká je rovněž incidence přidružených anomálií. Sklerotomová teorie uvažuje o postižení buněk, které formují prekurzory k periferním sensorickým nervům L4 a L5 (Epps C.H., 1983). Možný je však také

defekt při proliferaci a maturaci chondrocytů v oblasti růstové ploténky proximálního femuru (Boden S.D. et al., 1989).

Mezi asociované abnormality patří defekt fibuly (zkrat či hypoplazie, případně její chybění) v 70-80% případů (Aitken G.T., 1969, Chomiak J. et al., 2009). Udává se, že pokud chybí na hleznu zevní kotník, je nutné myslet v diferenciální diagnóze právě na PFFD (Gillespie R., Torode I.P., 1983, Dungal P. et al., 2005). Dále se mezi časté doprovodné postižení pacientů s PFFD řadí abnormální vývoj zkřížených vazů kolena, které mohou i úplně chybět (Johansson E., Aparisi T., 1983) a koleno tak bývá nestabilní (Chomiak J. et al., 2012). Mezi abnormality nohy patří asi v 50 % případů valgózní postavení nohy (Grogan D.P. et al., 1994). V menším počtu případů byla u PFFD zaznamenána i zkrácená délka kostí bérce, zejména tibie (Bryant D.D., Epps C.H., 1991, Levinson E.D. et al., 1977).

Postižení jiných orgánů je velmi vzácné a souvislost s PFFD není zcela prokázána. Byly však popsány jednotlivé případy spojené se syndaktylií, spinálními deformitami, syndromem kaudální regrese, vrozenou atrofií mozku, vrozenými vývojovými vadami srdce, rozštěpem patra, Hirschprungovou chorobou, anomáliemi v urogenitální oblasti (Koman L.A. et al., 1982, Anton C.G. et al., 1999, Levinson E.D. et al., 1977, Epps C.H., 1983, Marotz R.J. et al., 1983, Sirota L. et al., 1987, Ergin H. et al., 2006). Zda se v těchto případech jedná o souběžné náhodné postižení či daná působící noxa postihne během gestace vývoj proximálního femuru i zcela jiný orgán, nelze z jednotlivých případů odvozovat. Žádné genetické příčiny nebyly zatím jasně prokázány, ačkoliv již byly zaznamenány případy postižení více osob v širším příbuzenském vztahu (Oppenheim W.L. et al., 1998, Koman L.A. et al., 1982). PFFD bylo popsáno u femoro-fibulo-ulnárního komplexu, kde by se mohlo jednat o genetickou poruchu vázanou na X chromosom (Kelly T.E., 1974, Lenz W. et al., 1993). Gupta sledoval rodinu tří bratrů a strýce z matčiny strany s diagnózou PFFD, kde také vyslovil hypotézu na X chromosom vázanou formu (Gupta D.K.S., Gupta S.K., 1994). Naproti tomu Bohring u případu chlapce a jeho dědy s PFFD uvažoval o autozomálně dominantní dědičnosti s variabilní penetrancí (Bohring A., Oppermann H.C., 1997). Určitá forma geneticky podmíněného vzniku PFFD se nabízí i u dvou párů jednovaječných dvojčat mužského pohlaví (Hamanishi C., 1980, Connor J.M. et al., 1986). Daentl zachytil kyčelní hypoplasií charakteru PFFD s neobvyklým obličejovým syndromem (Daentl D.L. et al., 1975) a později Johnson referoval o současném výskytu PFFD a obličejového syndromu u dětí diabetických matek (Johnson J.P. et al., 1983).

1.1.4. 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 (Aitken G.T., 1969). Během růstu je však někdy nutné provést reklasifikaci, zejména v prvních třech letech života, což je způsobeno zejména zpomalením osifikace chrupavky vrozeného pakloubu femuru. Časový posun je nejvíce patrný u epifýzy hlavičky femuru. Normálně dochází k začátku osifikace jádra epifýzy okolo 6. měsíce po narození, ale u PFFD se oddaluje osifikace na dobu okolo druhého případně třetího roku. Pokud osifikace neproběhne do této doby, většinou se později již nepozoruje (Bryant D.D., Epps C.H., 1991, Čihák R. et al., 1987).

Hamanishi z r. 1980 rozlišuje pět typů a pět subtypů podle zkracování femuru až k jeho úplné absenci (Hamanishi C., 1980, Tonnis D., Stanitski D.F., 1997).

Gillespie a Torode se kromě radiologického zobrazení současně zaměřili také na klinické projevy spojené s defektem (Gillespie R., Torode I.P., 1983). Pappas podle radiologického zhodnocení zařazuje velmi detailně pacienty do více forem, včetně forem s pouze distálním postižením femuru (Pappas A.M., 1983, Amstutz H.C. et al., 1969).

Další rozdělení lze provést podle klasifikace Paley (Paley D., 1998). Tento autor jako chirurg-ortoped rozděluje nálezy na základě klinického vyšetření podle směru, jakým se bude chirurgické řešení ubírat.

Pouze klinické rozdělení preferuje Fixsen, který rozděluje defekty na stabilní a nestabilní kategorii (Fixsen J.A. et al., 1974).

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 nález, tedy přesněji RTG obraz.

1.1.4.1. Klasifikace PFFD sec. Aitken

První klasifikace PFFD podle RTG nálezu (Aitken G.T., 1969, Schatz S.L., Kopits S.E., 1978). Ve světě se jedná o stále nejčastěji používanou klasifikaci (obraz 1) a to přesto, že v průběhu vývoje dítěte s PFFD se musí část pacientů překlasifikovat.

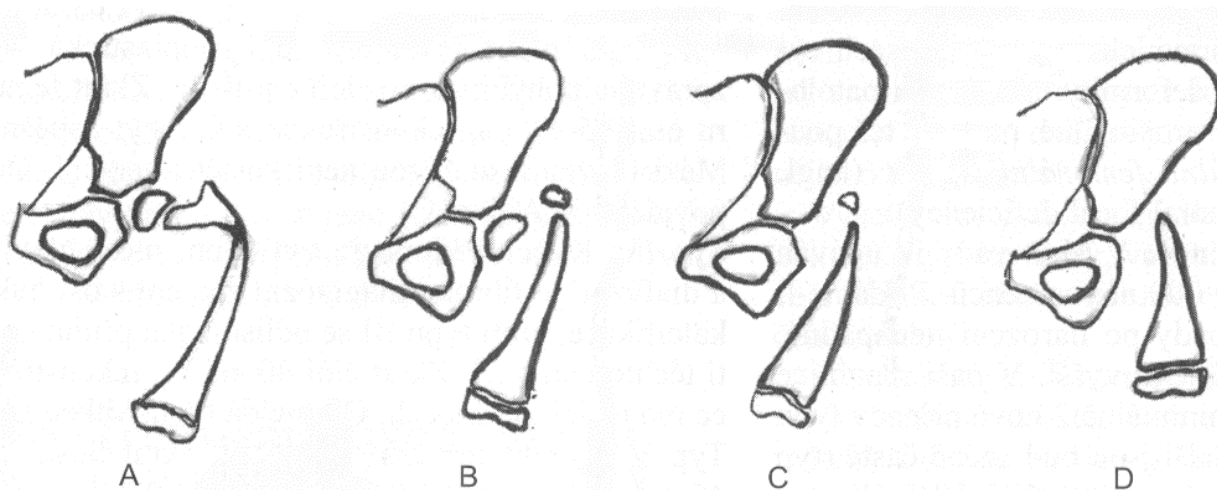
Typ A (38%): Acetabulum a hlavička femuru jsou přítomny. Postižen je až krček a proximální diafýza femuru. Velmi často na RTG bývá u malých dětí krček a hlavička bez kontaktu. Teprve v pozdějším období kostního zrání dochází ke kostnímu spojení hlavičky

s další částí femuru. Pokud není provedena léčba, hojí se v pozdějším věku kyčel v těžké varózní deformitě subtrochantericky.

Typ B (32%): Acetabulum a hlavice femuru jsou přítomny, ale epifýza hlavice má opožděnou osifikaci. Současně je přítomen defekt proximálního femuru. Většinou nebývá přítomna ani chrupavčitá konexe mezi hlavicí a krčkem femuru. Elementy mají tendenci se pohybovat samostatně a ani v pozdějším věku nedochází ke kostnímu spojení.

Typ C (17%): Acetabulum je výrazně dysplastické, femorální hlavice není dle RTG vyvinutá. Současně je přítomen defekt proximálního femuru někdy s osifikáty na proximálním konci femuru.

Typ D (13%): Acetabulum ani femorální hlavice není přítomna. Femur bývá výrazně zkrácený.



Obraz 1 – Klasifikace PFFD sec. Aitken. (Převzato z Dungal et al., 2005).

1.1.4.2. Klasifikace PFFD sec. Pappas

Tato klasifikace je v České republice nejvíce preferovaná (Pappas A. M., 1983). Více typů umožňuje lépe určit stav defektu a pro daný typ postižení umožňuje lépe vybrat odpovídající způsob terapie (obraz 2). Avšak i u této klasifikace, která využívá členění podle RTG nálezů, se musí část pacientů v průběhu vývoje překlasifikovat, většinou na nižší stupeň postižení. Každá klasifikace podle RTG nálezů je totiž zatížena určitou mírou nepřesnosti, která vyplývá zejména ze zpomalené osifikace epifýzy hlavice i dalších částí skeletu femuru. Klasifikace sec. Pappas není výjimkou a musí se i s tím do jisté míry počítat (Court C., Carlouz H., 1997).

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

Typ II.: Proximální polovina femuru chybí, acetabulum není vyvinuto, koleno mívá omezený pohyb. Hlavice femuru není vyvinuta, neosifikuje ani ve vyšším věku. Ischiopubické kostní struktury mají zpomalenou osifikaci. Femur je zkrácen o 70-90 %. V léčení je možno použít metodu koleno pro kyčel, kdy po osteotomii pánve se dosáhne fúze se zbytkem femuru a koleno slouží jako kyčel. Zkrat končetiny v dospělosti dosahuje 40 i více centimetrů. Trvalé nošení ortoprotézy je nutné. Odpovídá typu Aitken D.

Typ III: Kyčelní kloub je vytvořen, i když často nedokonale, hlavice femuru je hypoplastická, ale zpravidla bývá pohyblivá, osifikuje později. Mezi hlavicí a diafýzou chybí kostěné spojení. Acetabulum je většinou hypoplastické, výjimečně téměř chybí, charakter acetabula odpovídá velikosti a charakteru hlavice kyčle včetně její pohyblivosti. Zkrat femuru činí 45-80 %, rekonstrukce může být úspěšná. Odpovídá typu Aitken C.

Typ IV: Kyčelní kloub je vytvořen, mezi hlavicí a diafýzou je fibrokartilaginózní spojení s ostrůvky kalcifikací, proti typu III se odlišuje jen přítomností těchto kalcifikací ve fibrokartilaginózní matrix. Zkrat činí 40-65 %, rekonstrukce má naději na úspěch. Odpovídá typu Aitken B.

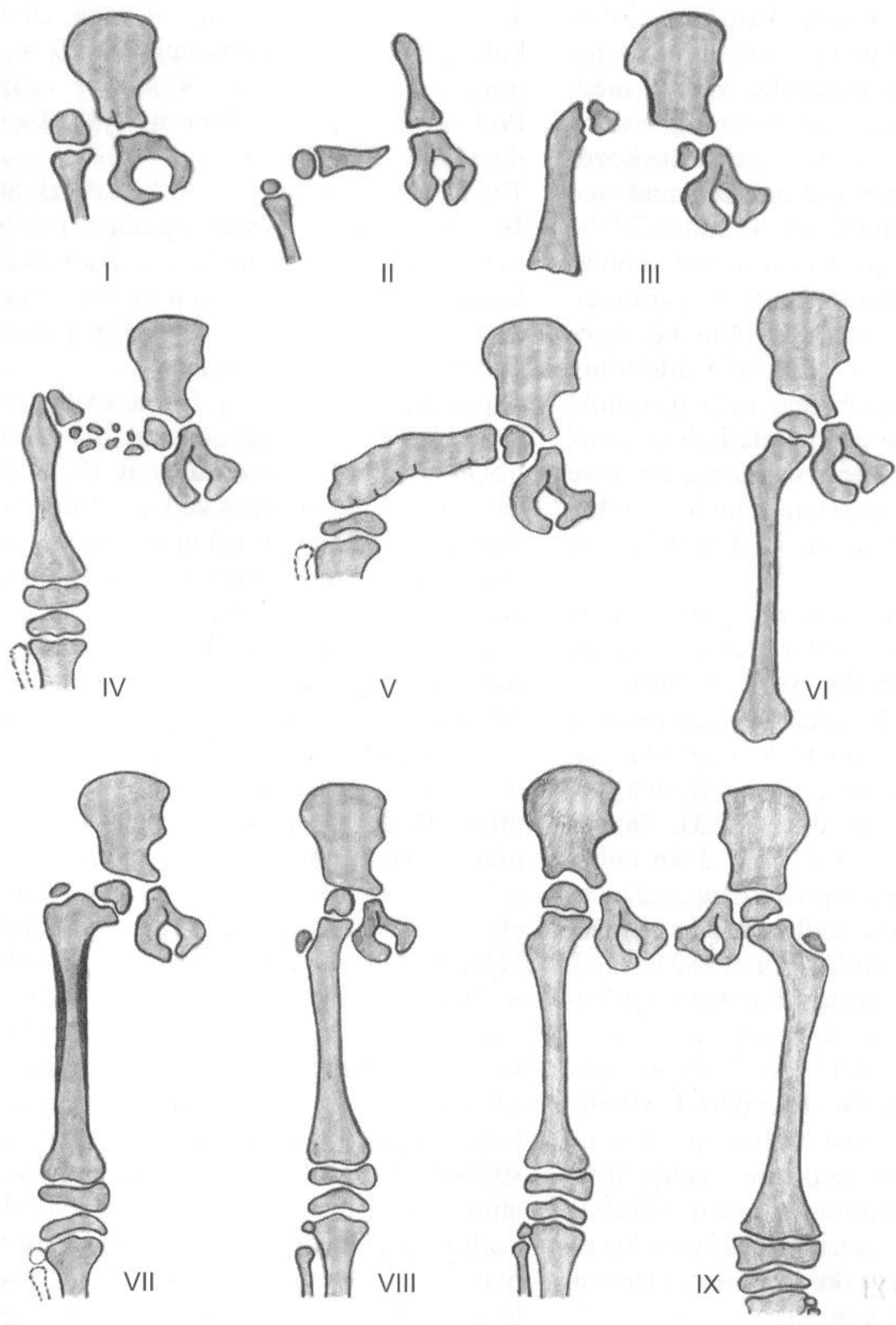
Typ V: Defekt femuru postihuje více diafýzu, kde je inkompletní osifikace, současně bývá abnormální krček. Někdy je přidružena aplazie tibie či fibuly. Zkrat dosahuje 45-85 %. Vyskytuje se velmi vzácně. Odpovídá zhruba typu Aitken A.

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 %. Někdy je přidružena aplazie tibie či fibuly. Výskyt je velmi vzácný. Prolongace je možná, funkční výsledky ale nejsou dobré. Odpovídá zhruba typu Aitken A.

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, kratší než nepostižená strana. Zkrat dosahuje 10-50 %. Typ poměrně častý, vhodný k prolongační terapii. Odpovídá zhruba typu Aitken A.

Typ VIII: Hypoplastický femur s valgozitou krčku, anteverze není zvýšená, naopak hlavice bývá v retroverzi. Distální femur mívá abnormality kondylů. Zkrat může dosáhnout 10-40 %. Prolongační terapie je možná s velkou nadějí na úspěch.

Typ IX: Femur je normálního tvaru, hypoplastický proti druhé straně. Typická je nestabilita kolena, zkrat činí 5-20 %. Prolongace je indikována s velkou nadějí na dobrý výsledek.



Obraz 2 – Klasifikace PFFD sec. Pappas. (Převzato z Dungal P. et al., 2005).

1.1.4.3. Klasifikace PFFD sec. Paley

Tato klinická klasifikace pacientů s PFFD (Paley D., 1998) se zaměřuje na posouzení faktorů, které ovlivní volbu přístupu k terapii, zejména využití prolongace a rekonstrukce krátkého femuru, tedy hledá směr určující chirurgickou léčbu:

Typ 1 – Intaktní femur s mobilní kyčlí i kolenem

- a) normální osifikace proximálního femuru
- b) opožděná osifikace proximálního femuru

Typ 2 – Mobilní pseudoartróza kyčle s mobilním kolenem, kdy kyčel není zcela vytvořena

- a) mobilní hlavice femuru v acetabulu
- b) chybějící nebo nepohyblivá hlavice femuru

Typ 3 – Diafyzální defekt femuru, kdy femur nedosahuje do acetabula

- a) pohyb v kolenu větší než 45 stupňů
- b) pohyb v kolenu menší než 45 stupňů

1.1.5. 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.

Optimální zobrazovací metodou v prenatální diagnostice je fetální ultrazvuk (UZ).

RTG snímkování se provádí v čase jednotlivých kontrol a používá se k určení klasifikace postižení, k posouzení jeho vývoje případně k jeho reklasifikaci a následně ke sledování hojení po jednotlivých korekčních operacích.

Magnetická rezonance (MR) umožňuje plnohodnotné vyšetření měkkých tkání, zejména chrupavčité složky přítomné v oblasti defektu.

CT vyšetření se hodí k přesnějšímu vyšetření skeletu i cév s možností rekonstrukcí ve 3D zobrazeních. Obě metody, jak CT tak MR, někdy vedou k reklasifikaci typu postižení, což může mít v některých případech zásadní vliv na následnou terapii, zejména na volbu správného chirurgického postupu.

Jednotlivé zobrazovací metody v dalším textu charakterizujeme podrobněji ve vztahu k výhodám či nevýhodám příslušného vyšetření.

1.1.5.1. RTG vyšetření

Na rentgenovém snímku v antero-posteriorní (AP) projekci jsou patrné acetabulární změny v různém rozsahu, od normy přes strmé acetabulum, dysplastické acetabulum až po jeho úplné chybění.

Obdobně hlavice femuru (femorální kapitální epifýza) bývá zmenšená, dysplastická. Velmi často lze nalézt opožděnou osifikaci relativně normální hlavice, případně také její úplnou absenci. Pokud epifýza hlavice osifikuje opožděně, osifikuje zpravidla do 36. měsíce věku dítěte. Obtížněji se již na rentgenovém snímku sleduje, zda dysplastická hlavice je fixovaná k acetabulu či je v něm volně pohyblivá, protože pasivně pohybovat s končetinou, kde část proximálního skeletu femuru je z měkké tkáně, lze i při zcela přirostlé hlavici. V případě, že je na RTG snímku dobře formované, avšak prázdné acetabulum, je předpoklad, že v acetabulu existuje malá chrupavčitá hlavice femuru (Dora C. et al., 2004, Pappas A.M., 1983).

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 (Dungl P. et al., 2005).

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 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. Posuzuje se délka postižené kosti proti ostatním kostem skeletu dané končetiny a proti kostem na kontralaterální straně (Aitken G.T., 1959).

1.1.5.2. UZ vyšetření

Ultrazvukové vyšetření lze provádět v prenatálním i postnatálním období. Charakter cév a okolní topografické poměry se sledují v B-módu zatímco průtok krve se sleduje v dopplerovském ultrazvukovém měření (Eliáš P., Žižka J., 1998). V prenatálním období může být patrný zkrácený femur, který má jinak na ultrazvuku přiměřenou echogenitu. Někdy je patrná absence femuru, případně i různé formy ohybu femuru v jeho proximální části. I další změny jako strmé acetabulum mohou být sonograficky detekovatelné. Posoudit lze také

chybění fibuly (Grissom L.E., Harcke H.T., 1994). Ultrazvukovou diagnostiku však musí provádět zkušený a s danou problematikou obeznámený lékař.

Při vyšetření ultrazvukem v postnatálním období lze sledovat například existenci a uložení hlavice femuru v acetabulu. Ultrazvuk lze použít jako doplněk klinického vyšetření, při kterém lze přímo sledovat fixaci či mobilitu epifýzy hlavice v acetabulu při současném pasivním pohybu kyčlí. (Oh K.Y. et al., 2008).

1.1.5.3. MR vyšetření

MR slouží stejně jako CT ke zlepšení základní diagnostiky určené podle RTG snímků. I MR může změnit – reklasifikovat – typ postižení. MR umožňuje zobrazit neosifikovanou chrupavčitou epifýzu hlavice femuru, která na RTG snímcích nebude patrná. Stejně tak je možné nalézt schovanou i již kalcifikovanou epifýzu v oblasti acetabula. MR obecně umožňuje lépe zobrazit velikost a uložení chrupavky sledovaného kloubu v postiženém kyčelním kloubu. K tomu lze využít různých druhů MR sekvencí, které se v několika rovinách nabírají během vyšetřování. Podle typu sekvence je šíře vrstvy v rozmezí 1-5mm. Charakter sekvence, zejména její vážení, určuje délku vyšetření. Časová náročnost každé sekvence je přímo úměrná počtu vrstev, tloušťce vrstvy, rozlišení, počtu opakování náběrů na vrstvu, případně přidané saturaci apod. Nejčastěji se k zobrazení kloubů používají tyto MR sekvence, které jsou vhodné i pro sledování PFFD: proton denzitní (PD), proton denzitní se saturací tuku (PD FS), T2 vážená turbo-spinová sekvence (T2 tse), T1 vážená spinová sekvence (T1 se), sekvence inverzního návratu saturující tuk presaturačním pulsem (Stir) a T2 gradientní sekvence duálního echa v rovnovážném stavu (T2 dess). Aplikace gadoliniové kontrastní látky není v případě MR vyšetření nutná, pokud není záměrem MR vyšetření zobrazit i průběh cév.

Na MR sekvencích lze dobře zobrazit také svaly postiženého kyčle, které bývají malé, většinou hypoplastické, atypického průběhu, ale většinou jsou všechny přítomné. Byly však popsány i paradoxní změny, kdy musculus sartorius byl hypertrofický při existující zvýšené flexi, abdukci a zevní rotaci v kyčli. U pacientů typu A sec. Aitken jsou zevní rotátory kyčle hypertrofické, abduktory hypotrofické, musculus obturator externus napřímený (Manaster B.J. et al., 2010, Laor T., Burrows P.E., 1998).

MR diagnostika 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 (Stoller D.W. et al., 2006).

1.1.5.4. CT vyšetření

CT vyšetření výborně zobrazí kostní struktury i drobná osifikační centra v průběhu postiženého femuru. Rozlišovací schopnost dnešních multidetektorových CT přístrojů dosahuje 0,5 mm ve všech třech osách. Obrazový voxel má velikost hrany 0,5 mm. Rozlišení je 2krát až 5krát vyšší než na MR obrazech. Z takto tenkých řezů případně přímo z hrubých CT dat lze vytvářet libovolné další multiplanární řezy o různých tloušťkách nejenom v ortogonálních rovinách, ale také v rovinách různě položených, směřovaných na konkrétní zobrazení určitého místa tkáně. 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 obrazy bývají zpravidla barevné a v různých projekcích zobrazují celý vyšetřený objem. Ve třech dimenzích tedy prostorově zobrazí rozložení skeletu, případně i měkkých tkání vyšší denzity, což může u PFFD být i případ vazivové či chrupavčité tkáně uložené v pakloubu. 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.

Pacienti s PFFD vyšetření na CT mohou mít přesnější klasifikaci změn, včetně zhodnocení okolních měkkých tkání a průběhu cév. Nepříliš dobře zobrazuje CT průběh nervů. Nervy se jeví jako tenké proužky izodenzní s ostatními měkkými tkáněmi, např. svaly, neboť u nich nedochází k vysycování kontrastní látkou. Jejich zobrazení na 3D obrazech je tak velmi obtížné.

Při zobrazování cév na CTAG lze docílit pomocí softwaru rozvinutí cév, zhodnotit jednotlivé dělení, uložení a jejich šíří na postižené i nepostižené straně (Horák M. et al., 2007, Chomiak J. et al., 2010).

Používání CT přístroje k vyšetřování pacientů s PFFD není ve světě alespoň podle dostupných publikací 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.

1.1.5.5. Arthrografické vyšetření

Arthrografie se v některých případech používá k hodnocení velikosti hlavičky femuru, jejího tvaru a její mobility v acetabulu (Epps C.H., 1983). Toto vyšetření umožňuje obecně zobrazit velikost kloubní štěrbiny, zobrazit recesy kloubního pouzdra a nepřímo určit vztahy v kloubu. Vzhledem k tomu, že je nutné pod skiaskopickou kontrolou aplikovat jodovou kontrastní látku do kloubní štěrbiny, která bývá u pacientů s PFFD atypická, často dosti úzká, je arthrografie v současnosti nahrazována moderními zobrazovacími metodami – MR a CT. 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 postiženého kloubu.

1.1.6. Histologické vyšetření

V mikroskopickém obrazu bývají u PFFD poruchy v organizaci proliferujících hypertrofických chondrocytů formujících za normálních podmínek pravidelné longitudinální sloupce. Dalším nálezem je zhroucení organizace vaskulární invaze se strukturou spíše včelí plástve než s podélným vzorem tvořícím rovnoběžné trabekuly (Bryant D.D., Epps C.H., 1991).

1.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru v dospělém věku

Posttraumatické defekty kloubní chrupavky představují jeden z nejzávažnějších problémů ortopedické chirurgie (Magnussen R.A. et al., 2008), neboť kloubní chrupavka má minimální potenci pro regeneraci. Defekty perzistují po celá léta a jejich hojení je velmi omezené, proto se často v souvislosti s nimi vyvinou degenerativní změny postiženého kloubu. Výrazem určitých regenerativních změn je nález fibrózní chrupavky, která převažuje při histopatologickém vyšetření těchto defektů. Vazivová chrupavka je však méně kvalitní, neboť je mechanicky méně odolná a její chemické složení je odlišné od hyalinní chrupavkové tkáně. Je tedy zřejmé, že léčení defektů kloubní chrupavky má zásadní význam, neboť 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 (Brittberg M. et al., 1994, Frenkel S.R. et al., 1997, Hendrickson D.A. et al., 1994, Lee C.R. et al., 2003, Peltarri K. et al. 2008, Tognana E. et al., 2007).

Standardní chirurgické postupy jako drilling nebo mikrofrakturace subchondrální kosti, debridement, osteotomie, mosaiková plastika, transplantace autograftů z nezatěžované oblasti do místa defektu nebo transplantace perichondria, periostální tkáně, či fascie (Magnusen R.A. et al., 2008) přinesly určitý pozitivní léčebný efekt včetně zlepšení funkce postiženého kloubu, avšak ve většině případů nevedly k obnově kloubní chrupavky (Buckwalter et al., 1998). V současné době transplantace autologních chondrocytů (autologous chondrocyte transplantation – ACT) představuje nejmodernější metodu využívanou při léčbě posttraumatických defektů kloubní chrupavky (Filardo G. et al., 2011, Hendrickson D.A. et al., 1994, Hollander A.P. et al., 2003 a 2006, Knutsen G. et al., 2004, Lee C.R. et al. 2003, Podškubka A. et al., 2006).

Poslední a nejmodernější generace transplantace autologních chondrocytů využívá biologické materiály jako nosiče chondrocytů. Původně Brittberg využil suspenze chondrocytů injekčně aplikovanou do místa defektu, který překryl periostální tkání (Brittberg M. et al., 1994). Fixace transplantátu však nebyla dostatečná a došlo k jejímu uvolnění a k vyplavení kultury chondrocytů. Tato technika proto byla nahrazena postupem, využívajícím trojrozměrný nosič s kulturou chondrocytů, který je možno v místě aplikace dostatečně pevně zafixovat. Takovýto chondrograft 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. Dosud byly použity anebo jsou používány k těmto účelům různé materiály jako demineralizovaná kostní tkáň, polyakrylátová nebo polyglykolová kyselina, hydroxyapatit s Dacronem, fibrin, vlákna kolagenu nebo kolagenový gel (Frenkel S.R. et al., 1997). Seznam komerčně vyráběných a klinicky ověřovaných produktů je v současné době již velmi dlouhý, jak informovali Coates a Fischer (Coates E.E., Fischer J.E., 2010).

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 (Horák M. et al., 2014).

2. Vymezení cílů práce

2.1. PFFD

Ortopedická klinika ve spolupráci s Radiodiagnostickou klinikou FN Na Bulovce (nyní Nemocnice Na Bulovce) vede dlouhodobý registr pacientů s PFFD z celé České republiky a léčí se zde i pacienti z jiných zemí, zejména ze Slovenska a také například ze Saudské Arábie.

V období červen 2005 - březen 2008 byli zde podle následujícího protokolu sledováni jak nově přichozí pacienti s diagnózou PFFD, tak pacienti v různém stupni terapie či pacienti po ukončené terapii. Měli jsme možnost podílet se na vyšetření sestavy pacientů za použití různých zobrazovacích metod. Dosažené výsledky jsme zahrnuli do svého disertačního spisu a analyzovali jsme je podle následujícího schématu, které shrnuje cíl naší práce.

Protokol sledování:

1. Rozdělení pacientů s PFFD podle stávající rentgenové klasifikace
2. Provedení CT skenů v rozsahu kyčelních kloubů a následně případná reklasifikace některých případů
3. Sledování anatomických změn v okolí kyčelního kloubu, zejména průběh cév (tepen i žil), jejich průměr a uložení větvení a jejich srovnání s nepostiženou stranou
4. Důkladná analýza dalších anomálií anatomicky přímo nesouvisejících s postiženým kyčelním kloubem
5. Vyhodnocení radiační zátěže u pacientů sledovaných s diagnózou PFFD při vyšetření pomocí RTG metod
6. Histologická analýza tkání z oblasti anomálního kyčelního kloubu, získaných po provedených korekčních operacích

2.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru

Ve spolupráci se dvěma ortopedickými klinikami z Fakultní nemocnice v Motole a Nemocnice Na Bulovce s Ústavem patologie 1. LFUK a VFN v Praze byly vyšetřeny dvě skupiny pacientů s posttraumatickým defektem kloubní chrupavky distálního femuru, jimž byly transplantovány dva odlišné biomateriály osazené kulturou autologních chondrocytů.

Protokol sledování:

1. Výběr pacientů s posttraumatickou lézí kloubní chrupavky detekované na MR
2. Odběr vzorku postižené chrupavky během artroskopického vyšetření k jejímu histopatologickému zhodnocení a k vytvoření kultury autologních chondrocytů
3. Transplantace kultur autologních chondrocytů pomocí dvou odlišných biomateriálů (Hyalograft C, Fidia Advanced Polymeres, Abano Terme, Itálie a Chondrograft, NTC, FN Brno - Bohunice)
4. Kontrolní artroskopie po 10 – 12 měsících od transplantace s odběrem a bioptickým vyšetřením vzorků nově vytvořené chrupavky
5. Provedení kontrolního MR vyšetření kolenního kloubu čtyři roky od vstupního vyšetření
6. Vzájemné porovnání dosažených výsledků u obou použitých biomateriálů a korelace radiologických a histopatologických nálezů
7. Odběr kontrolních vzorků zdravé chrupavky při rutinním autoptickém vyšetření
8. Odběr kontrolních vzorků chrupavky kolenního kloubu postiženého osteoartrózou u pacientů podstupujících implantaci totální endoprotézy

3. Materiál a metody

3.1. PFFD

3.1.1. Soubor pacientů PFFD

Soubor 21 pacientů s PFFD ve věku 1-17 let, zahrnujících nemocné v průběhu léčení, po ukončené terapii a nově přichozí, byl v letech 2005-2008 sledován dle uvedeného protokolu. Jednalo se o třináct chlapců a osm dívek. 14 nemocných bylo vyšetřeno ještě bez jakéhokoliv chirurgického zákroku, dalších 7 pacientů již podstoupilo některou fázi chirurgické terapie. Primární klasifikace sec. Pappas byla stanovena podle RTG snímků, následovalo CT vyšetření s upřesněním klasifikace a popisem jak kostních změn, tak struktur měkkých tkání včetně cév.

U všech pacientů byla odebrána důkladná rodinná anamnéza, která však neobjevila žádný familiární výskyt PFFD ani další skeletální anomálie v příbuzenstvu.

3.1.2. Použité vyšetřovací metody

3.1.2.1. RTG

Pacienti byli během sledovaného období opakovaně snímkováni na RTG. Počtu 10-25 vyšetření u každého nemocného odpovídá 15-87 expozic. Expoziční parametry byly vždy nastaveny podle velikosti vyšetřované oblasti v poměru k věku a váze pacienta (dítěte). 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.

Každé vyšetření bylo indikované podle postupujícího plánu terapie.

Základní snímkovací projekce byly předo-zadní – 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 snímají vcelku na protáhlý detektor, případně se počítačově snímky skládají do jednoho dlouhého obrazu, nebo se vyšetření rozfází na tři samostatné oblasti – kyčle, kolena a bérce s hlezny.

3.1.2.2. CT

Každý pacient byl vyšetřen helikálním skenem v oblasti kyčlí a stehů 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 se změnou CT přístroje příliš nezměnil, jen byl přizpůsoben možnostem novějšího rychlejšího přístroje. 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 (Ferda J. et al., 2002).

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 obrát 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) (Ferda J. et al., 2004). Většina pacientů do pěti let byla vyšetřena v krátké celkové anestezii. Větší děti již většinou nebylo nutné do celkové anestezie uvádět. Ukázalo se, že po vysvětlení povahy vyšetření dítěti úměrně jeho věku lze zajistit jeho bezproblémovou spolupráci i bez uvádění do celkové anestezie.

Oba CT přístroje (označené jako multidetektorové) nabírají primárně objemové datasey 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 vrstvy pouhé 3 mm.

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

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 MIP rekonstrukce celého 3D objemu dat. 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.

3.1.3. Sledování radiační zátěže u pacientů s PFFD

Jako veličina pro hodnocení ozáření byla použita efektivní dávka (mSv). Efektivní dávka byla stanovena pro CT vyšetření, které bylo zpravidla provedeno na začátku sledování. RTG dávky byly také počítány ze skiagrafičtých snímků pořízených ve stejné době jako CT vyšetření. Efektivní dávka byla vypočtena u RTG snímků samostatně pro RTG pánve a samostatně pro RTG femuru.

Pro výpočet efektivní dávky byl použit program PCXMC 2.0 (STUK -Radiation and Nuclear Safety Authority, Finsko). Tento program umožňuje odhad orgánových dávek, efektivních dávek a také rizika spojeného s ozářením pro všechny výkony v radiologii (skiografie, skiaskopie, intervenční výkony) mimo CT vyšetření. Odhad dávek je založen na simulacích Monte Carlo. Efektivní dávka z CT vyšetření byla stanovena na základě údaje součinu dávky a délky (DLP) uvedeného v protokolu o vyšetření a konverzních koeficientů publikovaných v práci pro tkáňové váhové faktory dle doporučení ICRP 103 (Deak P.D. et al., 2010).

3.1.4. Bioptické vyšetření vzorků kyčelních kloubů

U šesti pacientů bylo provedeno histologické vyšetření po proběhlé rekonstrukční operaci. Jednalo se o pacienty č. 1, 2, 3, 7, 8 a 19. U pacienta č. 19 se podařilo najít vzorek

tkáně z pakloubu pořízený ještě před začátkem sledování a uchovávaný na Ústavu Patologie 1. LF UK a VFN v Praze.

K vyšetření byly dodány extirpované části tkáně z oblasti defektu proximálního femuru někdy se změnami ve smyslu pseudoartrózy. Vzorky byly vždy zpracovány v celém rozsahu, po předchozím odvápnění.

3.2. Posttraumatické defekty kloubní chrupavky distálního femuru

3.2.1. Soubor pacientů

V druhé části studie jsme hodnotili radiologické nálezy a histologicky byly vyšetřeny použité chondrografty od 30 pacientů, 25 mužů a 5 žen s průměrným věkem 33 let, u nichž byl při klinickém vyšetření identifikován solitární posttraumatický defekt kloubní chrupavky v oblasti femorálních kondylů. Většina defektů byla lokalizována v mediálním kondylu (N-21), zbytek se nacházel v laterálním kondylu femuru. Průměrná velikost defektu byla 2,5 cm².

Při hodnocení pacientů byla dodržena standardní kritéria International Knee Documentation Committee (Mainil-Varlet P. et al., 2002). Všichni pacienti zahrnutí do dané studie podepsali informovaný souhlas pro artroskopické a bioptické vyšetření v souladu s požadavky příslušných místních etických komisí. U všech nemocných po standardním laboratorním vyšetření byla vyloučena přítomnost infekčních chorob.

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.

Pacienti byli sledováni mezi lety 2009 – 2013.

3.2.2. Kontrolní materiály

3.2.2.1. Hlavice femuru s normální kloubní chrupavkou

Kontrolní vzorky pro studium normální struktury kloubní chrupavky byly získány z hlavic femuru při autoptickém vyšetření náhle zemřelých pacientů. Ve všech případech (n=7) byly vzorky odebrány do 24 hodin po smrti. Ve 4 případech se jednalo o muže ve věku 23-46 let a 3 byly ženy (19-37 let). U dalších 15 pacientů byly získány vzorky z hlavic femurů vyjmutých při implantaci totální endoprotézy pro zlomeninu krčku. Jednalo se o 7 mužů (57-77 let) a osm žen (53-68 let). U žádného z nemocných nebyly pozorovány artrotické změny, povrch hlavice femuru byl zcela hladký.

3.2.2.2. Hlavice femuru s osteoartrózou

Druhou kontrolní skupinu tvořily hlavice femuru vyjmuté pro těžkou osteoartrózu s následnou implantací endoprotézy. Celkem bylo vyšetřeno 12 případů, 6 žen a 6 mužů a věkovém rozpětí 52-70 let. Ve všech případech kloubní povrch vykazoval degenerativní změny a byl ložiskovitě nápadně zhrubělý a nerovný.

3.2.3. 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, Itálie) a kultivovány po dobu 14 dnů v Itálii na náklady pojišťovny. Metodika již byla publikována (Grigolo B. et al., 2002, Tognana E., 2007).

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 (Horák M. et al., 2014).

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.

3.2.4. 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 chondrocytů. Druhé vyšetření následovalo s odstupem čtyř let od

prvního vyšetření, tedy zhruba 48 měsíců od začátku terapie. Defekt chrupavky před transplantací se většinou magnetickou rezonancí nevyšetřoval, neboť rozsah postižení u každého pacienta určila artroskopie. Při ní byl také odebrán vzorek pro kultivaci chondrocytů. Následovala další artroskopie s transplantací štěpu. Radiodiagnostické vyšetření jsme využili až pro sledování štěpu během následujících čtyř let.

Během MR vyšetření byly použity tyto 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 (tabulka 1). Zvolené sekvence dobře pokrývají oblast zájmu ve všech třech základních rovinách. Sekvence T1 se a T2 tse ukazují anatomické struktury kolena, vazy, šlachy, skelet. T1 se sekvence ukazuje navíc prokrvácené změny, 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 včetně reaktivního edému kostí. Tyto sekvence dobře zobrazují strukturu chrupavky a její změny. Vždy je vhodné každou oblast vyšetřit více sekvencemi pro vyloučení artefaktů, které mohou imitovat i různé druhy patologických změn.

MR sekvence	Rovina	Repetiční čas (TR) (ms)	Echo čas (TE) (ms)	Šíře vrstvy (mm)	Další parametry
T1 tirm	sagitální	5971	31	4	TI – 130 ms
T1 se	koronární	682	14	3,5	
PD	sagitální	2940	12	4	
T2 tse	sagitální	2940	83	4	
T2 tse fs	transverzální	4313	36	3	presaturační pulz
PD	koronární	3310	12	4	
T2 tse	koronární	3310	83	4	
T2 trufi3d	sagitální	11,3	5	1	gradientní sekvence

Tabulka 1 – soubor sekvencí použitých k MR vyšetření kolenního kloubu.

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. Ačkoliv byli pacienti dobře fixováni ve vyšetřovací cívce, bylo nutné ojediněle vyšetření určité sekvence pro rozhýbání opakovat. Žádný pacient však nepožadoval ukončení vyšetření předčasně.

3.2.5. 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 jsme vyhodnocovali 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

3.2.6. Kontrolní skupina

Hlavice femuru byly po fixaci ve formolovém roztoku nařezány na tenké lamely o síle 3-5 mm 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 odvápněována a předešlo se tak arteficiálnímu poškození.

3.2.7. Imunohistochemické vyšetření

Při imunohistochemickém vyšetření jsme použili 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 byl typ I sec. Pappas zastoupen jedním případem, typ II sec. Pappas (Aitken D) dvěma případy, typ III sec. Pappas (Aitken C) osmi případy, typ IV sec. Pappas (Aitken B) dvěma případy (tabulka 2). 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 dvoupráscíté nohy byla u jednoho pacienta (pacient č. 5). U dvou pacientů (pacient č. 11 a č. 15) byla noha složena ze čtyř prstů. U jednoho případu typ IX sec. Pappas (pacient č. 13) se nacházely tří- resp. čtyřpráscíté ruce. Pacient č. 10 s PFFD typu VII sec. Pappas měl na druhé nepostižené končetině pes equinovarus (tabulka 3).

Pacient č.	Pohlaví (muž – M, žena – F)	Rok narození	Věk v době CT vyšetření (roky)	Typ PFFD sec. Pappas	Postižená strana	CT vyšetření ve vztahu k chirurgické terapii (před začátkem nebo v průběhu)
1	F	2004	3	I	R	před začátkem
2	M	2002	3	III	L	před začátkem
3	M	2000	5	III	R	před začátkem
4	M	1998	7	II	R	před začátkem
5	M	2004	2	III	R	před začátkem
6	F	2006	1	III	R	před začátkem
7	M	2003	4	IV	L	před začátkem
8	M	2002	3	IV	R	před začátkem
9	M	2003	3	VII	R	před začátkem
10	M	2002	5	VII	L	před začátkem
11	M	2000	7	VIII	R	před začátkem
12	F	2002	4	IX	L	před začátkem
13	M	2001	6	IX	R	před začátkem
14	F	2004	4	IX	R	před začátkem
15	M	1991	16	II	L	v průběhu
16	F	1987	20	II	L	v průběhu
17	F	1990	17	III	R	v průběhu
18	F	1993	13	III	R	v průběhu
19	M	1995	11	III	R	v průběhu
20	M	1998	8	III	R	v průběhu
21	F	2000	7	VII	R	v průběhu

Tabulka 2 – soubor pacientů s PFFD, základní údaje.

Pacient č.	Typ PFFD sec. Pappas	Další nálezy	Chirurgická terapie (návrh nebo již uskutečňovaná)
1	I		„knee for hip“ – King II
2	III		PA rekonstrukce
3	III		PA rekonstrukce
4	II (III)		Ortotická pomůcka
5	III	Hypoplazie tibie a fibuly, dvou- paprscitá noha	Ortotická pomůcka
6	III		Ortotická pomůcka
7	IV		PA rekonstrukce
8	IV		PA rekonstrukce
9	VII		Prodloužení femuru
10	VII	pes equinovarus na kontralaterální straně	Valgizační osteotomie femuru
11	VIII	čtyřpaprscitá noha	Prodloužení femuru
12	IX		Salterova osteotomie
13	IX	tří- a čtyřpaprscitá ruka	Salterova osteotomie
14	IX		Prodloužení femuru
15	II	čtyřpaprscitá noha	„knee for hip“ – King II
16	II		„knee for hip“ – King II
17	III		PA rekonstrukce a prodloužení femuru
18	III		PA rekonstrukce a prodloužení femuru
19	III		PA rekonstrukce a prodloužení femuru
20	III		PA rekonstrukce a prodloužení femuru
21	VII		Valgizační osteotomie a prodloužení femuru

Tabulka 3 – soubor pacientů s PFFD. Další doprovodné nálezy a návrh či již probíhající chirurgická terapie.

4.1.1. Změny skeletu u PFFD

Sedm pacientů mělo provedeno CT vyšetření nativně se zaměřením na zobrazení skeletu a následně měli ve druhé době provedeno CTAG vyšetření cév. Postupně byli další pacienti ve snaze snížit radiační dávku vyšetření jen metodou CTAG s aplikací kontrastní látky intravenózně, neboť hodnocení skeletu při CTAG vyšetření netrpí zhoršením kvality, cévní struktury nepřekrývají výrazně skelet a kvalita výsledných VRT obrazů je stejná.

4.1.1.1. Reklasifikace typu PFFD podle CT nálezu

U pacienta č. 4 došlo k reklasifikaci PFFD změn z typu II na typ III. (V další části práce je již pacient veden vždy jako pacient po reklasifikaci, tedy typ III sec. Pappas.) Zatímco v klasickém RTG obraze je acetabulum prázdné, tedy bez osifikující hlavice stehenní kosti, na CT vyšetření je zachycena malá epifýza hlavice femuru v hypoplastickém acetabulu, které je strmé, málo vyvinuté. Na RTG snímku je zpětně možné epifýzu hlavice femuru vystopovat, ale s určitostí ji bez znalosti anatomie z CT obrazu zhodnotit nelze. Reklasifikace neměla ve svém konečném důsledku vliv na změnu chirurgické terapie, protože se současně ukázalo, že tato epifýza hlavice je pevně fixovaná k acetabulu a neumožní tedy po operaci volný pohyb v kyčelním kloubu.

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

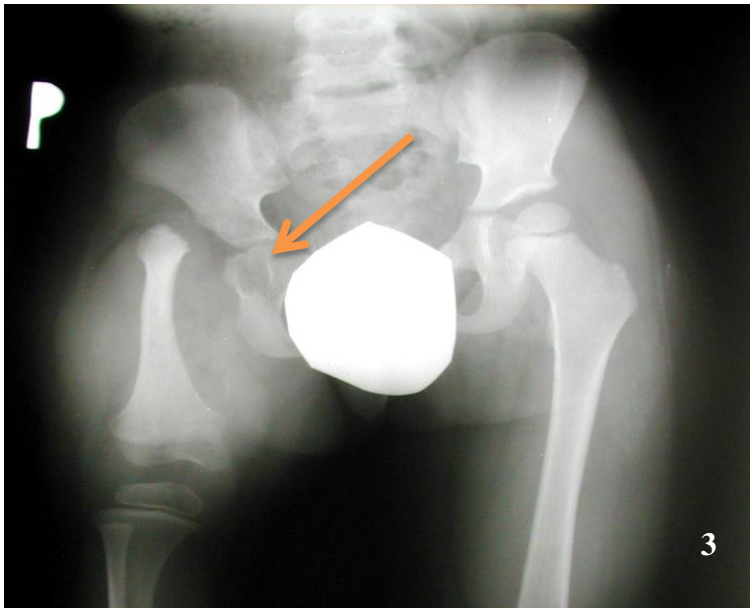
U pacientů se změnami typ III sec. Pappas je pro terapii nutná znalost uložení epifýzy hlavice femuru v acetabulu. Nejdůležitější je určení, zda je epifýza k acetabulu fixována či zda je volně mobilní. Pouhým klinickým vyšetřením toto není většinou možné stanovit, protože i při fixované epifýze se měkké tkáně kloubu při vyšetřování ohýbají příslušným pasivním pohybem, takže mohou imitovat funkci volné hlavice. 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. Předpokládáme, že prostor by měl mít šíři alespoň 1 mm (obraz 3).

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 (tabulka 4) (obraz 4, 5). Tomuto nálezu byla přizpůsobena následná terapie. Ani u pacientů, u kterých již léčba započala, nebylo nutné terapeutický postup měnit, neboť se jednalo o tři pacienty s epifýzou v acetabulu volně mobilní.

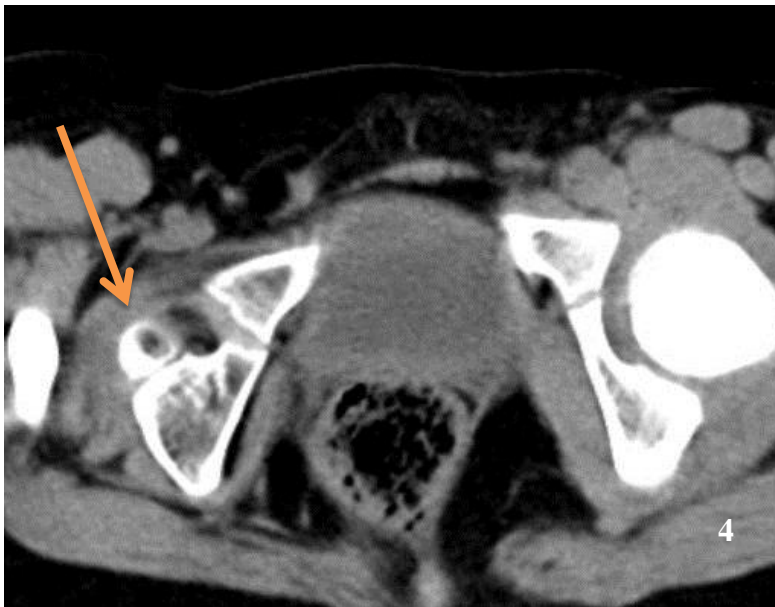
U vyšších typů (typ IV-IX) problémy fixace epifýzy hlavice ke skeletu acetabula nebývají. Ani v našem souboru nebyly takové změny nalezeny.

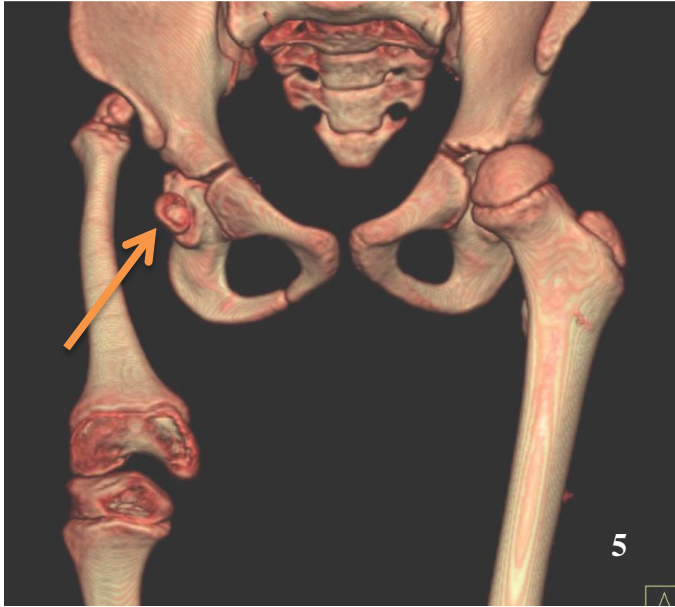
Pacient č.	Typ PFFD sec. Pappas	Typ PFFD reklasifikace	Další nálezy
1	I	I	
2	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu – volně mobilní
3	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu – volně mobilní
4	II	nově III	Identifikovaná epifýza hlavice v acetabulu - fixovaná
5	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu - fixovaná
6	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu - fixovaná
7	IV	IV	
8	IV	IV	
9	VII	VII	
10	VII	VII	
11	VIII	VIII	
12	IX	IX	
13	IX	IX	
14	IX	IX	
15	II	II	
16	II	II	
17	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu – volně mobilní
18	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu – volně mobilní
19	III	III	Epifýza hlavice v acetabulu – volně mobilní
20	III	III	
21	VII	VII	

Tabulka 4 – klasifikace PFFD, reklasifikace po CT vyšetření a posouzení epifýzy hlavice kyčle.



Obraz 3 – Pacient č. 4 – podle RTG typ II sec. Pappas vpravo. Epifýza hlavice na pravé straně není zřetelná. Retrospektivním zkoumáním při znalosti CT vyšetření je epifýza hlavice vpravo patrná jako naznačené paradoxní projasnění v lopatě kyčelní kosti s kulovitou konturou (šipka).



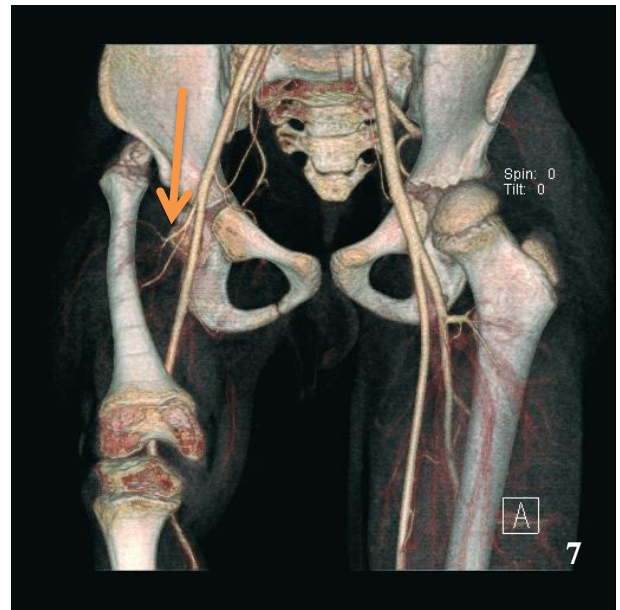
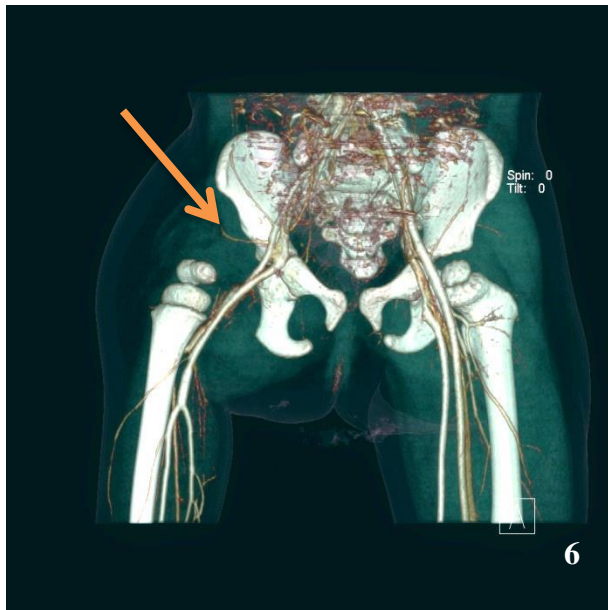


Obraz 4 a 5 – Pacient č. 4 – CT axiální sken a VRT rekonstrukce. Malá osifikovaná epifýza pravostranné hlavice femuru je patrná v hypoplastickém acetabulu. Na axiálním skenu je skelet epifýzy hlavice v přímém dotyku se skeletem acetabula. Nález je proto hodnocen jako fixovaná hlavice, což bylo následně potvrzeno i klinicky. Hlavice femuru označena šipkou.

4.1.2. Cévní změny u PFFD

Prvních čtrnáct pacientů s PFFD bylo vyšetřeno ještě před zahájením chirurgické terapie. U dvanácti případů ukázalo CTAG vyšetření typický anatomický průběh cév na postižené dolní končetině. Hypoplastický pakloub kyčle byl zásoben větvemi z arteria femoralis, která je pokračováním tepny arteria iliaca externa (AIE). Nález byl stejný na obou stranách. U zbylých dvou případů bylo popsáno abnormální cévní zásobení postižené končetiny, které bude popsáno níže (tabulka 5).

U sedmi případů byla chirurgická léčba zahájena dříve, než začalo samotné sledování. CT vyšetření bylo provedeno několik měsíců až let po začátku chirurgické léčby. U všech sedmi pacientů byl nalezen normální průběh cév. Zjištěny byly pouze varianty normy, které budou také následně popsány.



Obraz 6 – Pacient č. 1 - typ I sec. Pappas vpravo. CTAG vyšetření VRT obraz – typický průběh cév v oblasti malé pánve a kyčlí. V tomto případě je stehno extrémně krátké, objem měkkých tkání je výrazně zmenšen, proto i céva zásobující tuto oblast včetně postižené kyčle je velmi tenká až nezřetelná (šipka). Jedná se nejspíše o arteria femoralis profunda.

Obraz 7 – Pacient č. 4 - typ III sec. Pappas vpravo. CTAG vyšetření VRT obraz – typický průběh cév v oblasti malé pánve a kyčlí. Měkké tkáně zkráceného stehna jsou zásobeny hypoplastickou tepnou – arteria femoralis profunda (šipka).

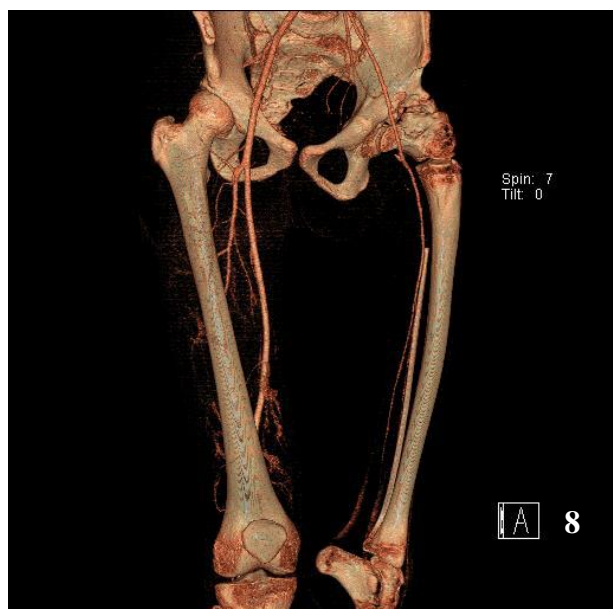
Pacient č.	Typ PFFD sec. Pappas	Postižená strana (R/L)	Cévní zásobení postižené DK na CTAG	Průměr AFC v úrovni horní hrany symfýzy (mm)		Vzdálenost bifurkace AFC od horizontály proložené Y- chrupavkami (mm)	
				R	L	R	L
1	I	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	3	5	-9	+29
2	III	L	atypický průběh cévního zásobení	5	2	+18	-12
3	III	R	atypický průběh cévního zásobení	1	6	-8	+30
4	III	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	5	6	0	+17
5	III	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	8	9	+30	+45
6	III	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	2	4	-8	+20
7	IV	L	typické, proximálněji uložený odstup AFP	5	4	+23	-5
8	IV	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	2	4	+13	+24
9	VII	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	4	4	+19	+28
10	VII	L	Typické	5	5	+24	+24
11	VIII	R	Typické	6	6	+33	+31
12	IX	L	typické, proximálněji uložená bifurkace AFC na kontralaterální straně	5	4	+22	+26
13	IX	R	typické, proximálněji uložená bifurkace AFC na kontralaterální straně	5	4	+32	+19
14	IX	R	Typické	4	4	+24	+23
15	II	L	typické, proximálněji uložený odstup AFP	7	3	+41	-13
16	II	L	typické, proximálněji uložený odstup AFP	8	2	+48	0
17	III	R	typické, s krátkou AIC, proximálněji uložená bifurkace AIC	5	6	+10	+41
18	III	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	5	6	+19	+27
19	III	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	5	7	0	+59
20	III	R	typické, proximálněji uložený odstup AFP	7	5	0	+40
21	VII	R	typické, proximálněji	4	7	+25	+20

			uložená bifurkace AFC na kontralaterální straně				
--	--	--	--	--	--	--	--

Tabulka 5 – cévní zásobení dolní končetiny u pacientů s PFFD zobrazené pomocí CTAG. (Hodnoty se znaménkem plus „+“ znamenají posun distálním směrem, hodnoty se znaménkem minus „-“ znamenají posun proximálním směrem)

4.1.2.1. Změna v průměru AFC na postižené a nepostižené straně

Průměr tepen arteria iliaca externa a arteria femoralis communis (AFC) byl zmenšený u všech vyšetřených pacientů na postižené straně. Výraznější změny v průměru arteria femoralis communis byly zachyceny u pacientů s postižením typ I – IV sec. Pappas, pouze malé až nevýznamné změny byly u pacientů s postižením typ VII – IX sec. Pappas v porovnání s kontralaterální nepostiženou stranou. U posledně uvedeného stupně postižení je celkový zkrat dolní končetiny výrazně menší než u nízkých typů PFFD (tabulka 2). Nebyly zaznamenány paradoxní změny, kdy by byla šíře AFC na postižené straně větší než na nepostižené. Nález změny šíře tepen na postižené straně plně odpovídá anatomickým poměrům u pacientů s těžší formou typu I – IV sec. Pappas, kdy zřetelně menší objem tkáně potřebuje také menší cévní zásobení (obraz 6, 7, 8).



Obraz 8 – Pacient č. 15 - PFFD typ II sec. Pappas vlevo – CTAG vyšetření VRT obraz, anteriorní pohled. Zřetelná asymetrie v šíři femorálních tepen. Pacient již po provedené zhojené „Knee for Hip“ operaci.

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

Arteria femoralis communis 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 proximálnější uložení bifurkace AFC, tedy stav, kdy AFP zřetelně odstupuje výše než na nepostižené straně (tabulka 5). Zatímco normální odstup se pohybuje u dětí průměrně 30 mm distálně od horizontály procházející Y-chrupavkou, u sledovaných pacientů se bifurkace nacházela proximálnější 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 uložena než daná horizontála. Tento nález 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, nález i zde odpovídá tíži postižení. Popsaná změna u typu VII sec. Pappas může být souhrou více faktorů (obraz 9, 10).

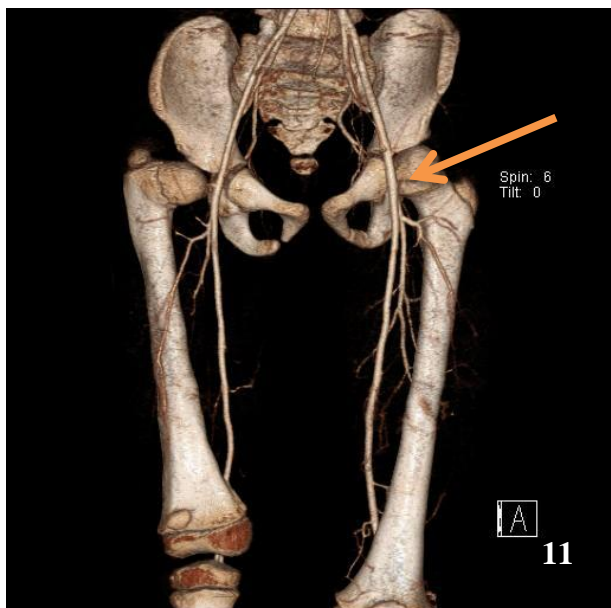


Obraz 9 a 10 – Pacient č. 7 - PFFD typ IV sec. Pappas vlevo – CTAG vyšetření VRT obraz, anteriorní a téměř anteriorní pohled, vlevo vysoko uložená bifurkace AFC, ještě nad úrovní Y-chrupavky (šipka). AFP zásobuje okolí postiženého kloubu.

4.1.2.3. Paradoxní uložení bifurkace AFC

Ve třech případech byl odstup AFP z AFC umístěn ve srovnání se stranou postiženou proximálněji na straně kontralaterální, tedy nepostižené.

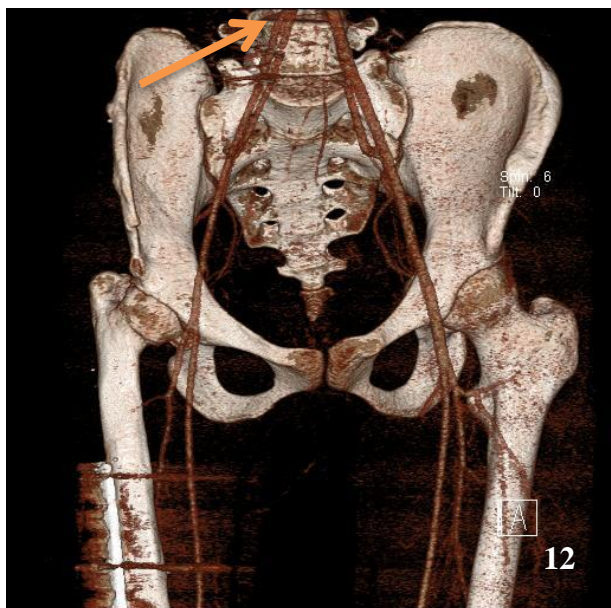
Případy se týkaly vyšších typů VII a IX (pacient č. 12, 13 a 21) tedy méně významného postižení, které je také uloženo více distálně. Příčiny tohoto nálezu se nepodařilo spolehlivě objasnit (obraz 11).



Obraz 11 – Pacient č. 21 – PFFD typ VII sec. Pappas vpravo – CTAG vyšetření VRT obraz, anteriorní pohled. Příklad paradoxního uložení bifurkace AFC na nepostižené straně proximálněji než na straně postižené (šipka). Pacient po zhojené korekční osteotomii.

4.1.2.4. 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 35 mm (obraz 12). Protože sledovaný rozdíl v posunu odstupu AFP z AFC proti horizontále na Y-chrupavce byl 31 mm, lze konstatovat, že došlo k celému posunu na tepenných strukturách postižené DK, neboť absolutní délka AIE se lišila mezi nepostiženou a postiženou stranou o méně než 4 mm (Chomiak J. et al., 2009).



Obraz 12 – Pacient č. 17 - PFFD typ III sec. Pappas vpravo – CTAG vyšetření VRT obraz, anteriorní pohled. Vyšší uložení bifurkace AFC a také vyšší uložení bifurkace AIC na postižené straně, zcela na okraji obrazu (šipka). Pacient po zhojené korekční osteotomii pakloubu a po prolongaci femuru, který je fixován dlahou. Bifurkace AIC je přesně na začátku skenovacího pole, proto se na VRT obraze jeví málo zobrazená. Vyšetření zaměřeno na oblast kyčlí.

4.1.2.5. Anomální cévní zásobení postižené dolní končetiny

Dva pacienti, oba 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 (Horák M. et al., 2007, Horák M. et al., 2008, Chomiak J. et al., 2009).

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

Již podle RTG snímků je patrný zkrat LDK odpovídající třem čtvrtinám délky stehna. Informace z CT vyšetření ukazuje přesnější anatomickou topologii v oblasti levé kyčle, kde distální hypoplastické stehno je dislokováno proximálně a propojené s malou kostěnou epifýzou hlavice femuru pruhem měkké tkáně. Epifýza hlavice femuru je v přiměřené vzdálenosti od skeletu acetabula, a proto byla vyhodnocena jako volně mobilní, což se později ověřilo i klinicky.

Vyšetření CTAG prokazuje hypoplastickou AIE, která pokračuje na zmenšené stehno jako tenká femorální arterie. Tato tepna se dělí ještě nad úrovní horizontály proložené Y-

chrupavkami na laterální větévku, kdy se nejspíše jedná o AFP a na mediální větévku, která je považována za AFS. Laterální větev AFP směřuje k pakloubu, zde nejspíše zásobuje měkké tkáně stehna včetně svalů quadriceps femoris a biceps femoris a končí před kolenním kloubem. Mediální větev (AFS) zásobuje převážně adductory stehna a končí také před kolenním kloubem.

Zbytek postižené levé dolní končetiny je zásoben atypicky z povodí arteria iliaca interna (AII) přes arteria glutea inferior (AGI). Tato tepna přechází na stehno přes foramen ischiadicum major dorsálně a nachází se posteriorně od kyčle, následně pokračuje směrem do Hunterova kanálu jako arteria poplitea (AP) a dále na bérec, kde se již dělí na tři bércové tepny. Arteria tibialis anterior a arteria tibialis posterior jsou relativně přiměřené velikosti. Třetí tepna je velmi tenká, nejspíše se jedná o arteria fibularis. Samotná trifurkace je posunuta relativně distálně, zhruba do poloviny bérce. Naproti tomu trifurkace na nepostižené druhé končetině je uložena v horní třetině bérce (obraz 13-18).

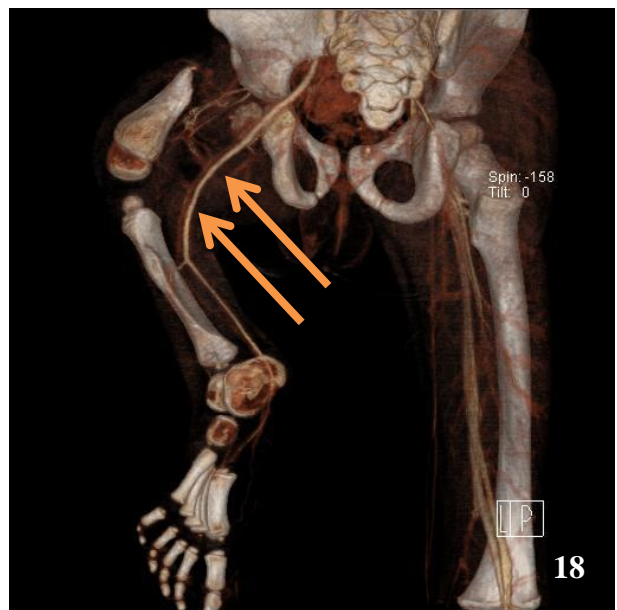
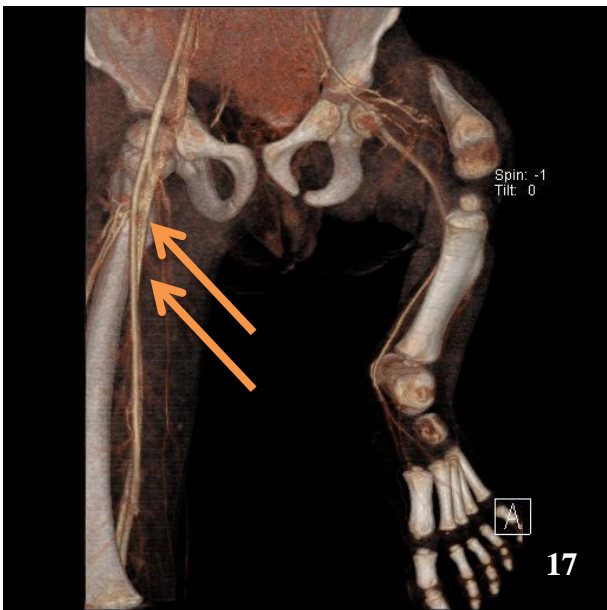
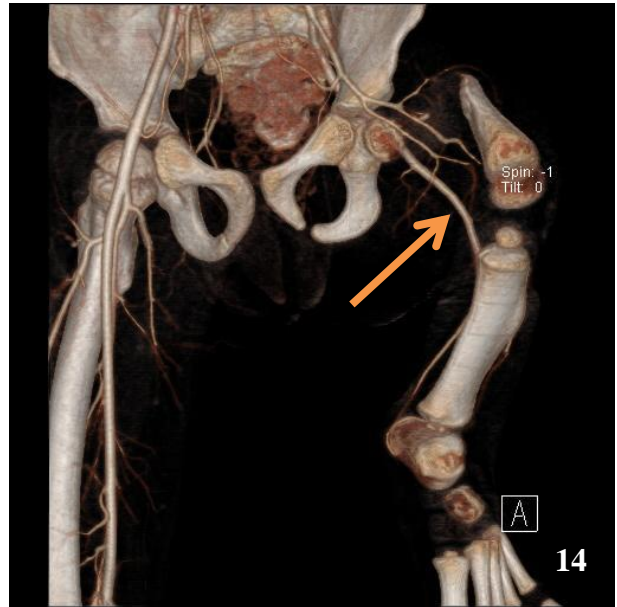
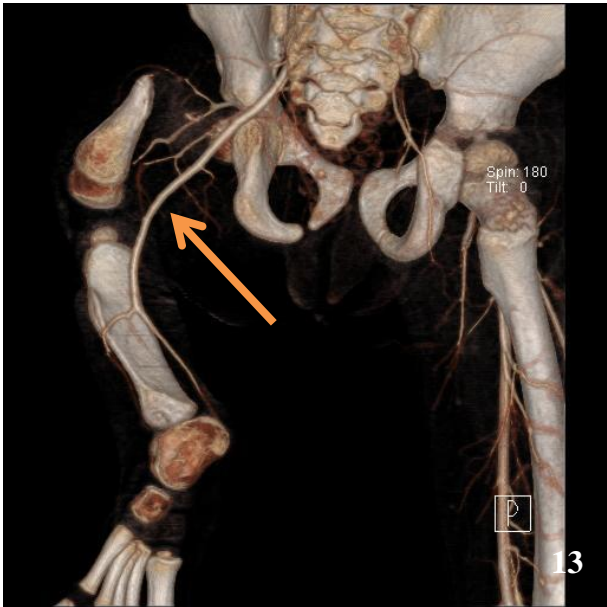
Tepna v úseku od foramen ischiadicum major až na bérec zřetelně doprovází nesyťící se pruhovitou strukturu – nervus ischiadicus. Úsek na dorsální straně stehna zřejmě odpovídá arteria comitans nervi ischiadici neboli arteria ischiadica. Za normálních podmínek je tato tepna doprovázející ischiadický nerv velmi tenká a na běžném CT vyšetření nerozlišitelná. Z arteria ischiadica odstupuje 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 je doprovázená žílou - vena poplitea, která drénuje krev z hlubokých žil nohy a bérce. Nad kolenem tato žíla sleduje průběh arteria ischiadica a doprovází tedy ischiadický nerv. Žílu v zadním průběhu stehna lze proto nazvat vena comitans nervi ischiadici, případně vena ischiadica. Na hýždi žíla pokračuje jako vena glutea inferior a po průchodu foramen ischiadicum major jako vena iliaca interna.

Femorální žíla je hypoplastická, zřetelně drénuje jen svaly přední a mediální strany stehna včetně hlavní povrchové žíly vena saphena magna a pokračuje jako vena iliaca externa. Tato hypoplastická žíla tedy doprovází hypoplastickou femorální tepnu.

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



Obraz 13-18 – Pacient č. 2: typ III sec. Pappas vlevo – VRT anteriorní, arteriální fáze, VRT posteriorní arteriální fáze, axiální sken arteriální fáze, axiální sken žilní fáze, VRT anteriorní, žilní fáze, VRT šikmá levá posteriorní, žilní fáze. Atypické cévní zásobení dolní končetiny pomocí arteria ischiadica (šipka). Žíla (vena ischiadica) sleduje tepnu (dvě šipky), a jeví se jako nevýrazná spíše červená céva.

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

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

Obdobně jako u předchozího případu (pacient č. 2) je arteria iliaca externa na postižené straně hypoplastická a pokračuje na stehno jako arteria femoralis communis. Její rozdělení na AFS a AFP je také uloženo proximálněji, zhruba o 8 mm nad úroveň horizontály proložené Y-chrupavkami. Laterální větev, nejspíše AFP, směřuje k pakloubu, pravděpodobně zásobuje měkké tkáně stehna včetně svalu quadriceps femoris a končí před kolenním kloubem na stehně. Mediální větev, AFS, zásobuje adduktorovou skupinu svalů a zejména výrazný, relativně hypertrofický musculus sartorius. S tímto svalem tepna mírně přesahuje distálně pod kolenní kloub.

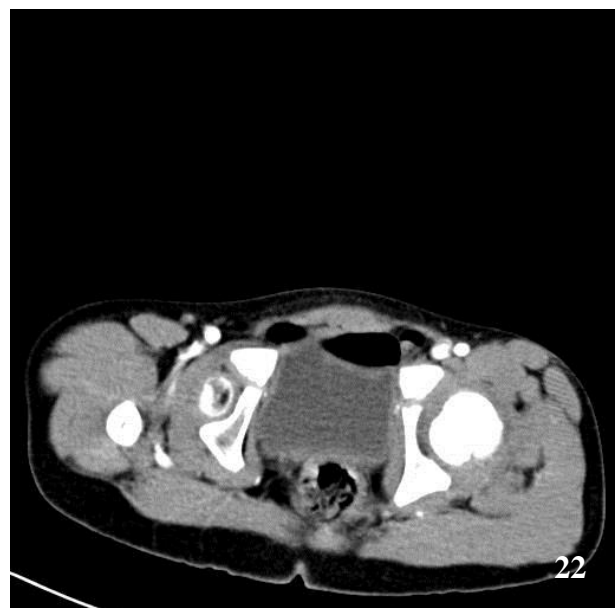
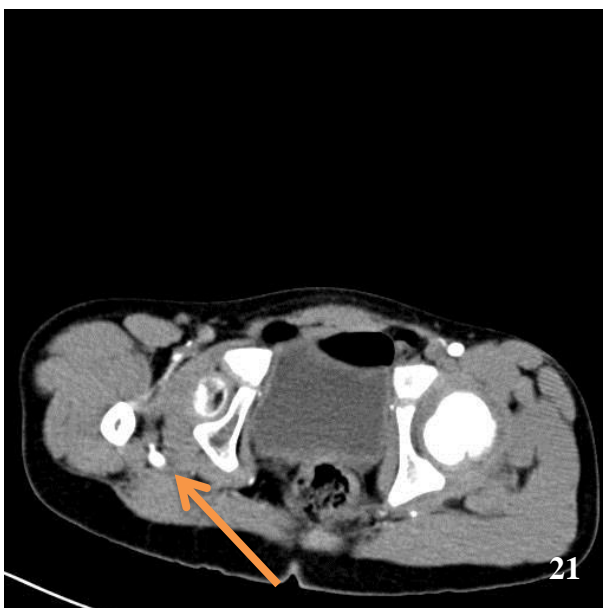
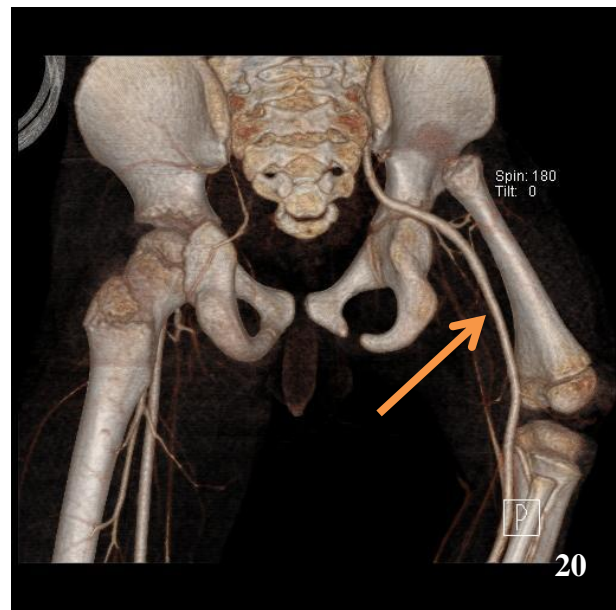
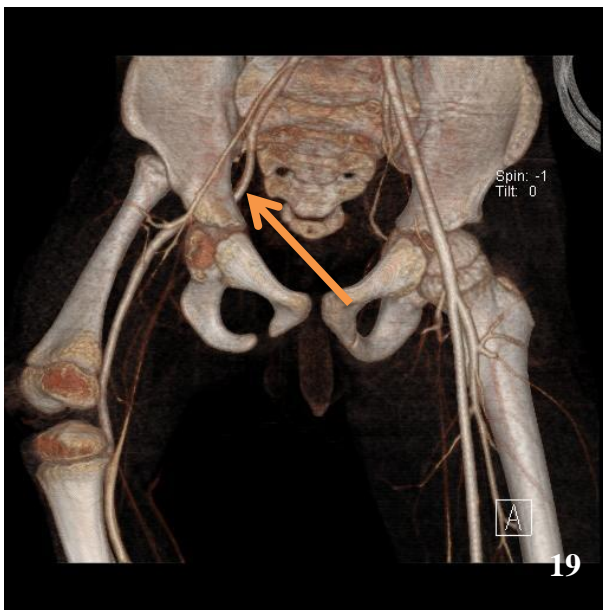
Celý zbytek postižené pravé dolní končetiny je zásoben atypicky z větve arteria iliaca interna (AII) přes arteria glutea inferior (AGI), přecházející na stehno přes foramen ischadicum major dorsálně a nacházející se posteriorně od kyčle. Následně tepna pokračuje do popliteální fossy jako arteria poplitea (AP). Na bérce se dělí na tři bérce tepny, z nichž arteria tibialis anterior a arteria tibialis posterior jsou relativně přiměřené velikosti. Velmi tenká až vlasovitá třetí tepna nejspíše odpovídá arteria fibularis. U tohoto pacienta se trifurkace nachází v proximální třetině bérce (obraz 19-24).

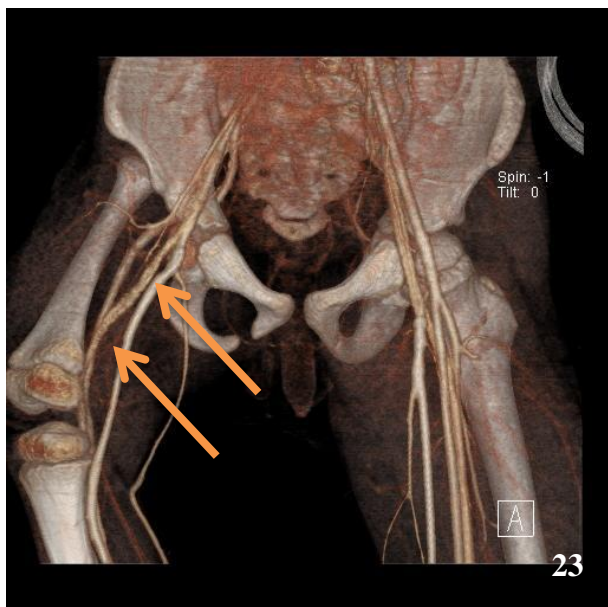
Úsek tepny na dorsální straně stehna i u tohoto pacienta doprovází nesytící se pruhovitá struktura - nervus ischiadicus, proto arterii lze rovněž označit jako arteria ischiadica. Z ní odstupuje distálněji na stehně pouze jedna významnější větev, zezadu zásobující musculus biceps femoris.

Jako v prvním případě, ani zde při CTAG vyšetření nebyly přítomny žádné zobrazitelné anastomózy.

Průběh žil se liší od pacienta č. 2, neboť v celém průběhu na stehně žádná výrazná žíla dorsálně uhýbající tepnu arteria ischiadica nedoprovází. Arteria poplitea je sledována popliteální žílou, jež však pokračuje adduktorovým kanálem jako vena femoralis, sbírá krev z vena saphena magna a dále běží pánví jako vena iliaca externa. Tím si tato žíla zachovává stejný průběh jako na nepostřižené kontralaterální končetině.

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





Obraz 19-24 – Pacient č. 3: typ III sec. Pappas vpravo – CTAG arteriální fáze, VRT anteriorní, VRT posteriorní, axiální sken arteriální fáze, CTAG žilní fáze axiální sken, VRT anteriorní, VRT posteriorní. Atypické cévní zásobení dolní končetiny pomocí arteria ischiadica (šipka). Žíla (vena femoralis) má normální průběh (dvě šipky)

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

4.1.3. Radiční zátěž u vyšetřovaných pacientů s PFFD

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

Aby bylo možné porovnat pacienty s relativně velkým věkovým rozptylem (1-20 let), nemocní byli rozděleni do čtyř skupin podle věku dosaženého v době vyšetření – 1-4 let, 5-9 let, 10-14 let a nad 15 let. Pacienti nad 15 let měli dávky počítány již jako kategorie dospělí. Efektivní dávka byla vypočtena u RTG snímků samostatně pro RTG pánve a samostatně pro RTG femuru. Efektivní dávka z CT vyšetření byla stanovena na základě údaje součinu dávky a délky (DLP) uvedeného v protokolu o vyšetření a konverzních koeficientů pro tkáňové

váhové faktory. Parametry skiagrafického a CT vyšetření a stanovené hodnoty efektivní dávky jsou shrnuty níže (tabulka 6 a tabulka 7).

		Efektivní dávka (mSv)			
		Pánev		femur	
věk (rok)	počet	průměr	SD	Průměr	SD
1-4	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 6 – Efektivní dávka pro expozici jednoho RTG snímku, rozděleno podle věku do čtyř kategorií

		Efektivní dávka (mSv)		Nastavení CT			Naměřené hodnoty			
věk (rok)	počet	průměr	SD	kV	mAs	SD (mAs)	CTDI _{vol} (mGy)	SD (CTDI)	DLP (mGy.cm)	SD (DLP)
1-4	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 7 – Efektivní dávka záření pro CT vyšetření jedním skenem (jednou helikálou), rozděleno podle věku do čtyř kategorií

4.1.4. Histologické změny u pacientů s PFFD

U pacientů č. 1, 7, 8 (tabulka 2) převažovaly struktury chrupavkové tkáně plynule přecházející ve tkáň vazivovou. Mezibuněčná hmota měla všechny rysy hyalinní chrupavky, avšak buňky neměly typické znaky lakunárních buněk, neboť chyběly charakteristické lakunární prostory v jejich okolí. 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, jak tomu bývá i v

epifyzárních chrupavkách nedonošených potracených dětí kolem 22. týdne těhotenství. Tvorbu kosti se podařilo prokázat pouze v drobných okrscích uvnitř masy chrupavky, kde byly zaznamenány ostrůvky cévnaté vazivové tkáně imponující jako základ osifikujícího centra. Po obvodu tohoto centra byly patrné náznaky mineralizace chrupavky a formování chondrocytů v neúplné sloupce. V jejich těsném sousedství byly novotvořené trámce kosti, které však byly orientovány příčně na rozdíl od klasických osifikačních center.

V jiném případě (pacient č. 3) byla větší resekovaná část tvořena převážně kostí, která na některých místech v periferních oblastech přecházela v méně vyzrálou chrupavčitou tkáň. Kostní tkáň měla převážně lamelární úpravu. Na povrchu kostních trámců byly zřetelné osteoblastické lemy, sestávající z kubických osteoblastů s nápadnou eozinofilní cytoplazmou. Osteocyty nevykazovaly žádné změny, jejich lakuny byly přiměřeně velké.

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. Někde byl přechod kostní tkáně v rezidua chrupavky zcela plynulý, kdy chondrocyty samostatně přežívaly v mezibuněčné hmotě kostního typu. 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. Distribuce cév byla v některých oblastech zcela nepravidelná event. síťovitě zmnožená.

Konečně v jednom případě (pacient č. 19 podle tabulky 2) byla zachycena pouze spongiózní kost převážně lamelární úpravy s okolní tkání vazivovou, kde nebylo možno identifikovat žádné podstatné odchylky od normy. Spojení s okolními strukturami však nebylo možno posoudit.

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 v kontrolní skupině

4.2.1.1. Kloubní chrupavka nezměněná osteoartrózou

Ve všech vrstvách chrupavkového krytu byl zaznamenán určitý počet S-100 protein pozitivních chondrocytů. Přibližně 20% chondrocytů povrchové vrstvy kloubní chrupavky vykazovalo pozitivitu alfa aktinu hladké svaloviny. Většinou se jednalo o drobné větvenité elementy orientované dlouhou osou paralelně s kloubním povrchem. V hlubších vrstvách byly alfa aktin pozitivní chondrocyty zaznamenány pouze výjimečně a je možno říci, že jejich distribuce byla zcela nepravidelná. Dolní vrstva chrupavky byla kalcifikována a nasedala na kostní plató, s nímž byla pevně spojena.

4.2.1.2. Kloubní chrupavka od pacientů s osteoartrózou

Ve všech případech byly degenerativní změny zřetelně vyjádřeny ve formě fibrilace či fragmentace povrchových částí chrupavky a jejího nápadného ztenčení. V oblastech s defektem původního chrupavkového krytu byly celé oblasti tvořeny vazivovou chrupavčitou tkání s hojným výskytem aktin pozitivních buněk. Někde bylo patrné tzv. klonální seskupování chondrocytů, které byly zřetelně pozitivní v reakci k průkazu alfa aktinu hladké svaloviny při zachované pozitivitě S-100 proteinu. V okřscích se zachovanou normální strukturou se aktin pozitivní chondrocyty vyskytovaly v podstatně menší míře a jejich distribuce byla zcela nepravidelná.

4.2.2. Nálezy u pacientů s transplantací autologních chondrocytů

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

V obou skupinách byly vyšetřeny vzorky reziduální kloubní chrupavky odebrané ze spodiny kloubního defektu. V některých vzorcích byly zastiženy zbytky původní hyalinní chrupavky. Spodina defektu sestávala v těchto případech 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 vyskytujících se u osteoartrózy. V takovýchto případech byla

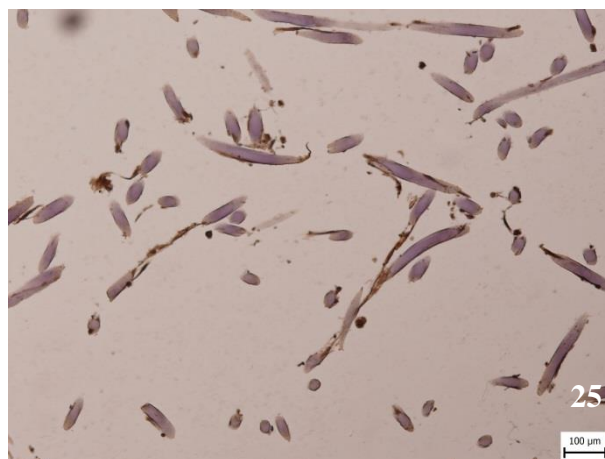
zaznamenána povrchová fibrilace a fragmentace kloubní chrupavky, ve které se nacházely i známky tzv. klonálního seskupování chondrocytů v drobné uzlovité formace.

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.

4.2.2.2. Histologická struktura skafoldů použitých při transplantaci

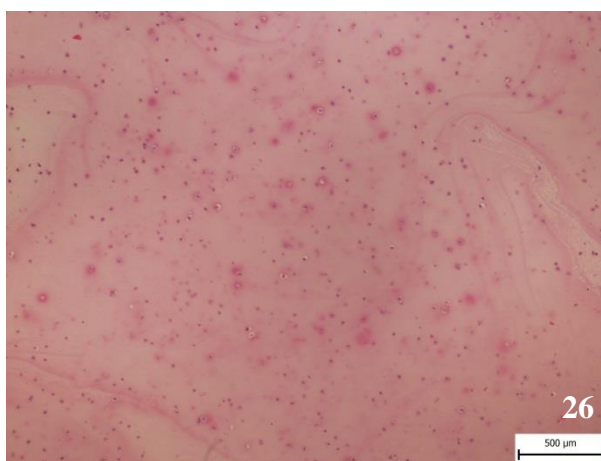
Histologické vyšetření obou typů skafoldů použitých při transplantaci ukázalo zřetelné rozdíly v jejich složení, a to jak z hlediska charakteru buněčné komponenty, tak i pokud se jedná o strukturální charakteristiky nosiče.

Hyalograft C sestával z fibrilární sítě biomateriálu vytvořeného z esteru hyaluronové kyseliny (obraz 25). 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 aktinu buňky hladké svaloviny, fibroblasty a myofibroblasty a byly negativní v reakcích k průkazu různých isoform S-100 proteinu. Zdá se tedy, 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 z ne zcela jasných důvodů. Určitou roli pravděpodobně sehrála delší doba fixace nebo určité narušení během operačního výkonu, kdy materiál byl ještě mimo fixační tekutinu.



Obraz 25 – Hyalograft C s pozitivitou alfa-smooth muscle actinu v málo diferencovaných buňkách skafoldu s rysy myofibroblastů. Zvětšení 100x

Chondrograft NTC Brno byl tvořen nosičem sestávajícím z vláken fibrinu a relativně pravidelně distribuovaných kulatých buněk (obraz 26), 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 isoformů S-100 proteinu. Nejintenzivnější imunohistochemická reakce byla zaznamenána při použití protilátky S-100 A6 proteinu. Proliferační index byl dosti vysoký, pohyboval se kolem 5% při použití protilátky proti Ki67.



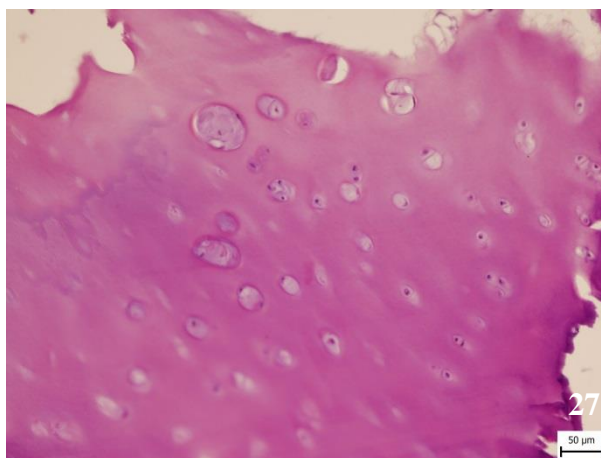
Obraz 26 – Chondrograft NTC, FN Brno - Bohunice s relativně diferencovanými chondrocyty, připomínajícími lakunární buňky hyalinní chrupavky. HE 40x zvětšení

4.2.2.3. 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 (obraz 27). Distribuce chondrocytů v nové chrupavce byla vcelku rovnoměrně pravidelná. 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 náález svědčil pro neúplnou zralost nově tvořeného chrupavkového krytu.

Nově vytvořená chrupavka obsahovala značné množství proteoglykanů, jak bylo možné verifikovat při barvení alcianovou 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

sestavající z hyalinní chrupavky se svojí strukturou nelišily od normální chrupavkové tkáně tohoto typu.



Obraz 27 – Relativně diferencovaná hyalinní chrupavka 10 měsíců po transplantaci Hyalograftu C s přítomností četných lakunárních chondrocytů. HE 200x zvětšení

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 cytoplasmě alfa aktin hladké svaloviny a byla S-100 protein pozitivní. Všechny ostatní imunohistochemické reakce, jako reakce k průkazu CD34, desminu a svalového specifického aktinu vyzněly negativně.

Ve dvou případech byl zaznamenán neobvyklý nález reprezentovaný fokální akumulací makrofágů s nápadně modře se barvící cytoplazmou, které byly pozorovány jak mezi buňkami nově vytvořené chrupavky, tak i v intertraberkulárních prostorách subchondrální kosti. Domníváme se, že makrofágy obsahovaly ve své cytoplasmě 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 alcianovou modří.

Nálezy po transplantaci Chondrograftu NTC byly verifikovány u všech pacientů při vyšetření bioptických vzorků odebraných během druhého artroskopického vyšetření. V

průměru se chrupavka jevila o něco více vyžralá 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.

4.2.2.4. 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.

4.2.3. Přehled současných zobrazovacích metod při diagnostice defektů kloubní chrupavky

Vyšetření kolenního kloubu pomocí radiodiagnostických zobrazovacích metod lze zajistit více způsoby. Základním vyšetřením je RTG snímek v AP a bočné projekci. Na tomto snímku se dobře zobrazí anatomické postavení skeletu kolenního kloubu, šíře kloubní štěrbiny i subchondrální kostní změny, zejména sklerotizace či reaktivní pseudocysty. 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 postižení 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 a neumožňuje ukázat reaktivní změny uvnitř skeletu. 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 klouby 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.

4.2.4. Nálezy defektů chrupavky zachycené na MR obrazech

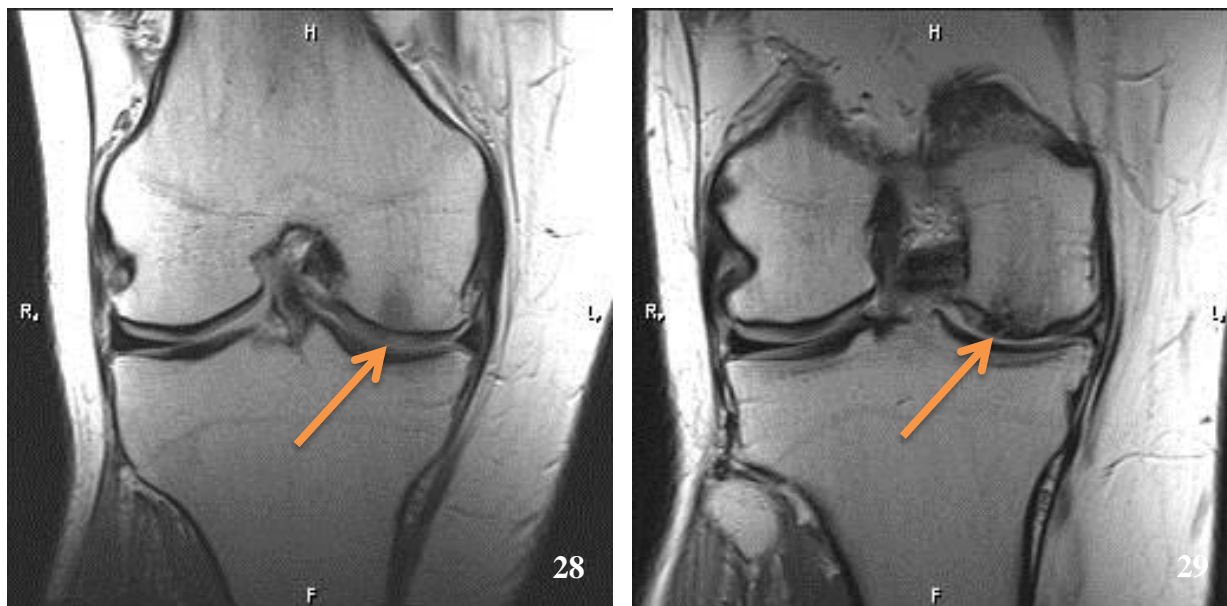
Dvě třetiny defektů chrupavky byly u našich pacientů na mediálním kondylu femuru, jedna třetina na jeho laterálním kondylu. Defekt se projevuje na PD a zejména na T2 trufi3d sekvenci jako proužek vyššího signálu – světlejší na snímku – než okolní nepostižená chrupavka. Výška chrupavky v místě defektu bývá buď snižená nebo dokonce chrupavka zcela mizí. Při vymizení chrupavky se objevuje subchondrálně reaktivní kostní edém, který ukazuje na sekvencích se saturací tuku zvýšení signálu v skeletu (obraz 28).

Po autogenní transplantaci vykultivované chrupavky se nachází na MR obrazech signálový obraz podobný jizevnaté tkáni případně i s obrazem struktur subchondrální kosti. Obraz transplantátu je bez signálových změn ukazujících prosáknutí vodou. Tento nálezy do jisté míry odpovídá histologické struktuře transplantátu, kde chondrocyty jsou uloženy v matrix fibrilární síti esteru kyseliny hyaluronové, případně mezi vlákna 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 (obraz 29).

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 projevily přístřehy 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 vaz. 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.



Obraz 28, 29 – MR koronární sken kolene, PD sekvence. Na mediálním kondylu femuru se nachází reaktivní sklerotizace subchondrálně při chondromalacii chrupavky (šipka), která se zobrazuje lehce vyšším signálem. Vyšetřeno před transplantací. Na kontrole po 4 letech od transplantace je patrný typický nález transplantátu dobře umístěný v místě chondromalacie (šipka).

5. Diskuse

5.1. PFFD

Sestavy pacientů s PFFD publikované ve světovém písemnictví zahrnují několik desítek pozorování - Gillespie referoval o 69 pacientech, Hillmann sledoval 49 a Lange 42 pacientů (Gillespie R., 1998, Hillmann J.S. et al, 1987, Lange D.R. et al., 1978). Podle nám dostupných informací je náš soubor 21 pacientů podle četnosti na čtvrtém místě.

5.1.1. Klinický nálezn 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 (Dungl P. et al., 2005). Končetina je v abdukci, zevní rotaci a flexi v kyčli. Koleno bývá ve flexi, dokonce lze najít kontraktury jak v kolenu, tak v postiženém kyčli. Často je patrné chybění fibulárního paprsku nohy, chodidlo je ve valgózním postavení. Klinickým vyšetřením kolena lze určit předozadní nestabilitu, teleskopickým manévrem pak nestabilitu v oblasti kyčelního kloubu (Taylor B.C., 2009).

Dítě se většinou vyvíjí uspokojivě, začíná se stavět v normální době, ale pro defekt končetiny není schopno chůze. Naučí-li se chodit spontánně při velkém rozdílu délek končetin, má chůze často bizarní charakter (Murray R.O. et al., 2008). V našich podmínkách jsou děti již od prvního roku věku opatřeny ortoprotézou. 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. Nestabilita proximálního konce femuru ztěžuje protetické ošetření a lokomoci pacientů, trýznivé útrapy působí úporné pyodermie z trvalého nošení protézy při teleskopickém pohybu končetiny (Dungl P. et al., 2005). 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. I zde může docházet k opožděné osifikaci jádérka hlavice femuru. Dolní končetina může být

zkrácená. Většinou však délka diafýzy femuru bývá normální, fyziologická (Hillmann J.S. et al., 1987).

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 (Maldjian C. et al., 2007).

Kongenitálně zkrácený femur je samostatná jednotka, kdy sice mohou být přítomna coxa vara, ale nelze zde najít abnormality v oblasti acetabula, hlavice či krčku femuru (Westberry D.E. et al., 2009).

Meningokoková sepse 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 krček. Dochází ke zkrácení kyčle. Vzhledem k tomu, že sepse postihuje celý organismus, jsou septické emboly a jejich projevy patrné i jinde v organismu, často i v jiných orgánech (Manaster B.J. et al., 2010).

5.1.3. Terapie

Management PFFD potřebuje vždy multidisciplinární tým složený z pediatra, ortopeda, protetika a fyzioterapeuta. Cílem terapie PFFD je kompenzace funkčního deficitu. Vzhledem k tomu, že PFFD představuje široké spektrum vývojových poruch femuru, je i terapie u každého jednotlivého případu odlišná. Ke každému pacientovi je proto nezbytný přísně individuální přístup. Případné kosmetické hledisko je možné řešit až ve druhé době, ne vždy se však dosáhne zcela uspokojivých výsledků.

Na prvním místě musí terapie řešit zkrácenou délku femuru. Méně zřetelné, avšak stejně důležité je i zajištění uspokojivé funkce kyčle. Kyčel bývá obvykle flektována a zevně rotována, koleno zůstává flektované, postižená noha se tak dostává před osu těla. U většiny PFFD je různým způsobem postižena muskulatura kyčle. Tyto propozice vedou k přesunu těžiště na nepostiženou stranu a stojí na jedné noze (Panting A.L., Williams P.F., 1978). Koleno pod defektem mívá variabilní nestabilitu. Samotná noha varíruje ve své funkci podle doprovodných deficiencí v oblasti bérce a nohy.

Konzervativní léčba spočívá v protetické péči. Zkraty do 5-7 cm je možno řešit úpravou obuvi, větší zkraty ortézou s vloženou botou, ortoprotézou. Jelikož zkrat může dosáhnout v dospělosti i více než 40 cm a proximální stabilita končetiny daná funkčním kyčelním kloubem chybí, slouží jako proximální opora kost sedací (Bochmann D., 1980).

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 prodloužení, která má však také svá specifika. Vždy je nutné posoudit relativní zkrat proti zdravé končetině a možnost prodloužení končetiny. Obvykle nelze provést delší elongaci než 20 cm (Griffith S.I., 2006), ačkoliv Dungl uvádí až 40 cm (Dunzl P. et al., 2005). Většinou se prodloužení provádí metodami dle Ilizarova u vyšších typů sec. Pappas – typ IV – IX. (Aston W.J. et al., 2009, Grill F., Dunzl P., 1991, Herzenberg J.E. et al., 2010). Současně se na nepostižené končetině musí vhodně naplánovat její relativní zkrácení, které se provádí epifyzeodézou.

Kortikotomie se provádí v distální třetině femuru, protože v proximální třetině diafýzy bývá kortikalis skleroticky změněná. Hlavice, která je u většiny typů vhodných k prodloužení hypoplastická, je většinou v retroverzi a spolu s hypoplazií acetabula může vést k zadní luxaci. Koleno bývá v důsledku aplazie zkřížených vazů nestabilní a během prodloužení může rovněž subluzovat. Jsou-li současně přítomna coxa vara jako u typu VII, je prvním krokem v terapii valgizační osteotomie (Goddard N.J. et al., 1995).

Pokud se nachází epifýza hlavice v hypoplastickém acetabulu, které bývá strmé, bývá prvním krokem v terapii Salterova osteotomie pánve. Ta v případě současného nálezu s coxa vara je upřednostňována. 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 (Hall J.E., Bochmann D., 1969).

U typů s defektním pakloubem 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. Ve 30. letech dvacátého století byla navržena Van Nessel tzv. rotační plastika, která našla své příznivce v onkologické ortopedii po resekci nádorů v oblasti kolena (Van Ness C.P., 1950). Po provedené rotační plastice se hlezno obrátí o 180° a funguje jako kolenní kloub, který se většinou fixuje artrodézou (Kritter A.E., 1977). Ačkoliv jsou výsledky s rotační plastikou uspokojivé, nevýhodou je velmi neobvyklý vzhled končetiny, prsty nohy je nutné odstranit pro lepší uchycení protézy. Z tohoto důvodu však u pacienta klesá vnímání pozice dolní končetiny.

U kongenitálního pakloubu femuru se rotační plastika docílí artrodézou mezi zbytkem femuru a pánví. Končetina se rotuje o 180° tak, aby koleno sloužilo jako kyčel a hlezno jako koleno. Dnes se tato metoda v obdobné podobě nazývá „knee for hip“ operací, někdy také

jako King II. Funkční výsledky jsou přijatelné, kosmeticky nepřijatelný je bizarní vzhled končetiny. Operace není příliš rozšířena, nejvhodnější je na typ I případně II sec. Pappas (Steel H.H. et al., 1987, King R.E., 1973, Aitken G.T., 1959, Alman B.A. et al., 1995).

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 (Kostuik J.P. et al. 1975, King R.E., 1965).

Terapeutický postup, který trvá s přestávkami celé dětství a je rozdělen na jednotlivé kroky, lze shrnout v šesti etapách (tabulka 8).

Etapa	Výkon
1.	Diagnóza, ve 3 letech věku longitudinální distrakce unilaterálním pelvifemorálním fixátorem
2.	Resekce pakloubu, napojení hlavice na diafýzu
3.	Postupná prolongace rámovým zevním fixátorem v systému pelvifemorální distrakce se stabilizací kyčelního kloubu
4.	Korekční výkony na bérce, prolongace bérce, subtalární déza
5.	Kontralaterální trvalá epifyzeodéza, finální prolongace postižené končetiny
6.	Odstranění jizev, plastické výkony

Tabulka 8 – Rozdělení léčby pacientů s PFFD do šesti etap

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 resekce 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, jako valgózní hlezno supramaleolární osteotomií, prodlužuje se bérec asi o 20 % délky a stabilizuje se noha event. subtalární dézou (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).

Typy I, V a VI jsou velmi vzácné a vyžadují individuální řešení podle nálezu (Gillespie R., 1998, Goddard N.J., 1995).

Někdy je nutné pro lepší uchycení a používání protézy částečně amputovat nohu (Panting A.L., Williams P.F., 1978). Amputace mohou být podkolenní a nadkolenní. 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 (Epps C.H., 1983). Současně nižší věk dítěte umožní lepší adaptibilitu na nastalou situaci nejen na úrovni pohybové, ale také psychologické.

V případech podkolenní amputace se provádí buď dysartikulace v hleznu nebo častěji amputace nohy se zachováním části či celého kalkanea, který je fúzován k distální epifyze tibie. Takto vytvořený segment je stabilní a s dobře rekonstruovanou patou z měkkých tkání umožňuje uspokojivé použití protézy (Richardson E.G., Rambach B.E., 1979).

Artrodéza kolena může v některých případech posílit stabilitu končetiny. Zejména pokud je koleno hypoplastické a nestabilní, náhrada kolenního kloubu protézou umožní lepší funkci dolní končetiny (Bevan-Thomas W.H., Millar E.A., 1967).

Jak jsme již uvedli v úvodní kapitole, hojné písemnictví, věnované problematice PFFD, se zabývá téměř výlučně charakteristikou skeletálních struktur (Goldman A.B. et al., 1978). Studie, všímající si i změn měkkých tkání jsou ojedinělé (Pirani S. et al., 1991) a týkají se okolních svalových skupin. Sami jsme jako první ve světovém písemnictví zaznamenali u svých dvou nemocných abnormální vaskularizaci v postižené oblasti (Horák M. et al., 2007, Horák M. et al., 2008, Chomiak J. et al., 2009). V diskusi se proto podrobněji věnujeme této problematice.

5.1.4. Cévní zásobení a jeho anomálie

Dříve publikované sestavy nevěnují žádnou pozornost případným cévním anomáliím (Goldman A.B. et al., 1978). Pokud jsou zaznamenány současné změny měkkých tkání, týkají se pouze okolních svalů (Pirani S. et al., 1991).

Naše studie jako první přináší doklad, že změny skeletu při PFFD bývají současně doprovázeny i úchyly cévního zásobení. Potvrzuje tak předpoklad komplexnosti zásahu do vývoje dolní končetiny. Diagnostikovali jsme zmenšení průměru i délky cév v porovnání s nepostiženou 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 (Aitken C). 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 (Warwick R. et al., 1973, Standring S. et al., 2005, Čihák R. et al., 1997). 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 (Warwick R. et al., 1973, Krajina A., 1999, Standring S. et al., 2005).

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 nepostižené straně a nejproximálněji lokalizovanou bifurkací AFC jsme zastihli nad úrovní tříselného vazů. U ostatních pacientů se bifurkace AFC nacházela v úrovni nepostižené 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 (Warwick R. et al., 1973).

Vysvětlení pro anomálii cévního zásobení lze hledat v ontogenezi. Všichni nižší savci mají jako hlavní tepnu zásobující dolní končetinu právě arteria ischiadica (Čihák R. et al., 1997), 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 (Standring S. et al., 2005). 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 (Anton C.G. et al., 1999, Senior H.D., 1919). 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 (Krajina A., 1999).

U dvou sledovaných pacientů (pacient č. 2 a č. 3 v tabulce č. 5) 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 končí nad kolenní štěrbinou, pouze AFS u pacienta č. 3 přesahuje pod kolenní štěrbinu v rozsahu hypertrofického musculus sartorius. Žádná z femorálních tepen, AFS ani AFP, nepokračuje na bérec a dále na nohu a hlavní cévní zásobení zajišťuje arteria ischiadica. Tento nálezní nejspíše odpovídá přetrvávání u cévního zásobení dolní končetiny v embryonálním období (Senior H.D., 1919). Embryonální cévní zásobení dolní končetiny je nejdříve zprostředkováno primitivní tepnou, tzv. axiální arterií (Warwick R. et al., 1973, Standring S. et al., 2005, Senior H.D., 1919), jež směřuje dorsálně a 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. Během 5. až 6. týdne se dělí na ventrokranální arteria epigastrica inferior a na ventromediální arteria femoralis, směřující na stehno. 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 (Warwick R. et al., 1973, Standring S. et al., 2005).

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, přetrvává 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 (Sorge G. et al., 1995). 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 (Standring S. et al., 2005). Prevalence PFFD v populaci je asi 2 případy na 100 000 obyvatel (Oppenheim W.L. et al., 1998, Standring S. et al., 2005). 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 nutné orientovat vyšetření i na možnou přítomnost 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 a zejména chirurgický přístup při jakémkoliv prováděném výkonu na proximálním femuru či kyčli (např. PA rekonstrukce nebo „knee for hip“ operace). Každý zásah chirurga vyžaduje velkou obezřetnost, aby nedošlo k narušení krevního zásobení postižené končetiny (Chomiak J. et al., 2009).

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 vyšetřeného 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. Radiační zátěž a možné alternativní postupy

Nevýhodou CTAG a vůbec vyšetřování pomocí CT je radiační zátěž. I když tato zátěž se s modernizací CT přístrojů výrazně snižuje, podstatou vyšetření zůstává použití rentgenového záření. Každá generace CT přichází s výkonnějšími detektory, s rychlejším náběrem dat, s kvalitnějšími rekonstrukčními algoritmy (nově iterativní rekonstrukce), s různými prvky zamezujícími neefektivnímu přezářování a s dalšími inovativními postupy včetně optimalizace softwarů. Přes všechna tato vylepšení však nutno velmi pečlivě zvažovat indikaci k tomuto vyšetření. Podle našeho názoru přínos informací z CT včetně CTAG vyšetření převyšuje doprovodnou radiační zátěž. Přesné prostorové posouzení PFFD změn i informace o stavu cévního řečiště umožňují najít pro každého pacienta nejvhodnější terapeutickou metodu. Při běžném postupu u každého pacienta velké množství kontrolních RTG snímků získaných před zahájením terapie a v jejím průběhu představuje také nezanedbatelnou radiační zátěž. Pokud před začátkem léčby se místo několika RTG snímků provede CT vyšetření, radiační zátěž je vyšší zhruba 10x, ale informační hodnota CT vyšetření může být ještě daleko vyšší. Svědčí pro to náš průkaz přítomnosti drobné osifikované epifýzy hlavice v acetabulu při CT vyšetření, kterou v různých projekcích opakované RTG snímky nedokázaly rozpoznat (pacient č. 4). V tomto případě však nebylo možné plánovanou operaci pozměnit, neboť epifýza hlavice byla k acetabulu pevně fixovaná kostním můstkem. Lze však předpokládat, že při podobném nález u pacientů s volně mobilní epifýzou se operační postup naplánovaný pouze na základě RTG obrazu po upřesňujícím CT vyšetření může přiměřeně modifikovat.

Určitou nevýhodou CT může být horší zobrazení nervových struktur. Silné nervy, jako je nervus ischiadicus, se jeví jako nesyťící se pruh probíhající v kanálu mezi svaly. Pečlivým hodnocením na tenkých řezech je však možné nerv a jeho průběh správně identifikovat.

Alternativou k CTAG vyšetření pro eliminaci radiační 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. Dostatečně nezobrazuje cévní větvení, což má zásadní důležitost pro stanovení operačního postupu. 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. Naopak výhodou UZ vyšetření je možnost sledování kyčelního kloubu během jeho pasivního pohybu, kdy je někdy možné posoudit pohyblivost epifýzy hlavice femuru proti acetabulu a její pohyblivost odlišit od pružnosti měkkých tkání v pakloubu kyčle (Oh K.Y. et al., 2008). 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. Kovové artefakty velmi znehodnocují obraz v blízkém okolí a i malá cévní svorka může znehodnotit objem tkáně v okruhu až 10 cm. Předchozí použití různých šroubů či dlah zcela znemožňuje vyšetření této oblasti. MR vyšetření se může použít jen na začátku vyšetřovacího algoritmu jako alternativa CT vyšetření (Manaster B.J. et al., 2010, Laor T., Burrows P.E, 1998). V této době však ještě nelze jednoznačně určit, zda informace z MR vyšetření budou dostačující pro směřování dalšího terapeutického postupu. Někteří autoři přesto o této variantě uvažují a doporučují ji jako přesnější vyšetřovací metodu k určení správné klasifikace PFFD (Bernaerts A. et al., 2006, Maldjian C. et al., 2007).

Maldjian kromě přítomnosti chrupavčité tkáně sledoval i napojení epifýzy hlavice se zbytkem femuru a u jednoho pacienta popsál v tomto místě existenci pruhu fibrózní tkáně.

Pomocí MR reklasifikoval 6 z 9 pacientů s PFFD podle klasifikace Aitken (Maldjian C. et al., 2007). Podobně Bernaerts po vyšetření MR reklasifikoval pacienta s původním zařazením Aitken D na Aitken C (Bernaerts A. et al., 2006).

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) odpovídalo zhruba 60-100 jednotlivým expozicím při RTG snímování. Proti době, kdy byla u našich pacientů tato vyšetření pořízena (rok 2005-2008), došlo v současnosti k radikálním změnám v CT protokolech. Zejména nové přístroje umožňují novými technikami, většími detektory, rychlejším náběrem a kvalitnější prediktivní modulací záření dosáhnout výrazně lepších výsledků, než jakých jsme dosáhli před několika lety. 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 1 s. U dlouhých akvizic zabírajících obě dolní končetiny a pánev má náběr dat trvání 2-3 s. Pro porovnání uvádíme trvání akvizice u starších přístrojů, kdy krátký náběr trval 5-7 s a náběr dolních končetin s pávní vyžadoval 12-15 s v závislosti na velikosti a stáří pacienta. Je zřejmé, že zkrácení doby záření redukuje množství záření přijaté vyšetřovanou oblastí.

Současným snížením voltáže na 80-100 kV a nastavením iterativních algoritmů pro rekonstrukci obrazu z hrubých dat lze snížit dávku na 1 mSv u pacientů nad 15 let a na 1,5 mSv u pacientů mladších 15 let. Iterativní rekonstrukční algoritmy fungují na podkladě opakované filtrace šumu z podzářených hrubých dat s vyšším podílem šumu. 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 (Kozubíková P., Horák M., 2011).

Ze zjištěných informací lze usuzovat, že dávka obdržená při CT vyšetření se během osmi let (počítáno od roku 2005) snížila o 50-80 %. Tedy je možné konstatovat, že v roce 2014 by jedno CTAG vyšetření u dětí dávkou odpovídalo ekvivalentu 20-40 jednotlivým expozicím 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 nezralého typu, jaká se vyskytuje v epifýzách dlouhých kostí v prenatálním období. Vytrávání v lakunární buňky, jak tomu bývá v epifyzárních centrech, bylo vyznačeno jen v minimální míře stejně jako formování chondrocytů ve sloupci a mineralizace chondroidní matrix. Uspořádání cév v místě resorpce chrupavky rovněž působilo chaotickým dojmem. Nově vytvořené kostní trámce nebyly orientovány v dlouhé ose, nýbrž napříč po obvodu vnitřní plochy chrupavky, jak tomu bývá u některých osteodysplazií. Chrupavčitá tkáň vykazovala některé znaky embryonální chrupavky a navíc chondrocyty vůbec neexprimovaly S-100 protein.

Tyto skutečnosti ukazují, že nezralost 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. V některých oblastech probíhající osifikace, ale i v místech, kde k osifikaci vůbec nedošlo, jsme pozorovali zmnožení krevních kapilár. Pokud však nejsou k dispozici větší topograficky dostatečně přehledné tkáňové vzorky, nelze význam tohoto fenoménu blíže posoudit.

Negativní výsledek pátrání v tkáních z místa defektu po případných reziduích nekrózy nenasvědčuje 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. Kim sledoval vývoj změn po chirurgicky vyvolané ischemii v oblasti sekundárního osifikačního centra hlavice femuru u prasat. Zjistil, že tzv. růstová ploténka v okolí tohoto centra propadla nekróze a proces osifikace se zcela zastavil. Novotvorba spongiózní kosti byla přerušena a osifikační centrum bylo v rámci reparativních pochodů zresorbováno, došlo však k novotvorbě dalšího méně vyvinutého centra v sousedství (Kim H.K. et al., 2004). Podobná drobná osifikační centra byla identifikována v chrupavčité komponentě vyšetřovaných lézí i u našich pacientů. Navíc byly přítomny změny, jaké se vyskytují u některých osteodysplazií jako je chondrodystrophia fetalis neboli achondroplazie, a to nález napříč orientovaných nových kostních trámců. Pravděpodobně podobný fenomén popsal Boden při histologické studii identické léze u fetů starých 21 týdnů. Zaznamenal u nich poruchu organizace proliferujících chondrocytů do

podélných sloupců a abnormální septální architekturu hypertrofické zóny chondrocytů. Novotvořené primární kostní trabekuly měly plástvovitý charakter a postrádaly obvyklé paralelní uspořádání (Boden S.D. et al., 1989).

Ischemické poškození epifyzy hlavičky 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 (Kim H.K. et al., 2004). 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 (Povýšil C. et al., 2008). 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 (Povýšil C. et al., 2008). Mezi tyto stimuly patří například mechanický tlak. Zatím jsou mechanismy regulující expresi aktinu a ostatních cytoskeletálních proteinů v chondrocytech nedostatečně prozkoumány. Je známo, že strukturální charakteristiky chondrocytů a složení mezibuněčné hmoty se liší v závislosti na vzdálenosti jednotlivých vrstev od povrchu chrupavky. Fenotyp chondrocytů se různí podle jednotlivých zón a předpokládá se, že složení v jednotlivých zónách chrupavčitého typu je stabilní (Coates E.E, Fischer J.E., 2010). Rozdíly v organizaci mezibuněčné hmoty a jejím složením jsou dány odlišnostmi v aktivitě chondrocytů jednotlivých vrstev (Aydelotte M.B., Coates E.E, Fischer J.E., 2010). Buňky jednotlivých zón se také liší svojí morfologií, denzitou a metabolickou aktivitou. Buňky povrchové vrstvy mají charakter drobných tenkých vřetenitých elementů orientovaných paralelně s kloubním povrchem. Část z nich exprimuje alfa aktin hladké svaloviny, jak bylo prokázáno již dříve (Povýšil C. et al., 1997 a 2008) a produkují glykoproteiny, proteoglykany, které jsou součástí synoviální tekutiny. Větší chrupavkové buňky nacházející se v hlubších vrstvách a orientované kolmo k povrchu zajišťují ukotvení a fixaci ke kalcifikované chrupavčité zóně. Chondrocyty různých vrstev kloubní chrupavky nepochybně secernují různé proteiny, avšak jejich význam a funkční určení nejsou zatím dostatečně známy (Coates E.E., Fischer J.E., 2010).

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 provenience tvořený autologními chondrocyty vypěstovanými na 3D nosiči tvořeném HYAFF11 (Brun P. et al., 1999, Girotto D. et al., 2003, Grigolo B. et al., 2002, Hollander A.P. et al., 2006, Tognana E. et al., 2007), což je benzyl ester 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 (Girotto D. et al., 2003, Hollander A.P. et al., 2003), 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 diferenciaci nedosáhla úroveň nativních chondrocytů. Buňky kultivované na vláknech Hyalograftu 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 diferenciaci směrem k chondrocytům. Naproti tomu buňky Chondrograftu NTC 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 vyzrálější a tvořená převážně lakunárními buňkami.

Na základě výsledků předchozích prací publikovaných v literatuře (Girroto D. et al., 2003, Grigolo B. et al., 2002, Hollander A.P. et al., 2003, Podškubka A. et al., 2006) bylo známo, že chrupavka vznikající po transplantaci Hyalograftu C vyzrává kolem 11 měsíce. Podobné výsledky byly dosaženy u pacientů po transplantaci brněnského chondrograftu.

5.2.3. Role S-100 proteinu v identifikaci chondrocytů

V obou skupinách pacientů s transplantovanými autologními chondrocyty nově vytvořená chrupavka měla zčásti hyalinní a zčásti vazivový charakter. Distribuce chondrocytů v novém chrupavčitém krytu byla dosti nepravidelná. Všechny chondrocyty byly vitální se zřetelnými jádry. Kolumnární uspořádání chondrocytů v dolní vrstvě bylo nepravidelné nebo chybělo, což svědčilo pro neúplnou vyzrálост nové kloubní chrupavky. Také zóna kalcifikované chrupavky stejně jako subchondrální kostní tkáň byly rovněž nepravidelně vytvořeny. V subchondrální kosti byly pozorovány i známky remodelace, pro kterou svědčila přítomnost osteoklastů a osteoblastů na povrchu kostních trámců o nelamelární struktuře.

Identifikace chondroidních struktur v tkáních je založena na přítomnosti charakteristických histologických znaků chondrocytů uložených v lakunárních prostorách a také na určení charakteru mezibuněčné hmoty bohaté na kyselé mukopolysacharidy a kolagen II. Zcela specifický imunohistochemický marker pro identifikaci chondrocytů event. chondroblastů s výjimkou relativní specifity S-100 proteinu neexistuje. To platí pro oba typy chrupavky, vyskytující se v oblasti zdravé i poškozené chrupavkové tkáně kloubů. S-100 protein je polyklonální protilátka, která je kromě melanocytárních lézí kůže, neuroektodermových nádorů a myoepitelií většinou využívána při identifikaci chondrocytů, ať už nádorového nebo nenádorového původu (Dabbs D. et al., 2006). Jak uvádí sám výrobce, S-100 protein navíc reaguje s lipocyty, s retikulárními buňkami lymfatických uzlin a s

buňkami gliovými. Vzhledem k existenci několika charakteristických morfologických rysů není problém v afekcích jednostranně chondroidně diferencovaných správně rozpoznat nenádorovou i nádorovou chrupavčitou tkáň, a to i v případech, kdy buňky jsou méně diferencované a nevykazují pozitivitu S-100 proteinu, jak je tomu např. v embryonální chrupavce. Přítomnost S-100 proteinu v pozitivních buňkách svědčí obvykle pro příměs chrupavčité komponenty v některých nádorech osteogenního původu, jako je osteosarkom. S-100 protein pozitivní buňky typu osteocytů však byly přítomny i v malých skupinách nebo samostatně v nově vytvořených kostních trámčích, především u lézí reaktivního původu, tj. u reaktivní osifikující periostitidy, v místech metaplastické osifikace, u osifikující myozitidy a v místech svalku (Povýšil C. et al., 2008). V dvojité barvených preparátech bylo možno ověřit, že tyto buňky reagují také s osteokalcinem. Tím se, kromě odlišného tvaru, lišily od S-100 proteinu pozitivních chondrocytů, nacházejících se v ostrůvcích chrupavčité tkáně. Tyto ostrůvky někdy tvořily součást nově vzniklých kostních trámčů a odpovídaly reziduím neosifikované tkáně chrupavky. Ke správné identifikaci chondrocytů perzistujících v kostních trámčích do značné míry přispěla i přítomnost mezibuněčné chrupavkové hmoty. Méně často byla zaznamenána přítomnost S-100 proteinu pozitivních osteoblastů na povrchu nově vytvořených trámčů. S tím do jisté míry kontrastoval nálezní zřetelně S-100 proteinu pozitivních kostních buněk ve vzorcích od pacientů s fibrózní dysplazií. U Pagetovy choroby se jednalo o zcela výjimečný nálezní. V preparátech barvených za použití protilátek proti S-100 A1, A6 a B2 bylo možné ověřit, že kostní buňky, především osteoblasty, reagovaly pozitivně pouze při použití protilátky proti S-100 A6 proteinu, současně však byla pozitivní reakce s chondrocyty. Protilátky proti S-100 A1 a B2 s kostními buňkami nereagovaly (Povýšil C. et al., 2008). Tyto S-100 proteinu pozitivní osteocyty a osteoblasty mohou představovat přechodnou formu kostních buněk, blízkou chrupavkovým buňkám, o níž se zatím nevědělo, což však současnými prostředky nelze spolehlivě doložit. Na druhé straně může tento fenomén souviset s polyklonálním charakterem rutinně používané protilátky, která je směsí S-100 A1 a A6 a S-100 B, jejichž exprese se v různých tkáních mění nejen v závislosti na histogenetickém původu buněk, ale také v souvislosti s jejich měnícím se funkčním stavem. Svědčily by pro to naše výše zmíněné nálezy.

Popsané skutečnosti svědčí pro omezenou specifitu běžně používané protilátky proti S-100 proteinu, s čímž je nutné počítat nejen v diagnostice, ale i při interpretaci nálezů výzkumného charakteru. S-100 protein představuje skupinu 19 nízkomolekulárních proteinů vázících vápenaté ionty (Ca^{2+}), které jsou exprimovány řadou různých buněčných typů. Podílejí se na regulaci intracelulárních procesů, jako je fosforylace proteinů, aktivita enzymů,

buněčná proliferace a diferenciace, strukturální organizace cytoskeletu a buněčných membrán či intracelulární homeostáza kalcia. Navíc některé typy S-100 proteinu jsou secernovány do extracelulárních prostorů a uplatňují se jako chemoatraktanty leukocytů, modulují proliferaci buněk a regulují aktivaci makrofágů (Donato R., 1988). Bylo doloženo, že některé isoformy ovlivňují progresi nádorového onemocnění a tak je snaha využít těchto vlastností i při určování jejich prognózy (Cross S.S. et al., 2005).

5.2.4. Aktiny jako základ buněčného skeletu a možný význam exprese alfa smooth muscle aktinu u chondrocytů

Většina chondrocytů nově vytvořené chrupavky exprimovala alfa aktin hladké svaloviny. Zdá se, že alfa aktin pozitivní chondrocyty se s výjimkou povrchové vrstvy normální kloubní chrupavky vyskytují pouze v souvislosti s artrotickými změnami (Povýšil C. et al., 2008, Wang Q.I. et al., 2001) a v rámci probíhajících reparativních změn (Povýšil C. et al., 2008). To nejspíše platí i pro novotvorbu kloubní chrupavky po transplantaci autologních chondrocytů. Alfa aktin pozitivní chondrocyty, tzv. myochondrocyty (Povýšil C. et al., 1997), by mohly využívat kontraktilní isoformu alfa aktinu při manipulaci s extracelulární matrix kloubní chrupavky a její přestavbě. Nelze vyloučit, že alfa aktin pozitivní chondrocyty mají vyšší regenerační potenciál ve srovnání s chondrocyty, které tento materiál v cytoplazmě neobsahují. Do značné míry pro to svědčí imunofenotyp málo diferencovaných chrupavkových buněk tvořících základ brněnské kultury, které vykazovaly zřetelnou pozitivitu v reakci k průkazu alfa aktinu hladké svaloviny.

Alfa aktin hladké svaloviny nepochybně hraje významnou roli při regulaci motility buněk a jejich kontraktility (Clément S. et al., 2003). Vyskytuje se ve všech buňkách, u kterých jsou tyto funkce dobře známy. Nejznámější je význam myofibroblastů v průběhu hojení ran a při vzniku a rozvoji fibrokontraktálních onemocnění jako jsou různé formy fibromatóz měkkých tkání. Aktinová filamenta však jsou běžnou součástí i myoepiteliálních buněk pericytů a buněk hladké svaloviny, tvořících hlavní součást média cév. Překvapivě velký počet myochondrocytů byl prokázán v elastické chrupavce boltce (Kaňa R. et al., 2006), kde je možno předpokládat jejich zásadní význam pro elasticitu tohoto útvaru a zachování jeho tvaru. Vyskytují se však i v elementech, které je běžně neobsahují, a to jako reakce na mechanické stimuly nebo v souvislosti se změnami genů v průběhu některých reaktivních stimulů (Eyden B., 2000). Interpretace těchto nálezů je různá podle situací, při kterých byly

identifikovány, neboť pokud se jedná o funkci různých isoform aktinu zůstává mnoho otázek nezodpovězených.

Aktiny jsou ubikvitní eukaryotické proteiny, tvořící základ buněčného skeletu, vyskytující se nejen v buňkách svalových, ale také v dalších elementech různé histogeneze. Uplatňují se v rámci různých buněčných funkcí, včetně buněčné motility, buněčného transportu, svalové kontrakce buněčné adhezivity, fagocytózy, dělení a udržování tvaru a integrity buňky (Ramaekers F.C.S., Bosman F.T., 2004, Vandekerckhove J., Weber K., 1981).

Pomocí elektroforézy lze rozlišit 6 isoform aktinu, které jsou rozděleny do dvou tříd (Vandekerckhove J., Weber K., 1981). První třída zahrnuje cytoplazmatický beta-aktin, cytoplazmatický gama-aktin a gama-hladkosvalový aktin. Do druhé třídy patří alfa-kardiální aktin, alfa-skeletální aktin a alfa-hladkosvalový aktin (alfa-SMA). Cytoplazmatický beta-aktin a gama-aktin se vyskytují ubikvitně. Geny jednotlivých isoform jsou lokalizovány na odlišných chromozómech. Další čtyři isoformy aktinu jsou tkáňově specifické a vyskytují se ve svalstvu skeletálním (alfa-skeletální aktin), kardiálním (alfa-kardiální aktin, alfa-skeletální aktin) a ve svalovině cév a zažívacího traktu (alfa- a gama-hladkosvalový aktin).

Rozdíly mezi jednotlivými isoformami aktinu jsou minimální a většinou spadají na vrub délky polypeptidových řetězců aminokyselin, které se liší maximálně o jednu aminokyselinu (374 nebo 375 aminokyselin). Jednotlivé isoformy aktinu jsou *in vivo* i přes minimální strukturální rozdíly do určité míry funkčně heterogenní (Mounier N. et al., 1997, Khaitlina S.Y., 2001). Mechanizmy této funkční heterogenity nejsou jednoznačně objasněny. Pravděpodobně se podílí různé další proteiny odlišně se vážící na N-terminální konec molekuly aktinu v závislosti na primární struktuře jednotlivých isoform (Lehman W. et al. 2001).

Zajímavé je, že exprese jednotlivých isoform se během vývoje v některých tkáních podstatně mění, což zatím zůstává nevysvětlené. Například v kosterních svalech v raném embryonálním vývoji převažuje exprese alfa-SMA, ale v pozdějším období převládne exprese alfa-kardiálního aktinu (Babai F. et al., 1990). V době narození dominuje alfa-skeletální aktin, který pak zůstává hlavní isoformou dospělých skeletálních svalů (Moll et al., 2006). Podobný vývoj lze pozorovat i u svaloviny myokardu, ve které je exprese alfa-SMA během vývoje nahrazena alfa-skeletálním a alfa-kardiálním aktinem (Clement S. et al., 2007). Přechodná exprese alfa-SMA v časných fázích vývoje je nezbytná pro správný vývoj a funkci srdeční svaloviny. Přes intenzivní studium této otázky přesné mechanismy tohoto působení nejsou jednoznačně objasněny. Ve fetální chrupavce jsme však přítomnost aktinu neprokázali a k

případným změnám exprimovaných aktinů během embryonálního vývoje chrupavkové tkáně se nemůžeme vyjádřit.

Cytoplazmatický beta- a gama-aktin jsou ubikvitní proteiny, které se vyskytují ve všech buňkách včetně svalových. Jedná se o proteiny účastníci se buněčné motility, transportu, adhezivity, dělení a udržování tvaru i integrity buňky. Jejich prostorová lokalizace v buňce a jejich funkce jsou i přes značnou podobnost struktury do určité míry odlišné. Gama-cytoplazmatický aktin je preferenčně syntetizován a lokalizován v centrální části buňky, zatímco beta-aktin se vyskytuje v oblasti vedoucího okraje pohybujících se buněk (Kashina A.S. et al., 2006). Tato prostorová segregace nezabraňuje jednotlivým isoformám účastnit se na tvorbě polymerů v různých intracelulárních oblastech a strukturách. Gama-cytoplazmatický aktin se vyskytuje převážně v oblasti těla buňky, kde vytváří silnější svazky inkorporované v nevětvenou síť a stresová vlákna. Naopak beta-aktin v oblasti vedoucího okraje pohybující se buňky vytváří řídkou dendritickou síť složenou z větvených relativně krátkých filament (Bulinski J.C., 2006).

Alfa- a gama- hladkosvalový aktin se typicky vyskytují především v buňkách hladké svaloviny, pro které je typická schopnost kontrakce. V hladké svalovině cév převažuje alfa-SMA, na rozdíl od hladké svaloviny zažívacího traktu, kde je dominantní isoformou gama-hladkosvalový aktin (Vandekerckhove J., Weber K. et al., 1981). Jak již bylo zmíněno, během embryonálního vývoje je alfa-SMA přechodně exprimován také v příčně pruhované kosterní svalovině a ve svalovině myokardu (Woodcock-Mitchell J. et al., 1988). Alfa-hladkosvalový aktin se kromě hladké svaloviny vyskytuje také v myofibroblastech, myoepiteliích a pericytech (Chaponnier C., Gabbiani G. et al., 2004, DeNofrio D. et al., 1989, Hinz B. et al., 2003, Schmitt-Gräff A. et al., 1994, Willems I.E. et al., 1994). Žádná z těchto buněk, na rozdíl od hladké svaloviny, neobsahuje h-caldesmon. Množství alfa-SMA je v případě myofibroblastů rozhodujícím faktorem pro sílu kontrakce vyvinutou těmito buňkami, jež je v případě exprese alfa-SMA podstatně vyšší než u buněk, které tuto formu neexprimují nebo ji exprimují v menším množství.

Alfa-skeletální aktin a alfa-kardiální aktin jsou také známy jako tzv. sarkomerické aktiny. Tyto isoformy aktinu se typicky vyskytují v příčně pruhovaných svalech a v myokardu. Expresi alfa-kardiálního aktinu lze během embryonálního vývoje prokázat ve větším množství i ve skeletální svalovině. V postnatálním období je tato isoforma aktinu ve skeletální svalovině nahrazena alfa-skeletálním aktinem a za normálních okolností je exprimována pouze v modifikovaných svalových buňkách v oblasti nervově-svalového vřetenka a v určitém množství i v dalších buňkách skeletální svaloviny (Clément S. et al.,

1999). V kosterních svalech u dospělých tvoří podle některých literárních údajů méně než 5% přítomného množství sarkomerických aktinů (Ilkovski B. et al., 2005), jiné práce udávají o něco větší množství až na úrovni 10-15% (Ravenscroft G. et al., 2008).

Expresí alfa-kardiálního aktinu byla prokázána ve fetálních (umbilikálních) cévách a postnatálně v buňkách hladké svaloviny cév při ateroskleróze, kde dochází k fenotypické přeměně hladkosvalových buněk s alterací cytoskeletu. V rámci fenotypických změn v těchto buňkách dochází ke snížení exprese alfa-SMA, naopak se zvyšuje exprese beta-cytoskeletálního aktinu a dochází k expresi alfa-kardiálního aktinu. Distribuce alfa-kardiálního aktinu je v těchto buňkách obdobná jako distribuce cytokeratinu 8 a 18, což jsou intermediální filamenta typicky přítomná v dediferencovaných hladkosvalových buňkách (Bea et al., 2000). Expresí alfa-kardiálního aktinu v příčně pruhované kosterní svalovině se výrazně zvyšuje při určitých patologických stavech jako je degenerativní atrofie, Duchennova svalová dystrofie a také během svalové regenerace (Moll R. et al., 2006). Význam alfa-kardiálního aktinu pro vývoj a funkci srdeční svaloviny není jednoznačně objasněn, je však známo, že mutace genu pro tuto isoformu aktinu vedou ke vzniku idiopatické dilatační kardiomyopatie a familiární hypertrofické kardiomyopatie (Mogensen J. et al. 1999, Olson T.M. et al. 2005).

Alfa-skeletální aktin tvoří postnatálně většinu sarkomerických aktinů příčně pruhované svaloviny. V srdeční svalovině je během embryonálního vývoje exprese alfa-SMA nahrazena alfa-skeletálním a alfa-kardiálním aktinem (Clement S. et al., 2007). Postnatálně dochází ke snížení exprese alfa-skeletálního aktinu. I u dospělých však tato isoforma tvoří asi 20% sarkomerických aktinů myokardu (Vandekerckhove J., Weber K. et al., 1981). Expresí alfa-skeletálního aktinu se v buňkách srdeční svaloviny výrazně zvyšuje za určitých patologických stavů, jako je srdeční hypertrofie či některé kardiomyopatie, zůstává však nezměněna u idiopatické dilatační kardiomyopatie (Adachi S. et al., 1998, Bakerman P.R. et al., 1990, Suurmeijer A.J. et al., 2003). Z uvedeného přehledu vyplývá, že problematika exprese různých isoform aktinů je značně komplikovaná, neboť v buňkách některých tkání se vyskytují isoformy, které jsou proti očekávání pro danou tkáň málo specifické. Zmíněná skutečnost ukazuje, že celý problém není dostatečně objasněn. Vyžaduje to další cílené studie, které by mohly přinést nové poznatky významné nejen z teoretického hlediska, ale také s ohledem na potřeby patomorfologické onkologické diagnostiky.

Význam exprese alfa-SMA jako jedné z kontraktilních isoform aktinu v buňkách patologicky nezměněné i různým způsobem poškozené chrupavky zůstává nejasný (Povýšil C. et al., 2008, Horák M. et al., 2014). Jeho úloha může být v přenosu intracelulární tenze do

extracelulární matrix, což může ovlivňovat kromě jiného i tkáňově specifické uspořádání této matrix (Kim A.C., Spector M. et al., 2000, Kinner B. et al., 2002). V případě elastické chrupavky ušního boltce se mohou chondrocyty exprimující alfa-SMA podílet spolu s elastickými vlákny na neobvyklé elasticitě této chrupavky a její schopnosti měnit tvar pod vlivem mechanických podnětů bez poškození tkáně (Kaňa R. et al., 2006). Histologické nálezy tzv. vrstevnatého uspořádání některých oblastí ušní chrupavky zároveň naznačují, že aktin pozitivní chondrocyty mohou pravděpodobně podstatnou měrou přispívat spolu s rozvrstvením elastických vláken k udržení fixního zevního reliéfu ušního boltce.

Z literatury také není jasné, jestli je exprese alfa-SMA v chondrocytech přítomna trvale, či zda jde o výsledek patologického procesu nebo mechanické zátěže (Povýšil C. et al., 2008, Horák M. et al., 2014). Ukazuje se však, že exprese alfa-SMA v buňkách kloubní chrupavky i menisku může být regulována určitými růstovými faktory, jako je např. TGF-beta1, který expresi alfa-SMA v těchto buňkách zvyšuje, či PDGF, který expresi alfa-SMA naopak snižuje (Zaleskas J.M. et al., 2001). Výsledky naší studie ukázaly, že určité procento chondrocytů exprimujících alfa-SMA je přítomno i v patologicky nezměněné chrupavce včetně chrupavky ušního boltce. V kloubní chrupavce se jejich množství zvyšuje při poškození v rámci osteoartrózy i posttraumatických změn (Povýšil C. et al., 2008, Horák M. et al., 2014).

5.2.5. Biodegradibilita 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 vláknem 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 prostorech 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 lyzomálního 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. (Coates E.E., Fisher J.E., 2010, Peltarri K. et al., 2008). Zároveň je potřebné pátrat po faktorech, které by po transplantaci urychlily proces vyzrání nově vytvořené chrupavkové tkáně.

5.2.6. 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 nepostížená chrupavka. Výška chrupavkového krytu v místě defektu byla buď snižená, nebo dokonce chrupavka zcela vymizela. Při úplném vymizení chrupavky se subchondrálně objevoval reaktivní edém, vyvolávající na sekvencích se saturací tuku zvýšení signálu ve skeletu kondylů.

Po provedené autologní transplantaci vykultivovaných chondrocytů se nacházel na MR zobrazeních 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 sítě esteru kyseliny hyaluronové případně mezi vlákna fibrinu. Obraz obou typů transplantátu má proto charakter hyposignálního pruhu na T2 sekvencích a isosignálního pruhu (stejněho jako skelet) na T1 sekvenci. Podobné nálezy zaznamenal již

Takahashi, jenž však na rozdíl od nás nevyšetřoval kloubní změny opakovaně v rozmezí několika let (Takahashi T. et al., 2006).

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 nejpoužívanější 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 hlavičky femuru na postižené straně. CT vyšetření umožňuje určit mobilitu osifikované hlavičky 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 hlavičky 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. Hyalograft 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 vyzářelých prekurzorů 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 kontraktilního 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 vyzáření nově vytvořené kloubní chrupavky v její hyalinní formu.

7. Seznam literatury

- Adachi S**, Ito H, Tamamori M, Tanaka M, Marumo F, Hiroe M. Skeletal and smooth muscle alpha-actin mRNA in endomyocardial biopsy samples of dilated cardiomyopathy patients. *Life Sci.* 1998; 63: 1779-1791.
- 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.
- Aitken GT**. Amputation as a treatment for certain lower-extremity congenital abnormalities. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1959; 41-A: 1267-1285.
- Alman BA**, Krajbich JJ, Hubbard S. Proximal femoral focal deficiency: results of rotationplasty and Syme amputation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1995; 77(12): 1876-1882.
- Amstutz HC**. The morphology, natural history and treatment of proximal femoral focal deficiencies. In: Aitken GT, ed. Proximal Femoral Focal Deficiency. A Congenital Anomaly. Washington, DC: National Academy of Sciences. 1969.
- Amstutz HC**, Wilson PD. Dysgenesis of the proximal femur (Coxa vara) and its surgical management. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1962; 44: 1-23.
- Anton CG**, Applegate KE, Kuivila TE, Wilkes DC. Proximal Femoral Focal Deficiency. *Seminars in Musculoskeletal Radiology.* 1999; 3: 215-225.
- Aston WJ**, Calder PR, Baker D, Hartley J, Hill RA. Lengthening of the congenital short femur using the Ilizarov technique: a single-surgeon series. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2009; 91(7): 962-967.
- Aydelotte MB**, Kuettner KE. Differences between sub-population of cultured bovine articular chondrocytes I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect. Tissue Res.* 1988; 18: 205-222.
- Aydelotte MB**, Greenhill RR, Kuettner KE. Differences between sub-population of cultured bovine articular chondrocytes II. Proteoglycan metabolism. *Connect. Tissue Res.* 1988; 18: 223-234.
- Babai F**, Musevi-Aghdam J, Schürch W, Royal A, Gabbiani G. Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos. I. Skeletal muscle. *Differentiation* 1990; 44: 132-142.

- Bakerman PR**, Stenmark KR, Fisher JH. Alpha-skeletal actin messenger RNA increases in acute right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1990; 258: L173-8.
- Bea F**, Bar H, Watson L, Blessing E, Kubler W, Kreuzer. Cardiac alpha-actin in smooth muscle cells: detection in umbilical cord vessels and in atherosclerotic lesions. *Basic Res. Cardiol.* 2000; 95: 106-113.
- Bernaerts A**, Pouillon M, De Ridder K, et al., Value of magnetic resonance imaging in early assessment of proximal femoral focal deficiency (PFFD). *JBR-BTR.* 2006; 89(6): 325-327.
- Bevan-Thomas WH**, Millar EA. A review of proximal femoral focal deficiencies. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1967; 49: 1376-1388.
- Boden SD**, Fallon MD, Davidson R, Mennuti MT, Kaplan FS. Proximal femoral focal deficiency. Evidence for a defect in proliferation and maturation of chondrocytes. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1989; 71: 1119-1129.
- Bohring A**, Oppermann HC. A further case of vertical transmission of proximal femoral focal deficiency? *Am. J. Med. Genet.* 1997; 71(2): 194-196.
- Bochmann D**. Prosthetic devices for the management of proximal femoral focal deficiency. *Ortho. Pros.* 1980; 4.
- 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.
- 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.
- Bryant DD III**, Epps CH. Proximal femoral focal deficiency: evaluation and management. *Orthopedics* 1991; 14: 775-784.
- Buckwalter JA**, Mankin HJ. Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J. Bone Joint Surg.* 1998; 79: 600-611.
- Bulinski JC**. Actin discrimination. *Science* 2006; 313: 180-181.
- Clément S**, Chaponnier C, Gabbiani G: A subpopulation of cardiomyocytes expressing alpha-skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ. Res.* 1999; 85: 51-58.
- Clément S**, Orlandi A, Bocchi G, Pizzolato MP, Foschini V, Eusebi G, Gabbiani G. Actin isoform pattern expression: a tool for the diagnosis and biological characterization of rhabdomyosarcoma. *Virchows Arch.* 2003; 442: 31-38.

- Clement S**, Stouffs M, Bettiol E, Kampf S, Krause KH, Chapponier C, Jaconi M. Expression and function of α -smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Science* 2007; 120: 229-238.
- 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.
- Connor JM**, Rae PS, Connor RA. Monozygotic twins concordant for congenital short femur. *J. Med. Genet.* 1986; 23(4): 364-365.
- Court C**, Carlioz H. Radiological Study of Severe Proximal Femoral Focal Deficiency. *J. Pediatr. Orthop.* 1997; 17: 520-524.
- Cross SS**, Hamdy FC, Delouime JC et al. Expression of S-100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S-100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 2005; 46: 256-269.
- Čihák R**, et al., *Anatomie Vol. I.* Praha: Avicenum: Grada Publishing 1987.
- Čihák R**, et al., *Anatomie Vol. III.* Praha: Avicenum: Grada Publishing 1997; 115.
- Dabbs D.** Diagnostic immunohistochemistry 2nd Ed., Churchill Livingstone Elsevier, 2006.
- Daentl DL**, Smith DW, Scott CI, et al. Femoral hypoplasia – unusual facies syndrome. *J. Pediatr.* 1975; 86: 107-111.
- Deak PD**, Smal Y, Kalender W. Multisection CT Protocols: Sex- and Age- specific conversion factors used to determine effective dose from dose length product. *Radiology* 2010; 257(1):
- DeNofrio D**, Hooek TC, Herman IM: Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 191-202.
- Donato R.** Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 1999; 1450: 19-231.
- 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.
- Dungl P**, et al., *Ortopedie.* Praha: Avicenum: Grada Publishing 2005: 888-894.
- Eliáš P**, Žižka J. Dopplerovská ultrasonografie. Hradec Králové: Nucleus 1998: 109-129.
- Epps CH.** Proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1983; 65(6): 867-870.
- Ergin H**, Semerci CN, Bican M. A case with proximal femoral focal deficiency (PFFD) and fibular A/hypoplasia (FA/H) associated with urogenital anomalies. *Turk. J. Pediatr.* 2006; 48(4): 380-382.

- Eyden B.** Readers' forum smooth-muscle-type myofilaments and actin in reactive and neoplastic nonmuscle cells. *Ultrastruct. Pathol.* 2000; 24: 347-362.
- Ferda J, Novák M, Kreutzberg B.** Výpočetní tomografie. Praha: Galén 2002.
- Ferda J.** CT angiografie. Praha: Galén 2004.
- 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.
- Fixsen JA, Lloyd-Roberts GC.** The natural history and early treatment of proximal femoral dysplasia. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1974; 56(1): 86-95.
- 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.
- Gillespie R, Torode IP.** Classification and management of congenital abnormalities of the femur. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1983; 65: 557-568.
- Gillespie R.** Classification of congenital abnormalities of the femur. In: Herring JA, Birch J, eds. *The Child With a Limb Deficiency.* Chicago, USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1998.
- 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.
- Goddard NJ et al.,** Natural history and treatment of instability of the hip in proximal femoral focal deficiency. *J. Pediatr. Orthop. B.* 1995; 4(2): 145-149.
- Goldman AB, Schneider R, Wilson PD Jr.** Proximal Focal Femoral Deficiency. *J. Can. Assoc. Radiol.* 1978; 29: 101-107.
- Griffith SI, McCarthy JJ, Davidson RS.** Comparison of the complication rates between first and second (repeated) lengthening in the same limb segment. *J. Pediatr. Orthop.* 2006; 26(4): 534-536.
- 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.
- Grill F, Dungal P.** Lengthening for congenital short femur. Results of different 7 methods. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1991; 73: 439-447.

- Grissom** LE, Harcke HT. Sonography in congenital deficiency of the femur. *J. Pediatr. Orthop.* 1994; 14: 29-33.
- Grogan** DP, Holt GR, Ogden JA. Talocalcaneal coalition in patients who have fibular hemimelia or proximal femoral focal deficiency. A comparison of the radiographic and pathological findings. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1994; 76(9): 1363-1370.
- Gupta** DKS, Gupta SK. Familial bilateral proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1984; 66: 1470-1742.
- 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.
- Hamanishi** C. Congenital short femur. Clinical, genetic and epidemiological comparison of the naturally occurring condition with that caused by thalidomide. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1980; 62: 307-320.
- Hendrickson** DA, Nixon AJ, Grande DA. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J. Orthop. Res.* 1994; 12: 485-497.
- Herzenberg** JE, Branfoot T, Paley D, Violante FH. Femoral nailing to treat fractures after lengthening for congenital femoral deficiency in young children. *J. Pediatr. Orthop. B.* 2010; 19(2): 150-154.
- Hillmann** JS, Mesgarzadeh M, Revesz G, Bonakpadour A, Clancy M, Betz RR. Proximal Femoral Focal Deficiency: Radiologic Analysis of 49 Cases. *Radiology* 1987; 165: 769-773.
- Hinz** B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* 2003; 14: 2508-2519.
- 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.
- Hollander** AP, Dickinson SC, Sims TJ, Brun P, Cortivo R, Kon E, Marcacci M, Zanasi S, Borriero 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.
- Horák** M, Chomiak J, Kašpar M, Ryznarová Z, Mašek M, Frydrychová M, Dungl P. Anomálie cévního zásobení dolní končetiny u pacientů s vrozeně krátkým femurem (PFFD) a význam CTAG při jejich diagnostice. *Ces. Radiol.* 2007; 61: 417-421.

- 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(Suppl. 1): 247.
- 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.
- Chaponnier C**, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J. Pathol.* 200; 204: 386-395.
- Chomiak J**, Horak 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.
- 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(Suppl. 1).
- Chomiak J**, Podškubka A, Dungal P, Ošťádal M, Frydrychová M. Cruciate Ligaments in Proximal Femoral Focal Deficiency: Arthroscopic Assessment. *J. Pediatr. Orthop.* 2012; 32(1): 21-28.
- 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.
- Ilkovski B**, Clement S, Sewry C, North KN, Cooper ST. Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. *Neuromuscular Disord.* 2005; 15: 829-835.
- Johansson E**, Aparisi T. Missing cruciate ligament in congenital short femur. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1983; 65: 1109.
- Johnson JP**, Carey JC, Gooch III WM, et al. Femoral hypoplasia – Unusual facies syndrome in infants of diabetic mothers. *J. Pediatr.* 1983; 102: 866-872.
- Kaňa R**, Dundr P, Tvrđík D, Nečas E, Povýšil C. Expression of actin isomorphs in human auricular cartilage. *Folia Biol.* 2006; 52: 167-72.
- Kashina AS**. Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-terminus. *Trends Cell. Biol.* 2006; 16: 610-615.
- Khaitlina SY**. Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol.* 2001; 202: 35-98.

- Kim** AC, Spector M. Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J. Orthop. Res.* 2000; 18: 749-755.
- 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.
- Kim** HK, Su PH, Qui YS. Histopathological changes in growth-plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. An experimental investigation in immature pigs. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2001; 83A: 688-697.
- King** RE. Proximal femoral focal deficiencies. In Tronzo RG (ed). *Surgery of the hip joint.* Philadelphia. Lea and Febiger, 1973: 126-156.
- King** RE. Surgical correction of proximal femoral focal deficiency. *Inter. Clin. Info Bull.* 1965; 4: 1.
- Kinner** B, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Spector M. Expression of smooth muscle actin in connective tissue cell participating in fracture healing in a murine model. *Bone* 2002; 30: 738-745.
- Kelly** TE. Proximal femoral focal deficiency (familiar). *Birth Defects* 1974; 10: 508-509.
- 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.
- Koman** LA, Meyer LC, Warren FH. Proximal femoral focal deficiency: natural history and treatment. *Clin. Orthop.* 1982; (162): 135-143.
- 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.
- Kozubíková** P, Horák M. Porovnání klasického rekonstrukčního algoritmu zpětné projekce (FBP) a algoritmu iterativní rekonstrukce (IRIS). *Ces. Radiol.* 2011; 65(3): 577-583.
- Kritter** AE. Tibial rotation-plasty for proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1977; 59: 1039-1046.
- Krajina** A. Angiografie. Hradec Králové: Nucleus 1999.
- Lange** DR, Schoenecker PL, Baker CL. Proximal femoral focal deficiency: Treatment and Classification in forty-two cases. *Clin. Orthop.* 1978; 135: 15-25.
- Laor** T, Burrows PE. Congenital anomalies and vascular birthmarks of the lower extremities. *Mag. Res. Imaging Clin. N. Am.* 1998; 6: 497-519.

- 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.
- Lehman W**, Rosol M, Tobacman LS, Craig R. Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three dimensional reconstructions. *J. Mol. Biol.* 2001; 307: 739-744.
- Lenz W**, Zygulska M, Horst J. FFU complex: An analysis of 491 cases. *Hum. Genet.* 1993; 91: 347-356.
- Levinson ED**, Ozonoff MB, Royen PM. Proximal femoral focal deficiency (PFFD). *Radiology* 1997; 29: 197-203.
- Lloyd-Roberts GC**, Stone KH. Congenital hypoplasia on the upper femur. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1963; 45: 557-560.
- 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.
- Mainil-Varlet P**, Ainer T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, Kandel R, Nehrer S, Pritsker K, Roberts S, Srauffer E. The international cartilage repair society (ICRS) - Histological visual scale. A preliminary report of the histological and point committee. I. human biopsies, Toronto consensus. *Europ. Cells Materials* 2002; 4: Suppl. 1, 44-57.
- Maldjian C**, Patel TY, Klein RM, Smith RC. Efficacy of MRI in classifying proximal focal femoral deficiency. *Skeletal Radiol.* 2007; 36: 215-220.
- Manaster BJ**, Roberts CC, Petersilge CA, Moore S, Hanrahan CJ, Crim J . Diagnostic Imaging - Musculoskeletal: non-traumatic diseases. Altona: Amirsys 2010; 4: 48-51
- Marotz RJ**, Johnson TR, Wheelock JB et al. Pregnancy and maternal proximal focal femoral Deficiency. A case report. *J. Reprod. Med.* 1983 28: 798-800.
- Mogensen J**, Klausen IC, Pedersen AK, Egeblad H, Bross P, Kruse TA, Gregersen N, Hansen PS, Baandrup U, Borglum AD. α -Cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: R39-R43.
- Moll R**, Holzhausen HJ, Mennel HD, Kuhn C, Baumann R, Teage C, Franke WF. The cardiac isoform of α -actin in regenerating and atrophic skeletal muscle, myopathies and rhabdomyomatous tumors: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Virchows Arch.* 2006; 449: 175-191.

- Mounier** N, Perriard JC, Gabbiani G, Chaponnier C: Transfected muscle and non-muscle actins are differentially sorted by cultured smooth muscle and non-muscle cells. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 839-846.
- Murray** RO, Jacobson HG, Stoker DJ. *The Radiology of Skeletal Disorders: exercises in diagnosis.* New York: Churchill Livingstone 1990; 10: 37-38.
- 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.
- Olson** TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* 1998; 280: 750-752.
- 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, IL. American Academy of Orthopaedic Surgeons 1998
- Paley** D. Lengthening reconstruction surgery for congenital femoral deficiency. In: Herring JA, Birch JG (ed). *The child with limb deficiency.* Rosemont, IL. American Academy of Orthopaedic Surgeons 1998; 113-132.
- Panting** AL, Williams PF. Proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1978; 60(1): 46-52.
- Pappas** AM. Congenital abnormalities of the femur and related lower extremity malformations. *J. Pediatr. Orthop.* 1983; 3: 45-60.
- Peltari** K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2008; 39S1: S58-S65.
- Pirani** S, Beuachamp RD, Li D, Sawatzky B. Soft Tissue Anatomy of Proximal Femoral Focal Deficiency. *J. Pediatr. Orthop.* 1991; 11: 563-570.
- 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.
- Povýšil** C, Tomanová R, Matějovský Z. Muscle specific actin in chondroblastoma. *Hum. Pathol.* 1997; 28: 316-324.
- Povýšil** C, Kaňa R, Tvrdík 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.
- Ramaekers** FCS, Bosman FT. The cytoskeleton and disease. *J. Pathol.* 2004; 204: 351-354.

- Ravenscroft** G, Colley SMJ, Walker KR, Clement S, Bringans S, Lipscombe R, Fabian V, Laing NG, Nowak KJ. Expression of cardiac α -actin spares extraocular muscles in skeletal muscle α -actin diseases – quantification of striated α -actins by MRM-mass spectrometry. *Neuromuscular Disord.* 2008; 18: 953-958.
- Richardson** EG, Rambach BE. Proximal femoral focal deficiency. A clinical appraisal. *Southern Med. J.* 1979; 72: 166-173.
- Senior** HD. The development of the arteries of the human lower extremity. *Am. J. Anat.* 1919; 25: 55-95.
- Schatz** SL, Kopits SE. Proximal femoral focal deficiency. *Am. J. Roentgenol.* 1978; 131: 289-295.
- Schmitt-Gräff** A, Desmoulière A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch.* 1994; 425: 3-24.
- Sirota** L, Landman J, Bar-Ziv J, et al. Proximal femoral focal deficiency associated with severe brain atrophy. *Isr. J. Med. Sci.* 1987; 23: 915-917.
- 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.
- Standring** S, et al. *Gray's anatomy. The anatomical basis of clinical practice.* 39th ed. Elsevier Churchill Livingstone 2005; 1450, 1470.
- Steel** HH, Lin PS, Betz RR, et al., Iliofemoral fusion for proximal femoral focal deficiency. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1987; 69(6): 837-843.
- Stoller** DW, Bertan S, et al. *Magnetic Resonance Imaging in Orthopaedics and Sports Medicine.* LWW, Baltimore 2006; 3rded(1): 41-305.
- Suurmeijer** AJ, Clément S, Francesconi A, Bocchi L, Angelini A, Van Veldhuisen DJ, Spagnoli LG, Gabbiani G, Orlandi A. Alpha-actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. *J. Pathol.* 2003; 199: 387-397.
- 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. *Skelet. Radiol.* 2006; 35: 16-26.
- 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.
- Tonnis** D, Stanitski DF. Early conservative and operative treatment to gain early normal growth in proximal femoral focal deficiency. *J. Pediatr. Orthop. B.* 1997; 6: 59-67.

- Taylor BC, Kean J, Paloski M.** Distal focal femoral deficiency. *J. Pediatr. Orthop.* 2009; 29(6): 576-580.
- Vandekerckhove J, Weber K.** Actin typing on total cellular extracts. *Eur. J. Biochem.* 1981; 113: 595-603.
- Van Nes CP:** Rotation-plasty for congenital defects of the femur. Making use of the shortened limb to control the knee joint of a prosthesis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1950; 32: 12-16.
- Wang QI, Breinan HA, Hsu HP, Spector M.** Healing of defects in canine articular cartilage: Distribution of nonvascular alpha-smooth muscle actin-containing cells. *Wound Rep. Reg.* 2000; 8: 145-158.
- Warwick R, Williams PL, et al.,** Gray's anatomy. 35th ed. Edinburg: Longman 1973; 162-163, 673-678
- Westberry DE et al:** Proximal focal femoral deficiency (PFFD): management options and controversies. *Hip Int.* 19 Suppl. 2009; 6: S18-25.
- Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ.** he alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 868-875.
- Woodcock-Mitchell J, Mitchel JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson, B, Gabbiani G.** α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 1988; 39: 161-166.
- Zaleskas JM, Kinner B, Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ, Spector M.** Growth factor regulation of smooth muscle actin expression and contraction of human articular chondrocytes and meniscal cells in a collagen-GAG matrix. *Exp. Cell Res.* 2001; 270: 21-31.

8. Přehled obrazové dokumentace v textu

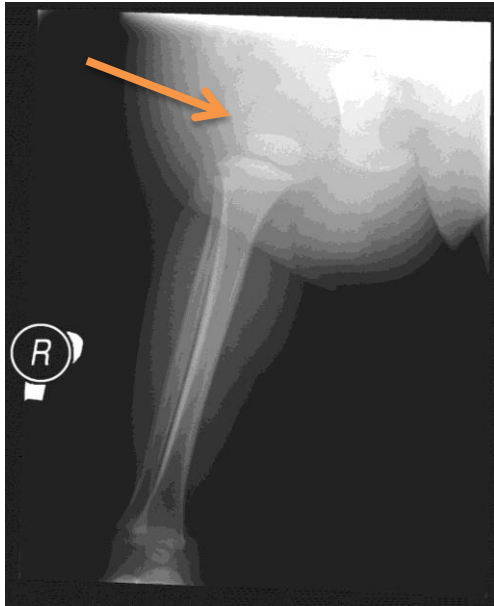
Obraz 1 – Klasifikace PFFD sec. Aitken.	15
Obraz 2 – Klasifikace PFFD sec. Pappas.	17
Obraz 3 – Pacient č. 4 – podle RTG typ II sec. Pappas vpravo.	41
Obraz 4 a 5 – Pacient č. 4 – CT axiální sken a VRT rekonstrukce.	42
Obraz 6 – Pacient č. 1 - typ I sec. Pappas vpravo.	43
Obraz 7 – Pacient č. 4 - typ III sec. Pappas vpravo.....	43
Obraz 8 – Pacient č. 15 - PFFD typ II sec. Pappas vlevo.....	45
Obraz 9 a 10 – Pacient č. 7 - PFFD typ IV sec. Pappas vlevo	46
Obraz 11 – Pacient č. 21 – PFFD typ VII sec. Pappas vpravo.....	47
Obraz 12 – Pacient č. 17 - PFFD typ III sec. Pappas vpravo	48
Obraz 13-18 – Pacient č. 2: typ III sec. Pappas vlevo.....	51
Obraz 19-24 – Pacient č. 3: typ III sec. Pappas vpravo.....	53
Obraz 25 – Hyalograft C	57
Obraz 26 – Chondrograft NTC, FN Brno - Bohunice.....	58
Obraz 27 – Relativně diferencovaná hyalinní chrupavka 10 měsíců po transplantaci Hyalograftu C.....	59
Obraz 28, 29 – MR koronární sken kolene, PD sekvence.....	62

9. Přehled tabulek v textu

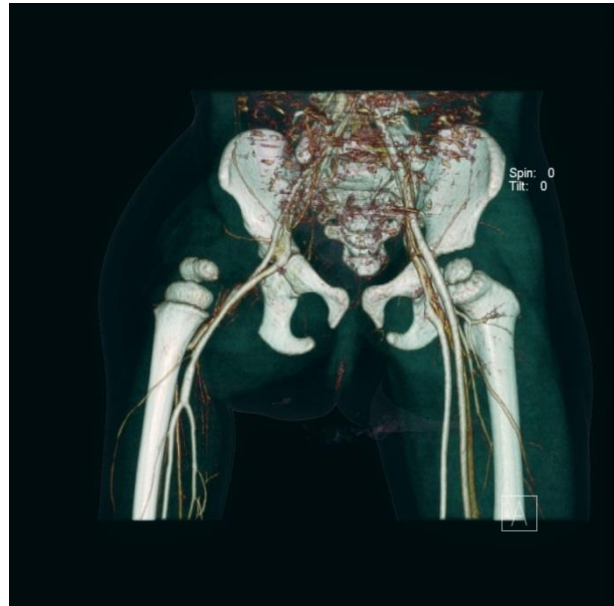
Tabulka 1 – soubor sekvencí použitých k MR vyšetření kolenního kloubu.	33
Tabulka 2 – soubor pacientů s PFFD, základní údaje.	37
Tabulka 3 – soubor pacientů s PFFD další doprovodné nálezy a návrh či již probíhající chirurgická terapie.....	38
Tabulka 4 – kalcifikace PFFD, reklasifikace po CT vyšetření a posouzení epifýzy hlavice kyčle.	40
Tabulka 5 – cévní zásobení dolní končetiny u pacientů s PFFD zobrazené pomocí CTAG. ..	45
Tabulka 6 – Dávka záření přijatá po expozici jednoho RTG snímku, rozděleno podle věku do čtyř kategorií	54
Tabulka 7 – Dávka záření přijatá po provedení CT vyšetření jedním skenem (jednou helikálou), rozděleno podle věku do čtyř kategorií.....	54
Tabulka 8 – Rozdělení léčby pacientů s PFFD do šesti etap.....	66

10. Obrazová příloha

**Pacient č. 1 – ženské pohlaví, nar. 2004,
PFFD vpravo typ I. sec. Pappas**

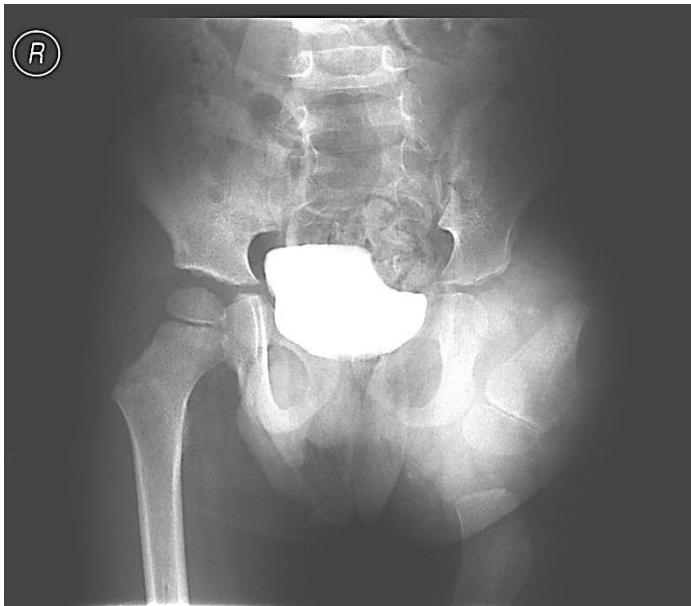


Obr. I. RTG pravé DK, AP projekce.
Vytvořena je pouze distální epifýza femuru
(šipka), ostatní struktury femuru chybí.
Dlouhé kosti odpovídají tibiai a fibule

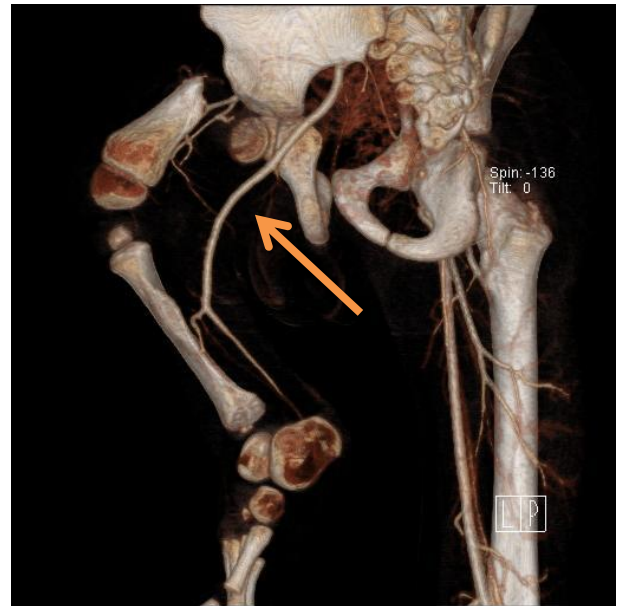


Obr. II. CTAG, VRT, anteriorní pohled.
Zobrazení skeletu a cév pánve a kyčle

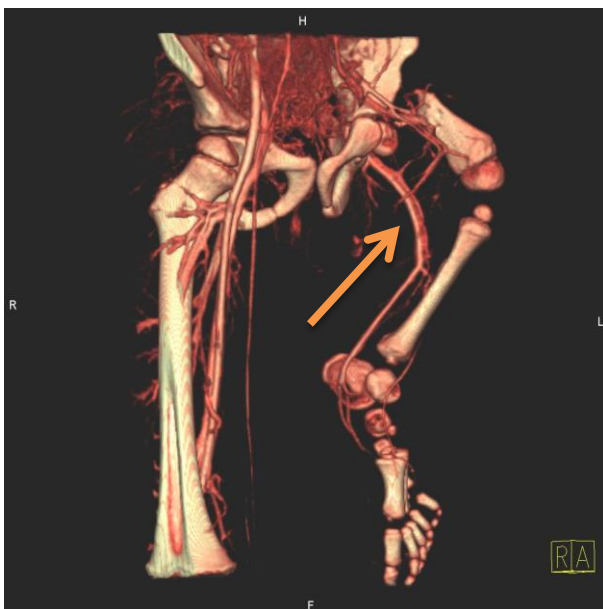
Pacient č. 2 – mužské pohlaví, nar. 2002
PFFD vlevo typ III sec. Pappas



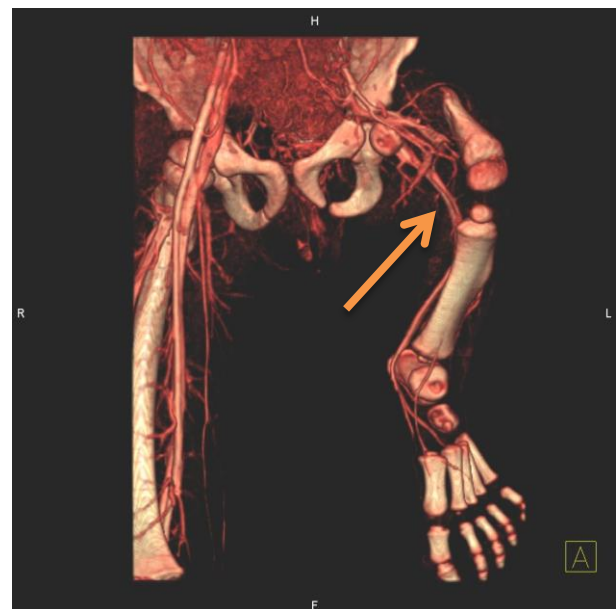
Obr. III. RTG, AP projekce. Pánev s kyčlemi, výrazný zkrat vlevo



Obr. IV. CTAG arteriální fáze, VRT, šikmý levý posteriorní pohled. Zobrazení skeletu a cév pánve i kyčlí včetně celé LDK. A. ischiadica označena šipkou



Obr. V. CTAG žilní fáze, VRT, šikmý pravý anteriorní pohled. Anomální cévní zásobení LDK, vena ischiadica kopíruje průběh arteria ischiadica (šipka)

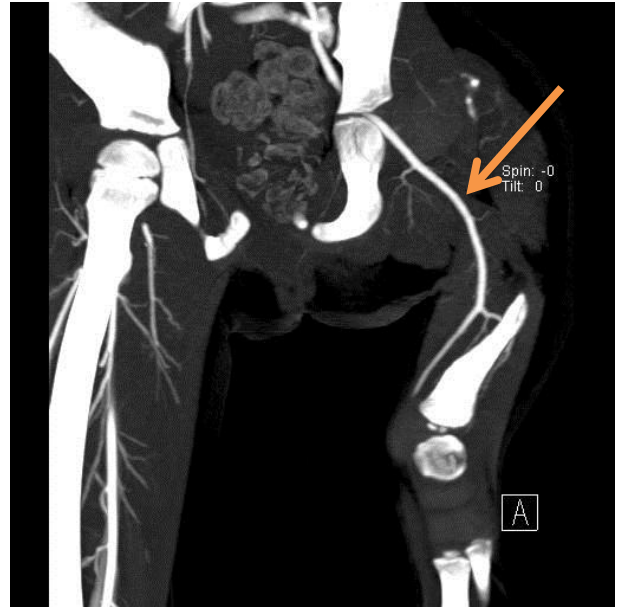


Obr. VI. CTAG žilní fáze, VRT, anteriorní pohled. Anomální cévní zásobení LDK, vena ischiadica kopíruje průběh arteria ischiadica (šipka)

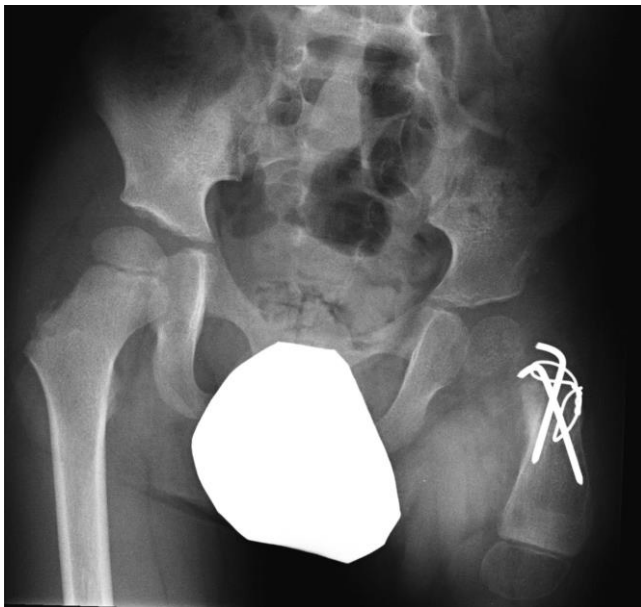
**Pacient č. 2 - mužské pohlaví, nar. 2002,
pokračování**



Obr. VII. CTAG, thin MIP, anteriorní pohled. Zobrazení femorálních tepen v oblasti třísel. Hypoplazie tepen na postižené straně



Obr. VIII. CTAG, thin MIP, anteriorní pohled. Zobrazení arteria ischiadica vlevo (šipka)

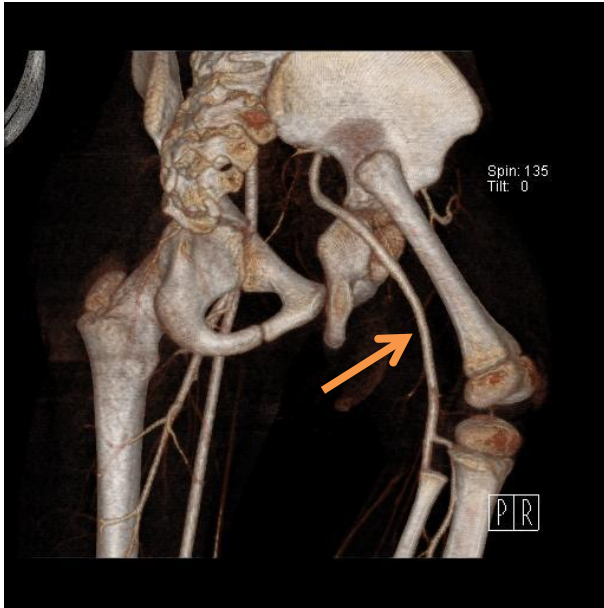


Obr. IX. RTG snímek pánve s kyčlemi po zahájení terapie. Rekonstrukce levého kyčelního kloubu, fixováno pomocí tahové cerclage

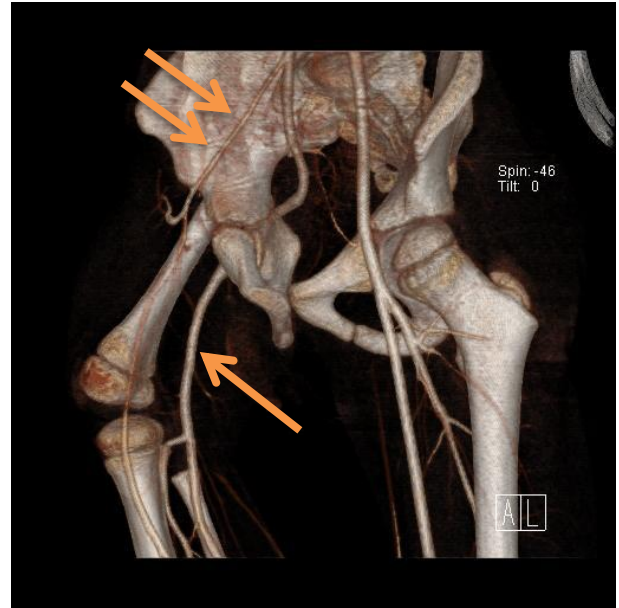


Obr. X. Snímek ukazující rozsah postižení při stoji pacienta před zahájením terapie

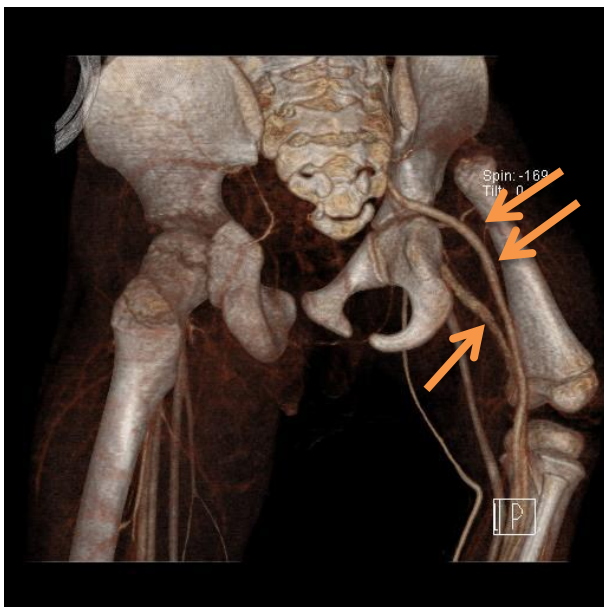
Pacient č. 3 – mužské pohlaví, nar. 2000
PFFD vpravo typ III sec. Pappas



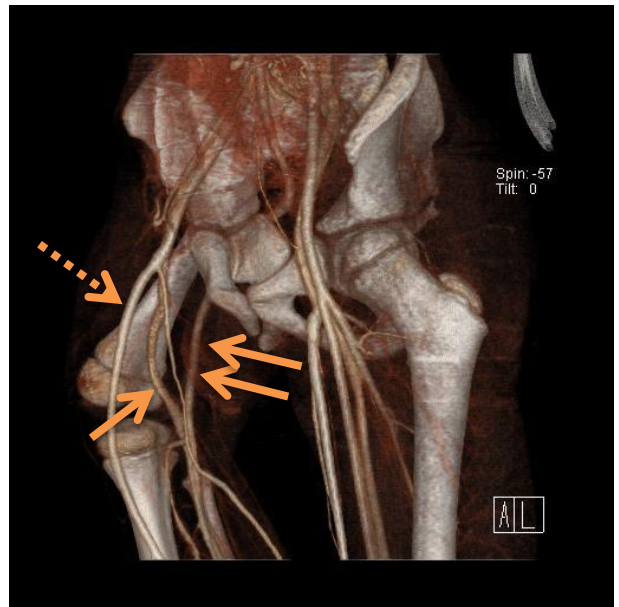
Obr. XI – CTAG arteriální fáze, VRT, šikmý pravý posteriorní pohled. Zobrazí průběh arteria ischiadica vpravo (šipka)



Obr. XII. CTAG arteriální fáze, VRT, šikmý levý anteriorní pohled. Zobrazí průběh arteria ischiadica vpravo (šipka). Hypoplastická pravá arteria femoralis (dvě šipky)

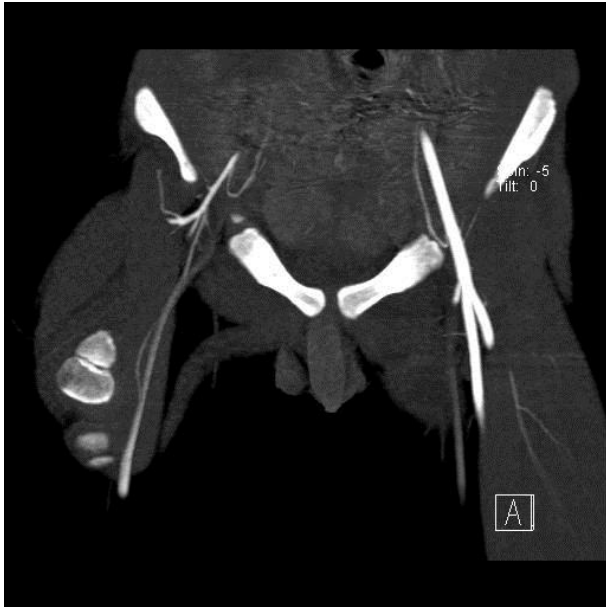


Obr. XIII. CTAG žilní fáze, VRT, šikmý pravý téměř posteriorní pohled. Zobrazí průběh vena ischiadica vpravo (šipka) a arteria ischiadica (dvě šipky). Zastiženy i vena saphena magna a parva



Obr. XIV. CTAG žilní fáze, VRT, šikmý levý anteriorní pohled. Zobrazí průběh vena ischiadica vpravo (šipka), a arteria ischiadica (dvě šipky). Zastiženy i vena saphena magna (přerušovaná šipka) a parva

**Pacient č. 3 - mužské pohlaví, nar. 2000,
pokračování**



Obr. XV. CTAG, thin MIP, anteriorní pohled. Zobrazení femorálních tepen v oblasti třísel. Hypoplazie tepny na postižené straně.



Obr. XVI. CTAG, thin MIP, anteriorní pohled. Zobrazení arteria ischiadica vpravo (šipka)

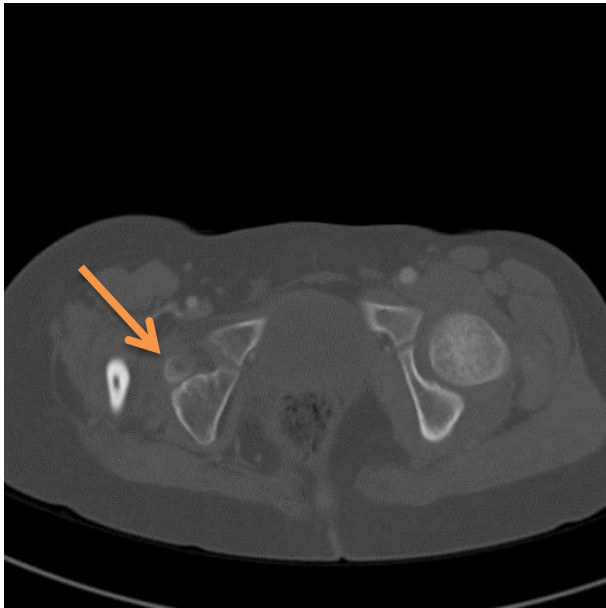


Obr. XVII. Snímek ukazující rozsah postižení při stoji pacienta před zahájením terapie

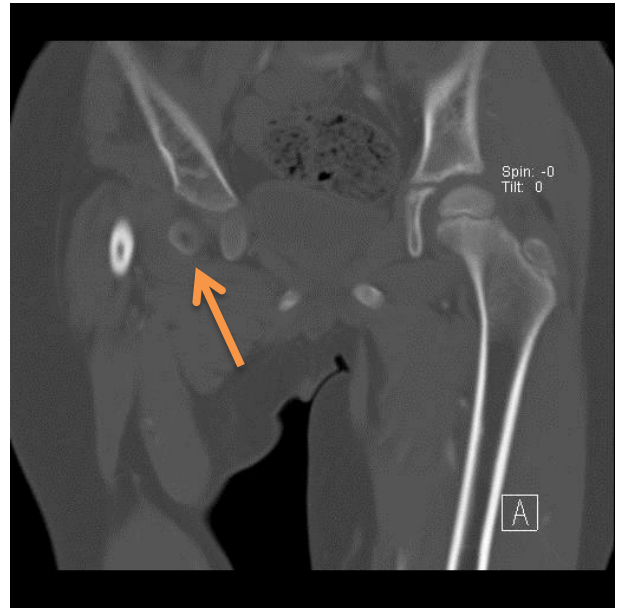


Obr. XVIII. RTG pravé kyčle. Snímek po chirurgické rekonstrukci kyčle s naloženým zevním fixátérem

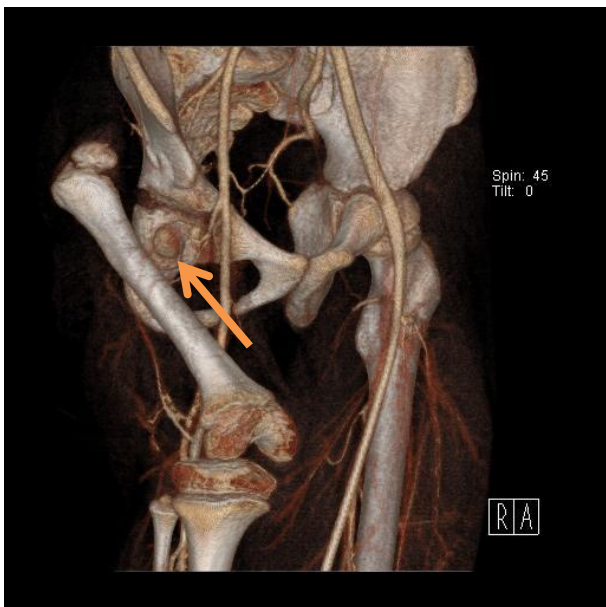
Pacient č. 4 – mužské pohlaví, nar. 1998
PFFD vpravo typ II sec. Pappas, typ III
až po reklasifikaci



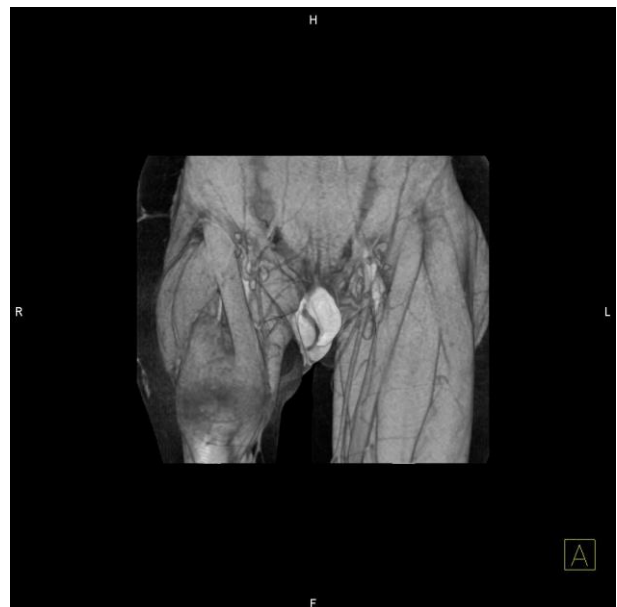
Obr. XIX. CTAG, axiální sken, kostní okno. Malá osifikovaná hlavice femuru vpravo (šipka) přisedá na acetabulum, epifýza fixovaná



Obr. XX. CTAG, koronární MPR rekonstrukce, kostní okno. Malá osifikovaná hlavice femuru vpravo (šipka)

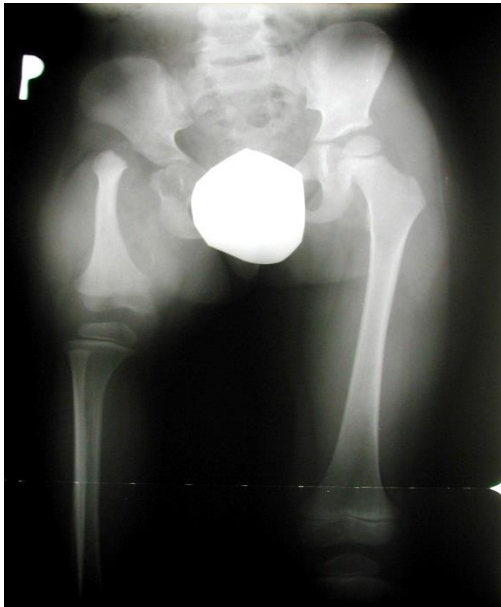


Obr. XXI. CTAG, VRT šikmý pravý anteriorní pohled. Malá osifikovaná epifýza hlavice femuru vpravo (šipka) přisedá na acetabulum

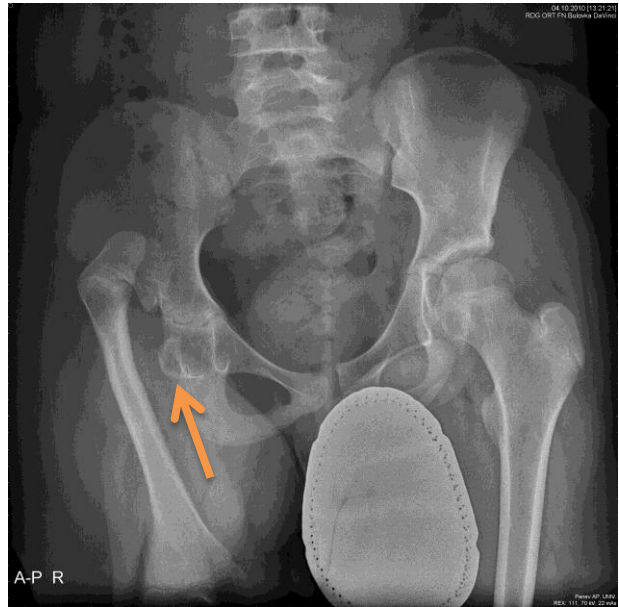


Obr. XXII. CTAG, VRT anteriorní pohled. Ukázka rozložení svalů stehna na zdravé a postižené straně

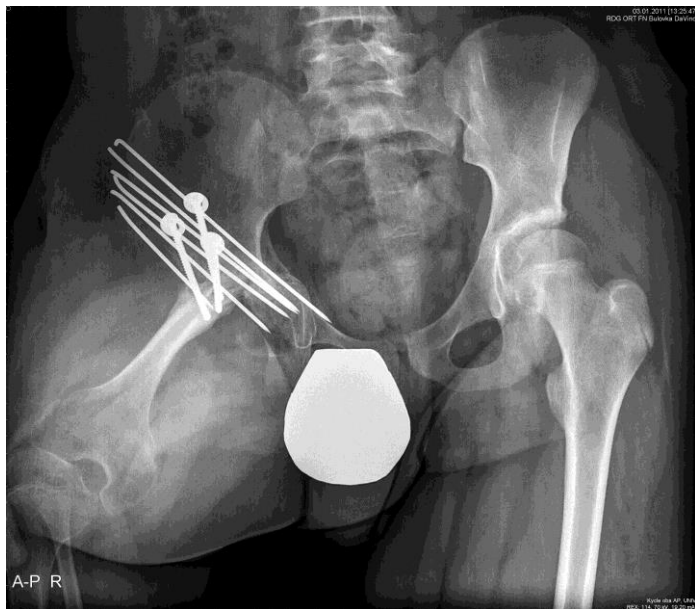
**Pacient č. 4 – mužské pohlaví, nar. 1998
pokračování**



Obr. XXIII. RTG pánve a femurů, AP pohled. Zkrácený pravý femur bez patrné hlavice v acetabulu.

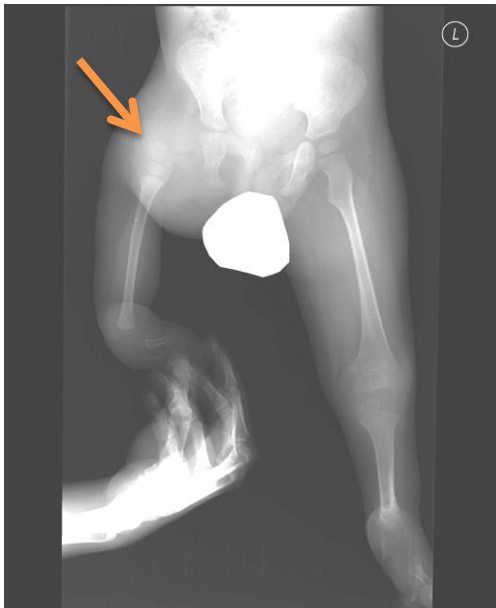


Obr. XXIV. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. S odstupem čtyř let je hlavice v pravém acetabulu již patrná i na RTG snímku (šipka)

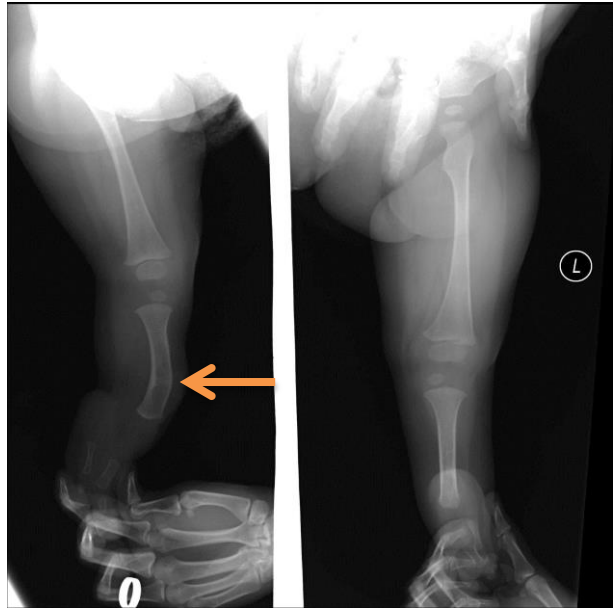


Obr. XXV. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Kontrola po operačním výkonu

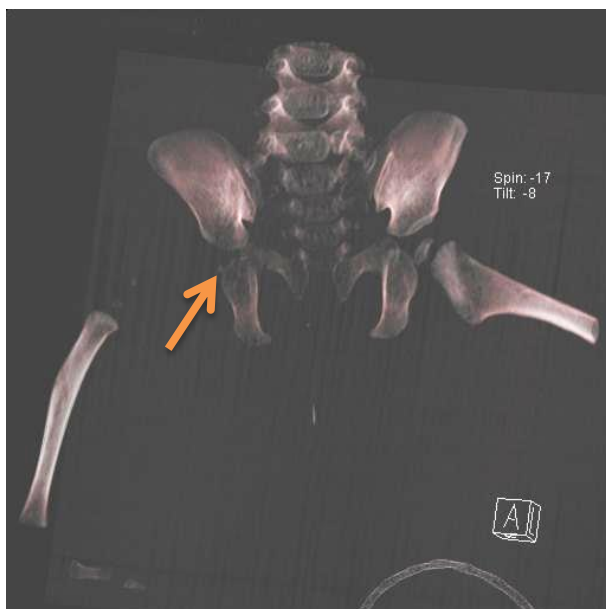
Pacient č. 5 – mužské pohlaví, nar. 2004
PFFD vpravo typ III sec. Pappas



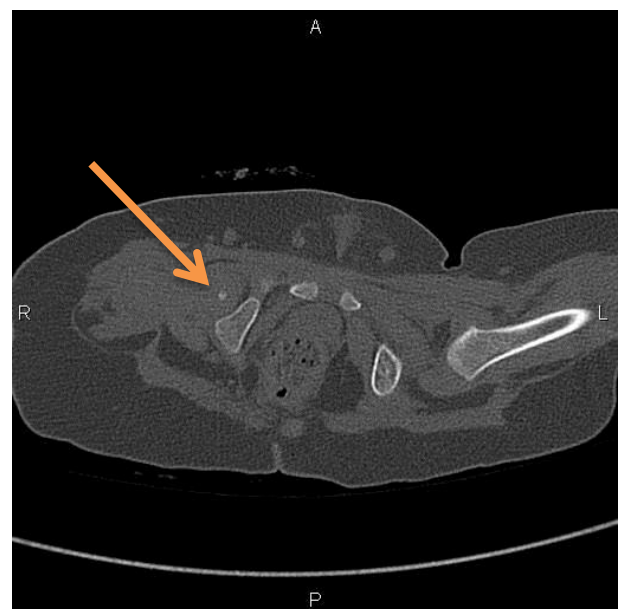
Obr. XXVI. RTG pánve a dolních končetin, AP projekce. Vpravo zkrácený femur, ze kterého zbývá jen krátký distální úsek (šipka)



Obr. XXVII. RTG snímek, AP a šikmá projekce. Na levé dolní končetině (nepostíženě PFFD) patrná dorsální angulace tibie (šipka)



Obr. XXVIII. CT, VRT, téměř anteriorní pohled. Málo osifikovaná hlavice vpravo není téměř patrná (šipka)

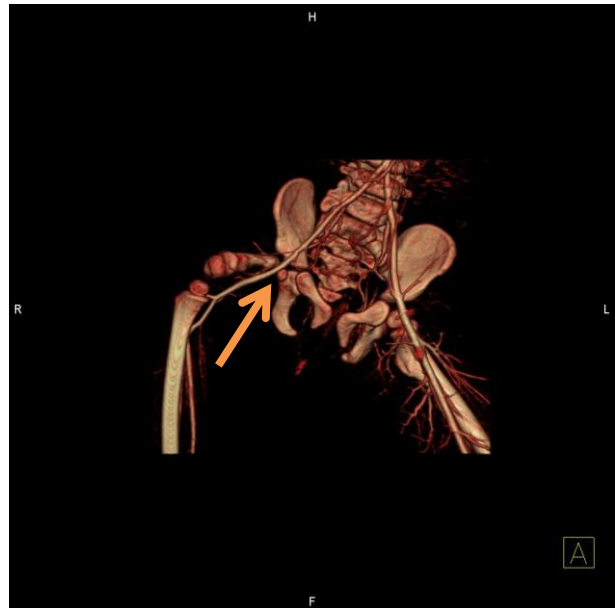


Obr. XXIX. CT axiální sken. Málo osifikovaná hlavice vpravo je přítomna, osifikační jádro je drobné (šipka). Levá kyčel není zastižena na snímku

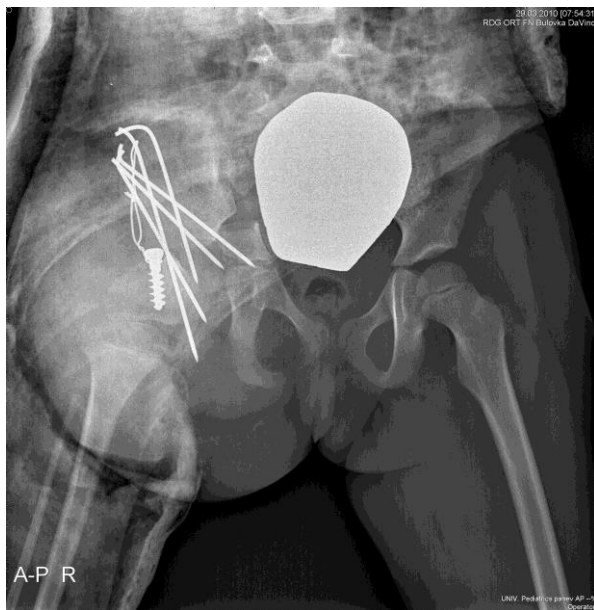
**Pacient č. 6 – ženské pohlaví, nar. 2006
PFFD vpravo typ III sec. Pappas**



Obr. XXX. RTG pánve a dolních končetin, AP projekce. Zkrácený femur, z něhož zbývá jen krátký distální úsek (šipka)



Obr. XXXI. CTAG, VRT anteriorní pohled. Vpravo je přítomna malá hlavice femuru (šipka)



Obr. XXXII. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Stav po korekční osteotomii v sádrové spici

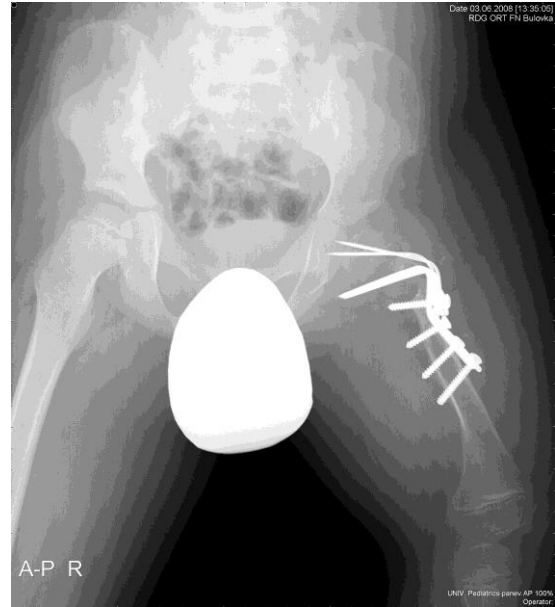


Obr. XXXIII. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Stav po korekční osteotomii s odstupem šesti let

Pacient č. 7 – mužské pohlaví, nar. 2003
PFFD vlevo typ IV sec. Pappas



Obr. XXXIV. CTAG, VRT anteriorní pohled. Dobře patrné vyšší uložení bifurkace AFC vlevo (šipka)



Obr. XXXV. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Stav po rekonstrukci pakloubu vlevo

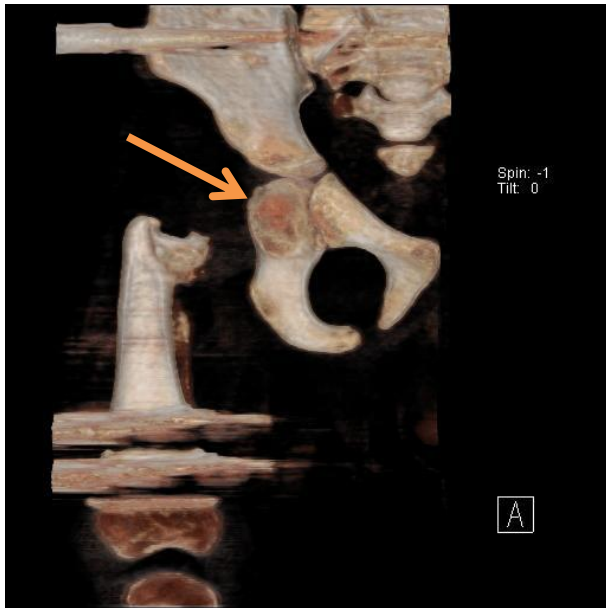


Obr. XXXVI. RTG levého femuru, AP projekce. Následná elongace diafýzy femuru zevním fixátérem



Obr. XXXVII. RTG levého femuru, AP projekce. Během elongace došlo k fraktuře diafýzy v hojící se části. Fixováno dlahou

Pacient č. 8 – mužské pohlaví, nar. 2002
PFFD vpravo typ IV sec. Pappas



Obr. XXXVIII. CT, VRT anteriorní projekce. Hlavice femuru v pravém acetabulu dobře patrná (šipka)



Obr. XXXIX. RTG pánve a femurů, AP projekce. První snímek, vpravo zkrácení

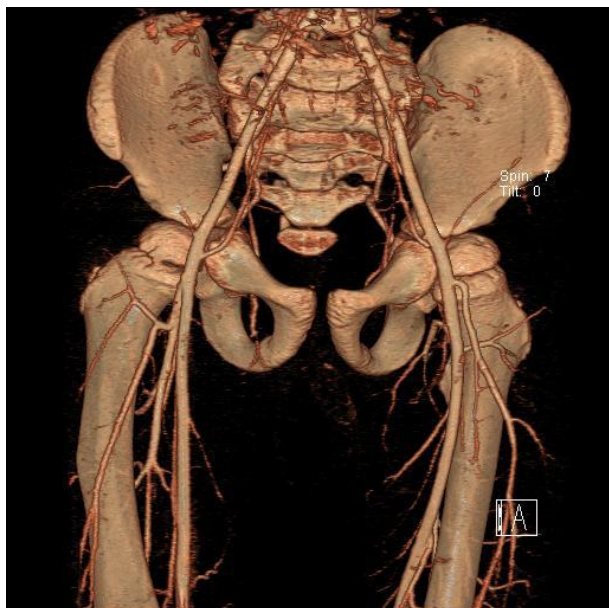


Obr. XL. RTG pravého femuru, AP projekce. Stav po resekci vrozeného pakloubu

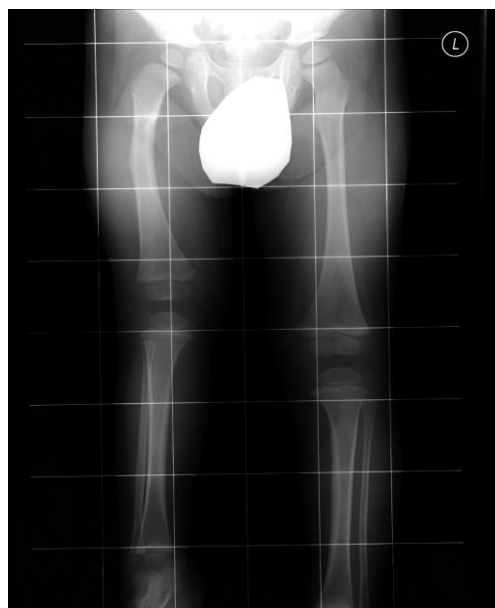


Obr. XLI. RTG pánve a femurů, AP projekce. Nález po pěti operacích pravé kyčle. Dosud nezhojený uměle vzniklý pakloub vpravo je po provedených korekcích lokalizován distálněji

Pacient č. 9 – mužské pohlaví, nar. 2003
PFFD vpravo typ VII sec. Pappas



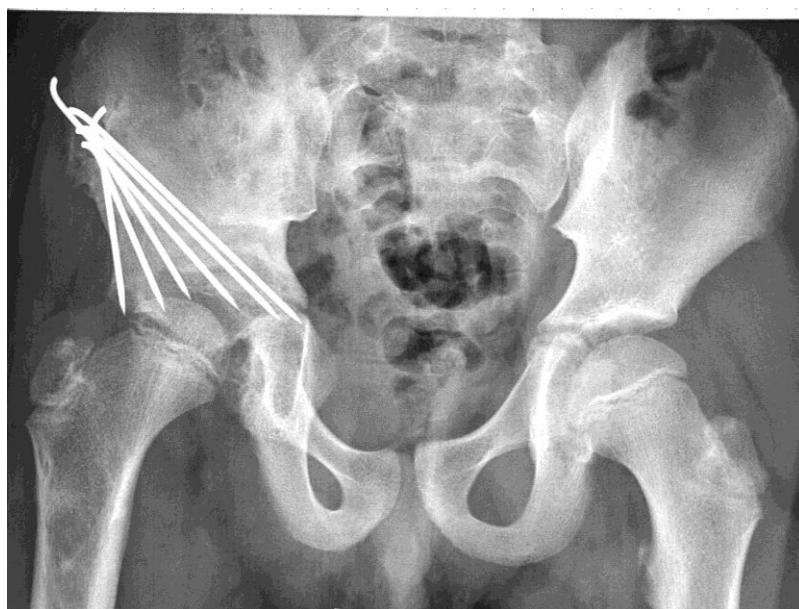
Obr. XLII. CTAG, VRT anteriorní pohled.
Změny na pravé kyčli méně výrazné



Obr. XLIII. RTG pánve a dolních končetin
s rastrem pro výpočet zkratu, AP projekce.
Vpravo je patrný zkrat femuru s jeho
mírnou deformitou



Obr. XLIV. RTG pravého femuru, AP
projekce. Elongace diafýzy femuru zevním
fixátérem. Postupná přestavba osteotomie.

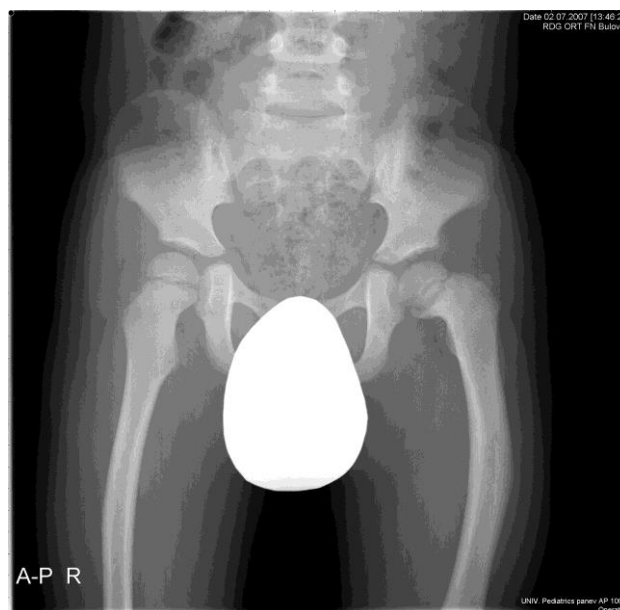


Obr. XLV. RTG pánve s kyčlemi, AP
projekce. Stav po korekční osteotomii
acetabula

Pacient č. 10 – mužské pohlaví, nar.2002
PFFD vlevo typ VII sec. Pappas



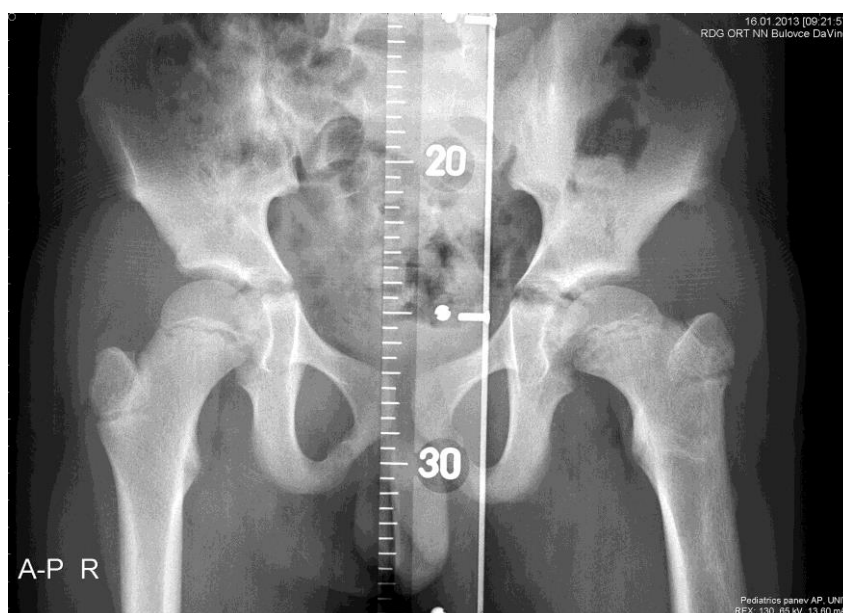
Obr. XLVI. CTAG, VRT anteriorní pohled. Zkrat a deformita diafýzy levého femuru



Obr. XLVII. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Deformita levého femuru, varózní postavení kyčle vlevo



Obr. XLVIII. RTG levého femuru, AP projekce. Korekční osteotomie krčku femuru



Obr. XLIX. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce s měřítkem pro výpočet zkratu dolní končetiny. Zlepšené postavení kolodiafyzálního úhlu vlevo

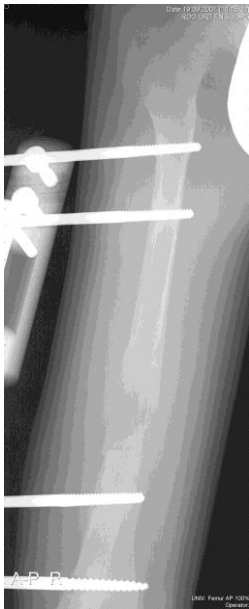
Pacient č. 11 – mužské pohlaví, nar.2000
PFFD vpravo typ VIII sec. Pappas



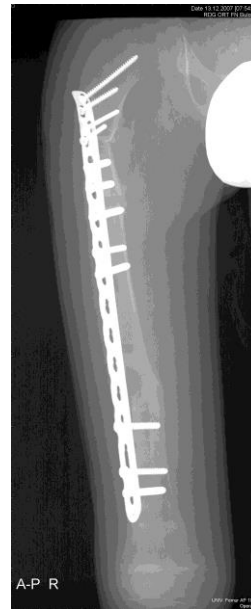
Obr. L. CTAG, thin MIP anteriorní pohled.
Zkrat PDK



Obr. LI. CTAG, VRT, posteriorní pohled.
Vizualizace normálně probíhajících tepen
obou bérců

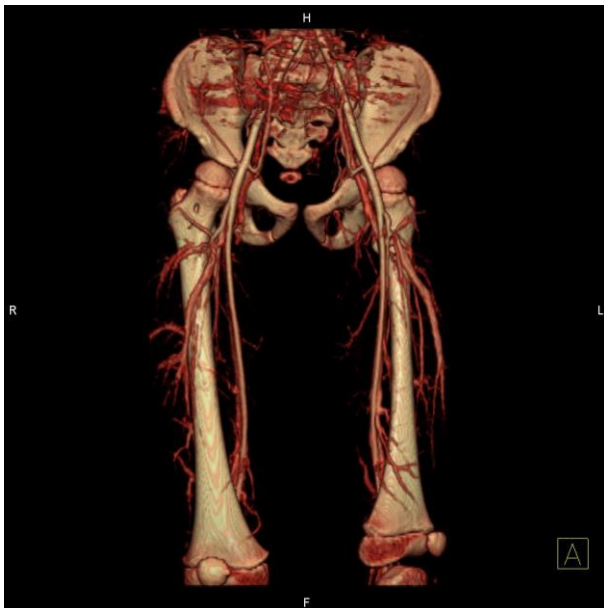


Obr. LII. RTG pravého femuru, AP
projekce. Elongace diafýzy femuru zevním
fixátorem

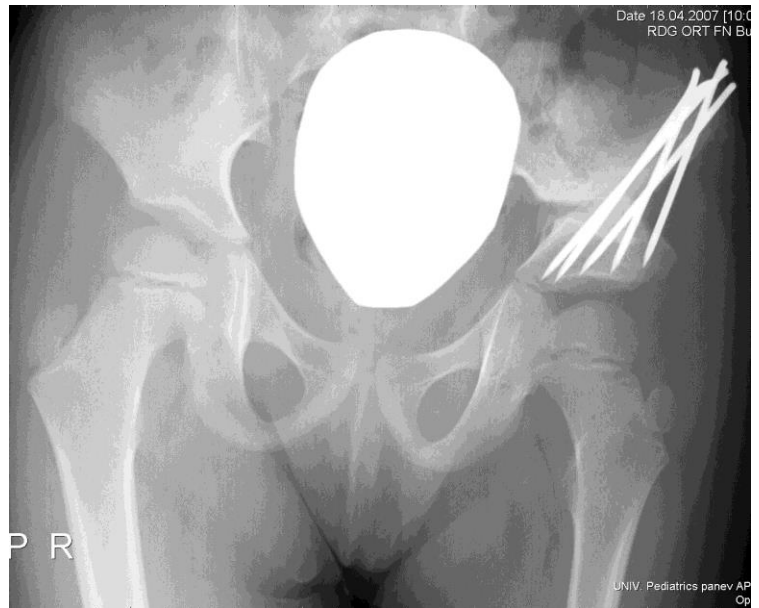


Obr. LIII. RTG pravého femuru, AP
projekce. Fixace elongované kosti dlahou

Pacient č. 12 – ženské pohlaví, nar. 2002
PFFD vlevo typ IX sec. Pappas



Obr. LIV. CTAG, VRT anteriorní pohled.
 Mírný zkrat levého femuru



Obr. LV. RTG pánve s kyčlemi, AP
 projekce. Korekční osteotomie stropu
 acetabula vlevo



Obr. LVI. RTG obou dolních končetin, AP
 projekce. S měřítkem pro výpočet zkratu
 dolní končetiny



Obr. LVII. RTG obou kolen, AP projekce.
 Hojící se osteotomie distální metadiafýzy
 femuru vlevo s fixací Ki dráty

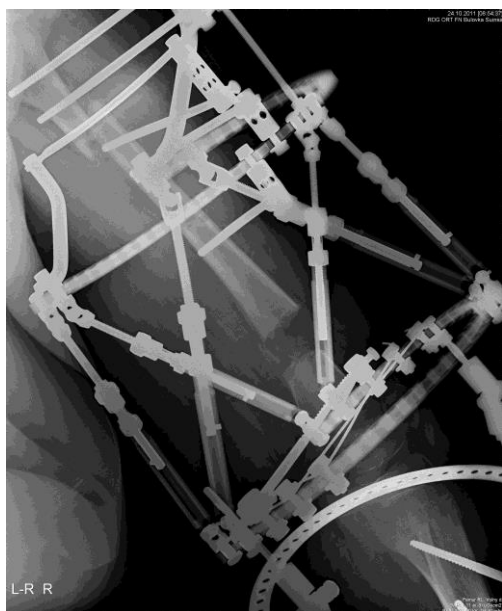
**Pacient č. 13 – mužské pohlaví, nar.
2001
PFFD vpravo typ IX sec. Pappas**



Obr. LVIII. CTAG, VRT anteriorní pohled. Mírný zkrat femuru vpravo



Obr. LIX. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Korekční osteotomie stropu acetabula vpravo



Obr. LX. RTG pravého femuru, AP projekce. Elongace femuru s fixátorem



Obr. LXI. RTG pravého femuru, AP projekce. Hojící se osteotomie po prolongaci distálně. Proximálně osteotomie zhojená v angulaci

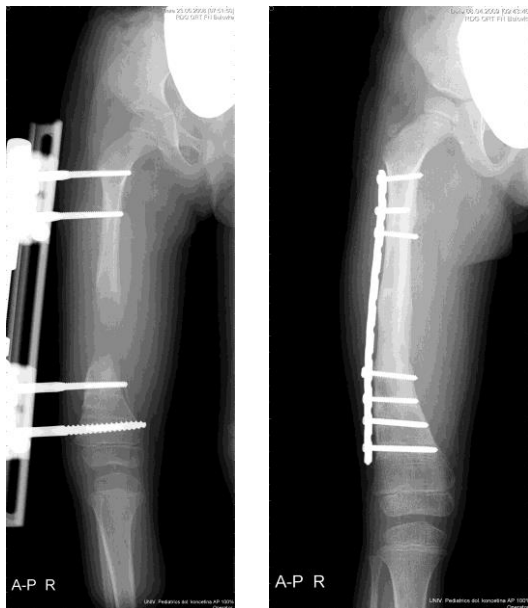
Pacient č. 14 – ženské pohlaví, nar.2004
PFFD vpravo typ IX sec. Pappas



Obr. LXII. CTAG, VRT anteriorní pohled.
 Mírný zkrat PDK



Obr. LXIII. RTG dolních končetin, AP
 projekce. Zkrat PDK.

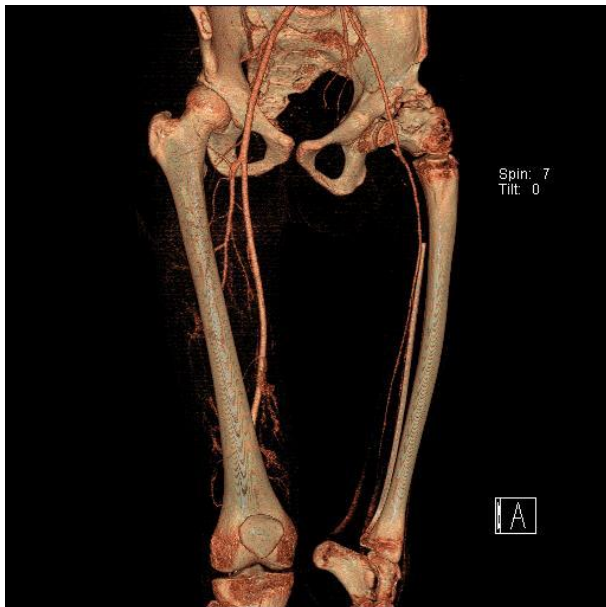


Obr. LXIV. RTG pravého femuru, AP
 projekce. Elongace femuru s fixátérem. Po
 roce následná fixace diafýzy dlahou



Obr. LXV. RTG obou kolen, AP projekce.
 Po prolongaci femuru vpravo se zkrat PDK
 v odstupu pěti let zmenšil

Pacient č. 15 – mužské pohlaví, nar.1991
PFFD vlevo typ II sec. Pappas



Obr. LXVI. CTAG, VRT anteriorní pohled. Stav po zhojené „Knee for hip“ operaci. Kolenní kloub vlevo směřuje ventrolaterálně



Obr. LXVII. CTAG, VRT, šikmý levý anteriorní pohled



Obr. LXVIII. CTAG, VRT, posteriorní pohled



Obr. LXIX. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Stav po „Knee for hip“ operaci

Pacient č. 16 – ženské pohlaví, nar. 1987
PFFD vlevo typ II sec. Pappas



Obr. LXX. CTAG, VRT anteriorní pohled. Stav po zhojené „Knee for hip“ operaci. Kolenní kloub vlevo směřuje ventrálně. Vysoko uložená bifurkace AFC (šipka)



Obr. LXXI. CTAG, VRT, téměř šikmý levý anteriorní pohled



Obr. LXXII. CTAG, VRT, levý šikmý posteriorní pohled



Obr. LXXIII. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. Stav po „Knee for hip“ operaci. S měřítkem

Pacient č. 17 – ženské pohlaví, nar. 1990
PFFD vpravo typ III sec. Pappas



Obr. LXXIV. CTAG, VRT anteriorní pohled. Stav po elongaci diafýzy femuru a v současnosti její fixace dlahou



Obr. LXXV. RTG, pravý femur, AP projekce. Fixace diafýzy dlahou



Obr. LXXVI. RTG, pravý femur, AP projekce. Po sejmutí dlahy v odstupu 3 let šikmá fraktura diafýzy s posunem ad laterus. Linie lomu jsou jen v nepatrném kontaktu hranami



Obr. LXXVII. RTG pravého femuru, AP projekce. Fixace fraktury dlahou

Pacient č. 18 – ženské pohlaví, nar. 1993
PFFD vpravo typ III sec. Pappas



Obr. LXXVIII. CTAG, VRT anteriorní pohled. Stav po prolongaci diafýzy femuru, posun femuru proximálně



Obr. LXXIX. CTAG, VRT anteriorní pohled. Zobrazení tepen i žil. Průběh cév je typický



Obr. LXXX. RTG, pravý femur, AP projekce. Prolongace diafýzy femuru, více distálně



Obr. LXXXI. RTG pravého femuru, AP projekce. 6 let po prolongaci, proximální posun femuru přetrvává s tvorbou neoacetabula

Pacient č. 19 – mužské pohlaví, nar.1995
PFFD vpravo typ III sec. Pappas



Obr. LXXXII. CTAG, VRT anteriorní pohled. Po rekonstrukční operaci dlahy na diafýze femuru způsobuje i artefakty



Obr. LXXXIII. RTG, pravý femur, AP projekce. Dlahy na diafýze femuru po rekonstrukční operaci



Obr. LXXXIV. RTG, celá PDK, AP projekce. Dlahy fixují kosti po prolongaci a korekčních operacích. Diafýza femuru je velmi tenká



Obr. LXXXV. RTG pánve s kyčlemi, AP projekce. 6 let po korekčních operacích bylo nutné provést TEP kyčle s dlouhým dřikem, nahrazující hypoplastickou diafýzu femuru

Pacient č. 20 – mužské pohlaví, nar.1998
PFFD vpravo typ III sec. Pappas



Obr. LXXXVI. CTAG, VRT anteriorní pohled. Stav po korekční osteotomii pravé kyčle, úhlová dlahy v pravé kyčli vytváří artefakt



Obr. LXXXVII. RTG pánve s kyčli, AP projekce. Zkrat femuru a deformace kyčle těsně před naložením úhlové dlahy



Obr. LXXXVIII. RTG pánve s kyčli, AP projekce. Stav po korekční osteotomii pravého kyčle. Úhlová dlahy se po třech měsících zlomila, přesto splnila svůj účel



Obr. LXXXIX. RTG pravého femuru, AP projekce. 7 let po korekčních a prolongačních operacích relativně funkční pravá kyčel

Pacient č. 21 – ženské pohlaví, nar. 2000
PFFD vpravo typ VII sec. Pappas



Obr. XC. CTAG, VRT anteriorní pohled.
Stav po korekční osteotomii pravé kyčle



Obr. XCI. CT, VRT obou DK a pánve,
anteriorní pohled, AP projekce. Zkrat
pravého femuru a dobře zhojená kyčel

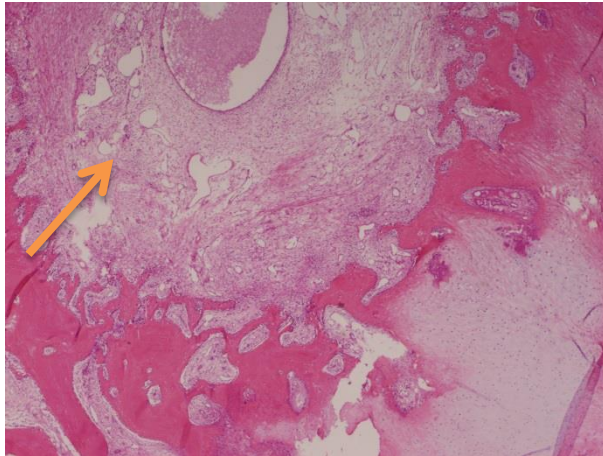


Obr. XCII. RTG pravého femuru, AP
projekce. Stav po korekční osteotomii
acetabula i pravé kyčle

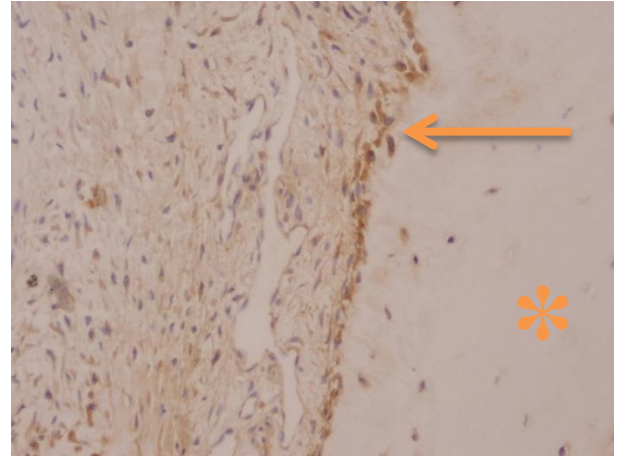


Obr. XCIII. RTG pravého femuru, AP
projekce. 5 let po korekčních a
prolongačních operacích relativně funkční
pravá kyčel

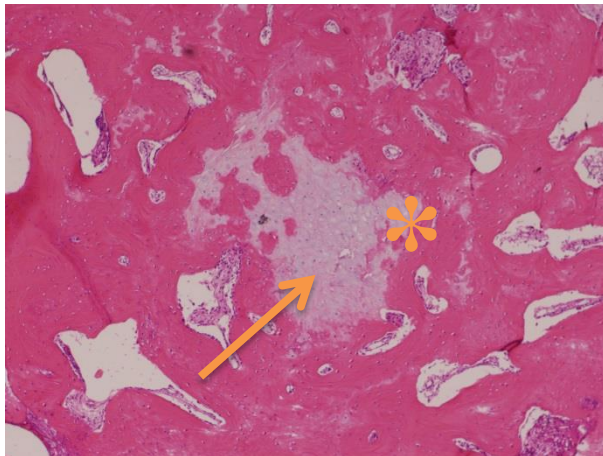
Tkáň z oblasti defektu proximálního femuru. Pacient č. 3 – mužské pohlaví, nar. 1998 – PFFD vpravo typ III sec. Pappas



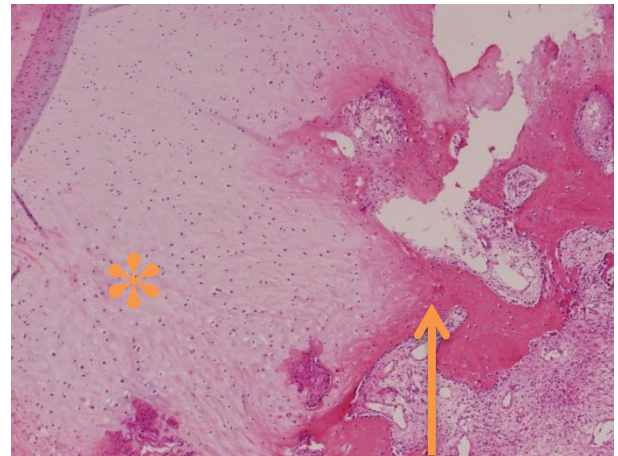
Obr. XCIV. Ložisko osteokartilaginózní tkáně s neosifikovaným vazivovým centrem (šipka). HE 80x zvětšení



Obr. XCV. Osteoblasty na povrchu kostních trámčů s pozitivitou osteokalcinu (šipka). Trámec je označen hvězdičkou. 120x zvětšení

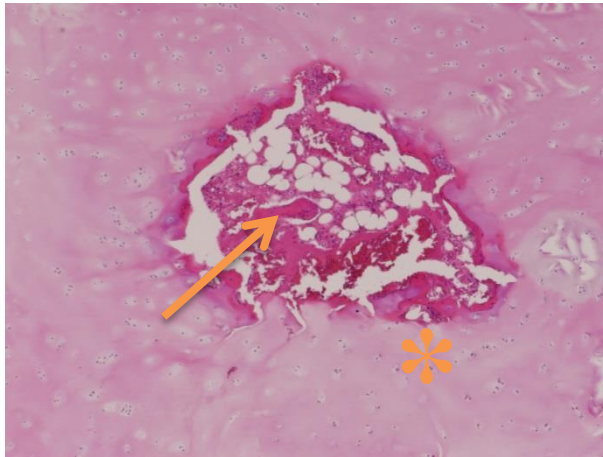


Obr. XCVI. Neosifikovaný ostrůvek chrupavky v kostní tkáni (šipka). Na hranici obou komponent nejsou žádné známky osifikace, obvyklé v osifikačním centru (hvězdička). HE 80x zvětšení

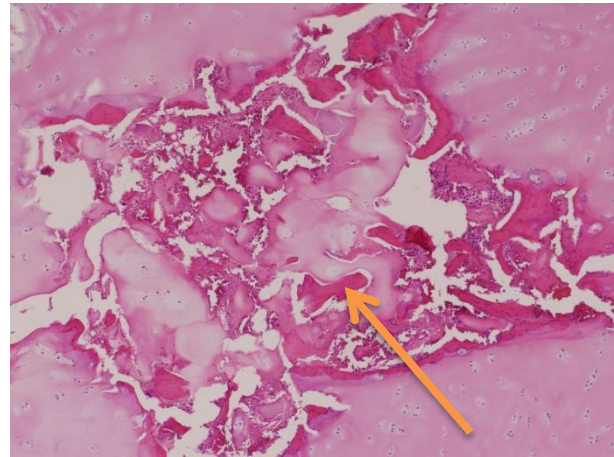


Obr. XCVII. Masa chrupavkové tkáně (hvězdička) je osifikována v podobě úzkého lemu na periferii (šipka). HE 80x zvětšení

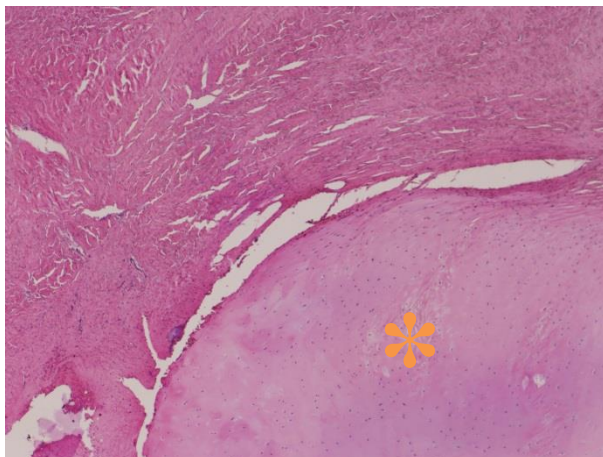
Tkáň z oblasti defektu proximálního femuru. Pacient č. 7 – mužské pohlaví, nar. 2003 – PFFD vlevo typ IV sec. Pappas



Obr. XCVIII. V centru chrupavkové masy je okrsek s náznaky probíhající osifikace s několika kostními trámcí (šipka), avšak bez charakteristických znaků osifikačního centra. Kolumnární uspořádání chrupavky v osifikační zóně na obvodu okrsku zcela chybí (hvězdička). HE 80x zvětšení

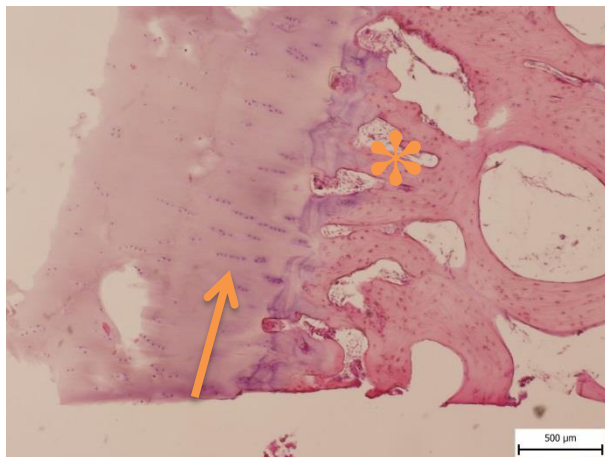


Obr. XCIX. Jiné ložisko s identickým defektem osifikace jako na obr. XCVIII. Kostní trámec je označen šipkou. HE 80x zvětšení

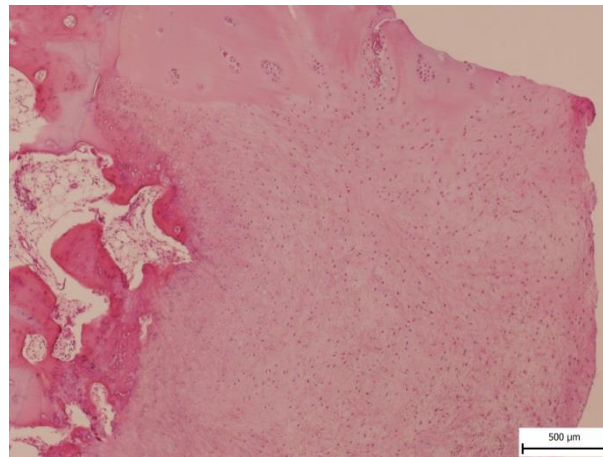


Obr. C. Chrupavkový základ skeletu (hvězdička) je na své periferii ostře ohraničen od okolního vaziva. HE 80x zvětšení

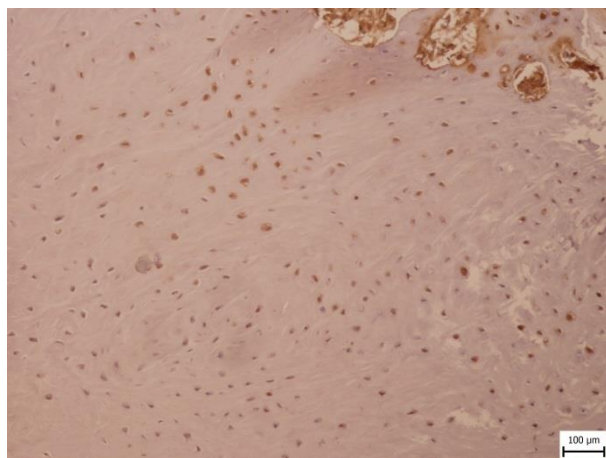
**Biopsie residuální chrupavky
odstraněné z chondrálního defektu před
transplantací**



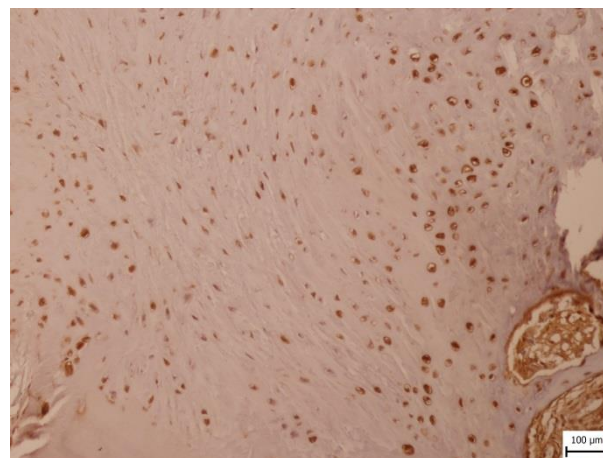
Obr. CI. Zbytek normální hyalinní chrupavky na spodině defektu. Kolumnární uspořádání hypertrofických chondrocytů (šipka) a paralelní kostní trámce na spodině (hvězdička). HE 40x zvětšení



Obr. CII. Úsek fibrózní chrupavky, nahrazující na spodině defektu chrupavku hyalinní. HE 40x zvětšení

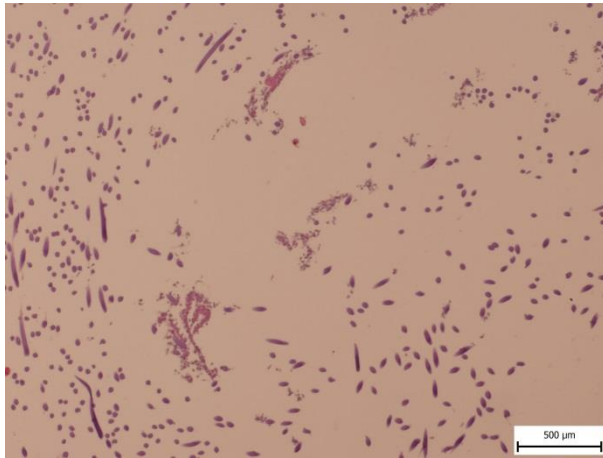


Obr. CIII. Pozitivita alfa smooth muscle actinu (alfa-SMA) v chondrocytech fibrózní chrupavky ze spodiny defektu. 100x zvětšení

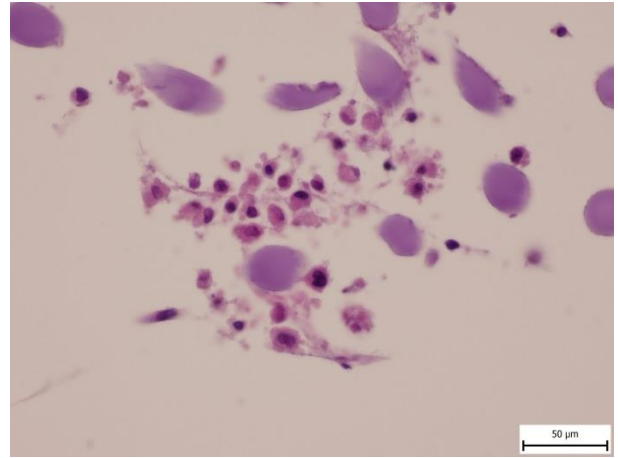


Obr. CIV. Pozitivita S-100 proteinu v chondrocytech fibrózní chrupavky ze spodiny defektu. 100x zvětšení

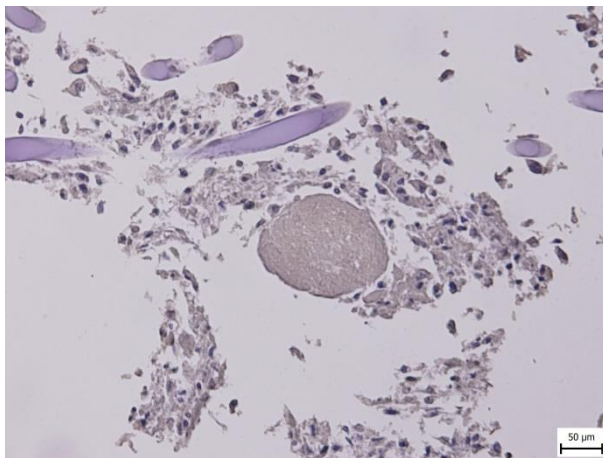
**Hyalograft C – histologický obraz
použitého skafoldu tvořený vlákny
esteru kyseliny hyaluronové**



Obr. CV. Přehledný snímek skafoldu tvořeného vlákny esteru kyseliny hyaluronové a málo diferencovanými elementy. HE 40x zvětšení

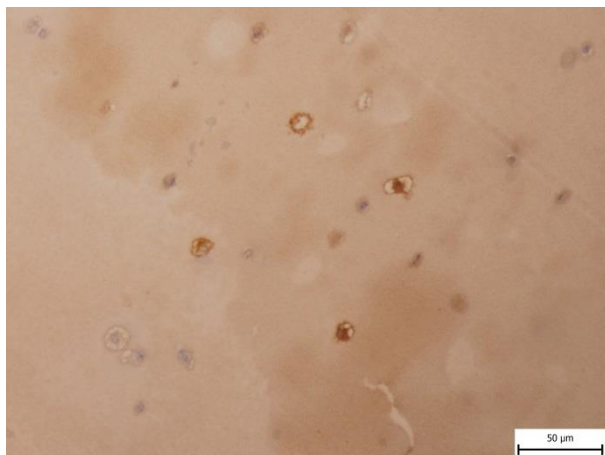


Obr. CVI. Detail klastrů nezralých malých mezenchymových buněk. HE 400x zvětšení

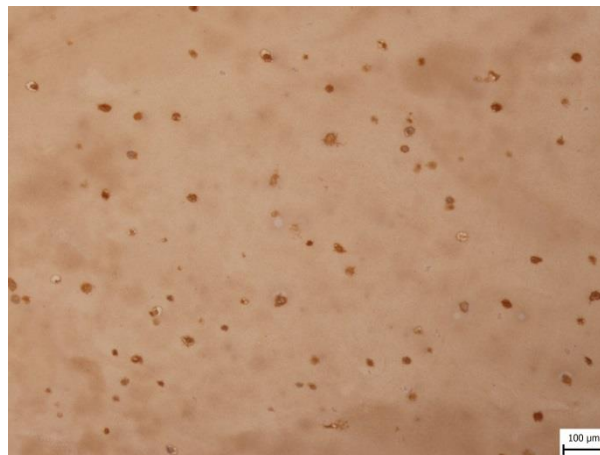


Obr. CVII. Pozitivita S-100 proteinu v buňkách skafoldu nebyla prokázána. 100x zvětšení

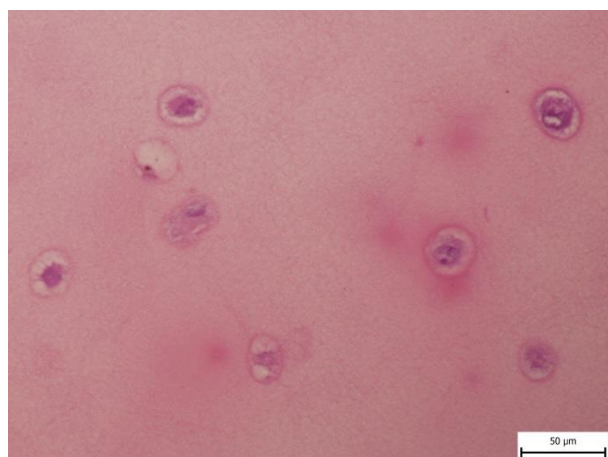
**Chondrograft NTC Brno – histologický
obraz nosiče tvořený vlákny fibrinu,
mezi nimiž jsou nezralé chondrocyty**



Obr. CVIII. Pozitivita alfa-SMA
v chondrocytech chondrograftu. 100x
zvětšení

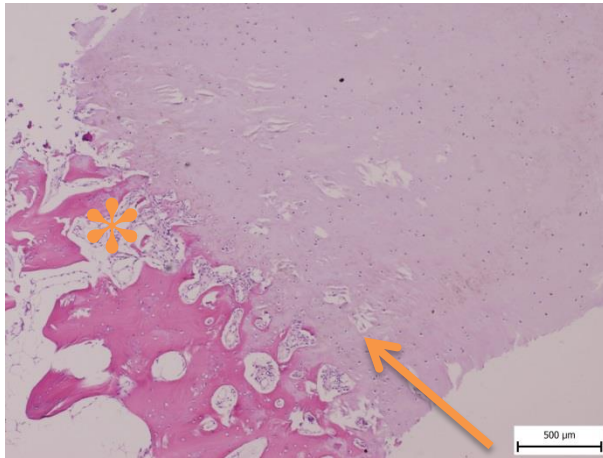


Obr. CIX. Současná pozitivita S-100
proteinu v buňkách chondrograftu. 100x
zvětšení

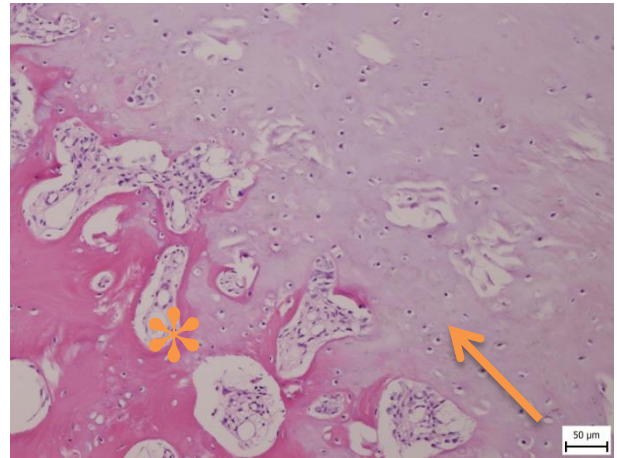


Obr. CX. Lakunární chondrocyty
chondrograftu při větším zvětšení. HE
400x zvětšení

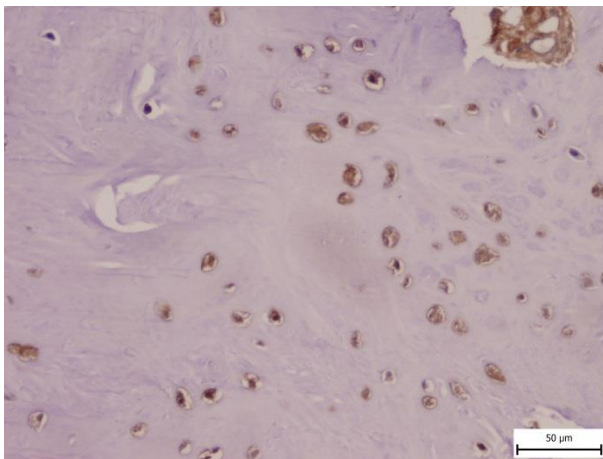
Nově vytvořená chrupavka 10 měsíců po transplantaci Hyalograftu C



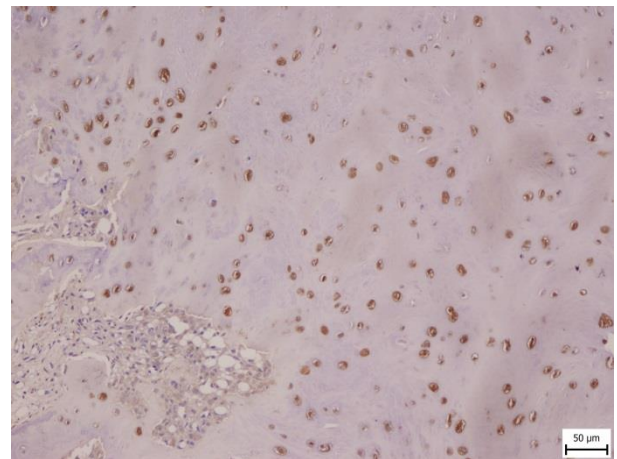
Obr. CXI. Nově vytvořená chrupavka má převážně hyalinní charakter. Sloupcovité uspořádání hypertrofických chondrocytů v hlubokých vrstvách chrupavky chybí (šipka). Kostní plató je vytvořeno inkompletně (hvězdička). Srovnej s obr. XCVI. HE 40x zvětšení



Obr. CXII. Detail chondroosseálního přechodu. Kostní plató je inkompletní (hvězdička), uspořádání chondrocytů ve sloupci není vytvořeno (šipka). HE 200x zvětšení

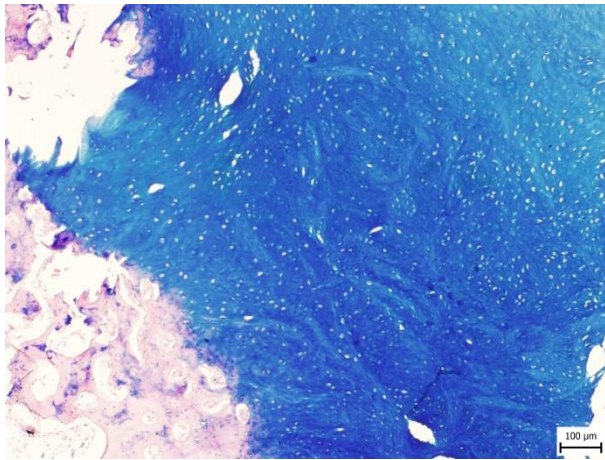


Obr. CXIII. Pozitivita alfa-SMA v buňkách nově formované kloubní chrupavky. 100x zvětšení

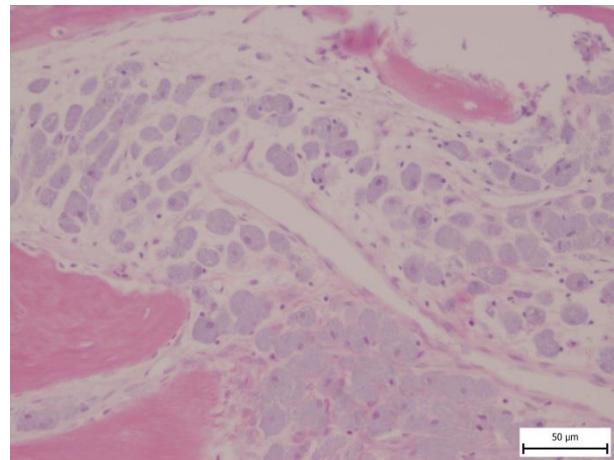


Obr. CXIV. Pozitivita S-100 proteinu v buňkách nově vytvořené kloubní chrupavky jako doklad jejich chondrogenní diferenciace. 100x zvětšení

**Nově vytvořená chrupavka 10 měsíců po
transplantaci Hyalograftu C,
pokračování**

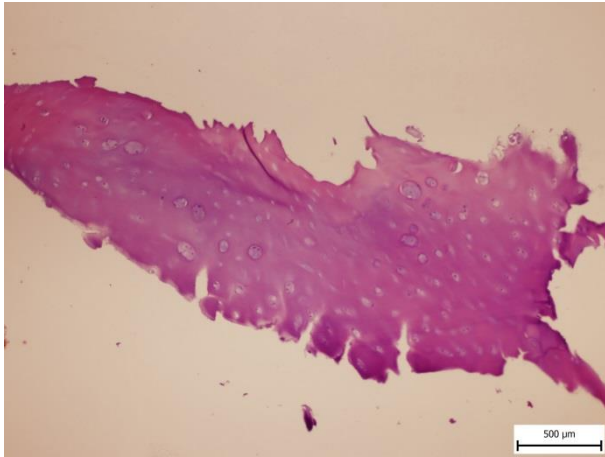


Obr. CXV. Intenzivní zbarvení extracelulární matrix nově vytvořené kloubní chrupavky alciánovou modří. 100x zvětšení

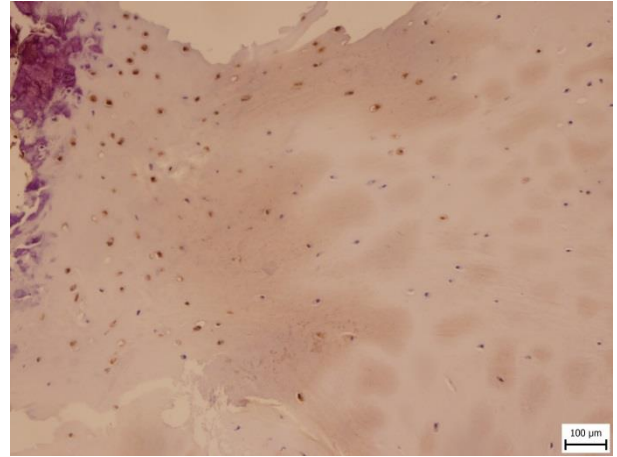


Obr. CXVI. Lokální akumulace makrofágů s modře zbarvenou cytoplasmou, obsahující rezidua fagocytovaných esterů kyseliny hyaluronové z vláken Hyalograftu C. HE 400x zvětšení

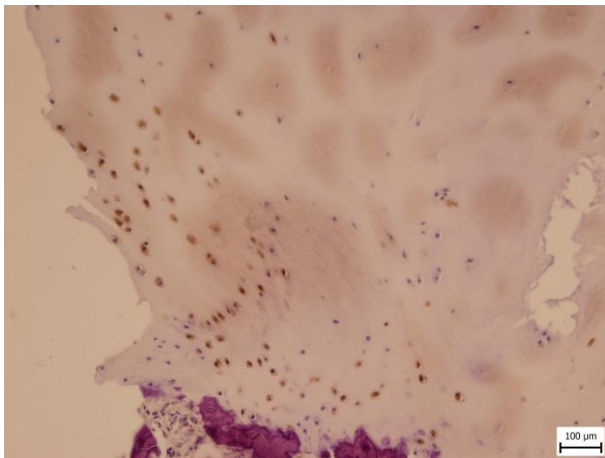
**Chondrograft NTC Brno – chrupavka
10 měsíců po transplantaci nabývající
relativně diferencovaného vzhledu**



Obr. CXVII. Vzorek má vzhled hyalinní chrupavky. HE 40x zvětšení

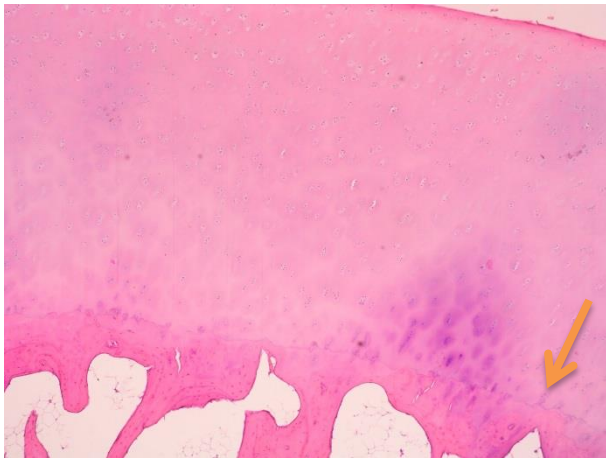


Obr. CXVIII. Pozitivita alfa-SMA v chondrocytech chondrograftu. 100x zvětšení

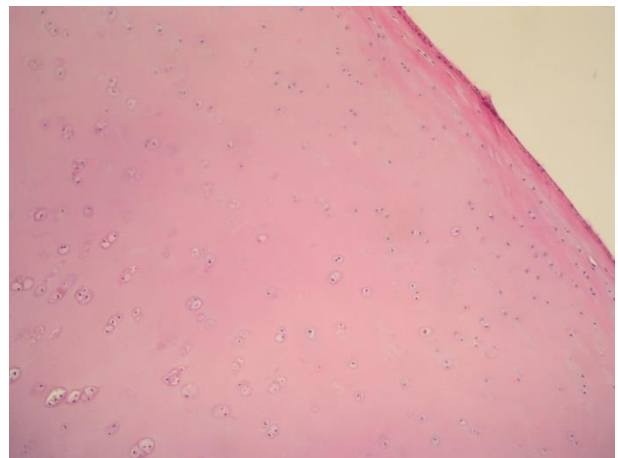


Obr. CXIX. Současná pozitivita S-100 proteinu v chondrocytech. 100x zvětšení

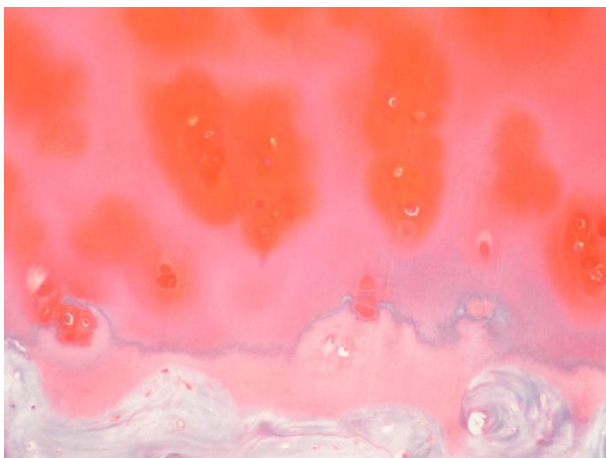
Kontrolní materiál – nezměněná chrupavka



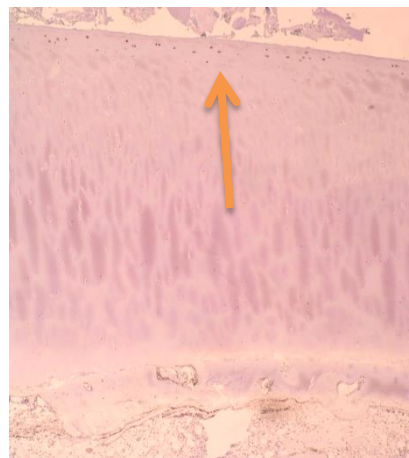
Obr. CXX. Normální hyalinní chrupavka s typickým zonálním uspořádáním. V hlubokých vrstvách přiléhajících ke kostním trámčům jsou paralelně orientované sloupce hypertrofických chondrocytů (šipka). HE 90x zvětšení



Obr. CXXI. Detail povrchových vrstev normální hyalinní chrupavky s přítomností lakunárních chondrocytů. HE 140x zvětšení

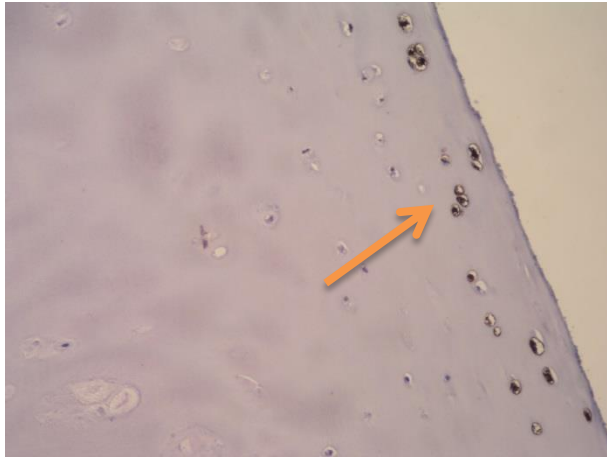


Obr. CXXII. Normální hyalinní chrupavka po obarvení Safraninem O, který znázorní proteoglykany základní hmoty. 140x zvětšení



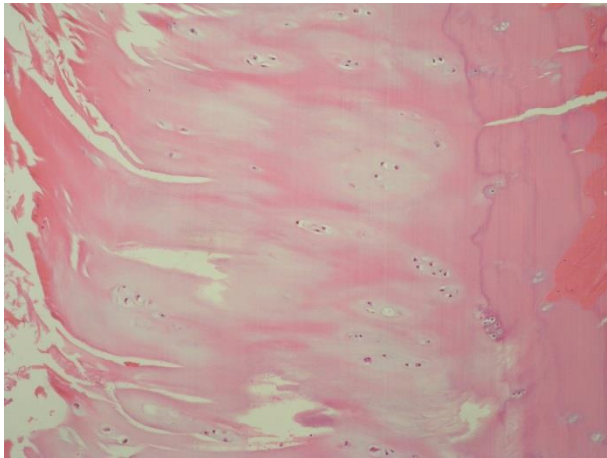
Obr. CXXIII. V normální kloubní chrupavce jsou alfa-SMA přítomny pouze v povrchové vrstvě (šipka). 80x zvětšení

**Kontrolní materiál – nezměněná
chrupavka, pokračování**

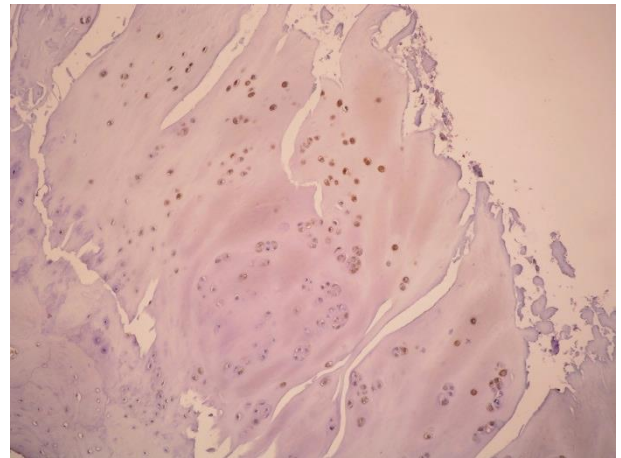


Obr. CXXIV. Detail chondrocytů
pozitivních v reakci průkazu alfa-SMA,
lokalizovaných v horní vrstvě chrupavky
(šipka). 140x zvětšení

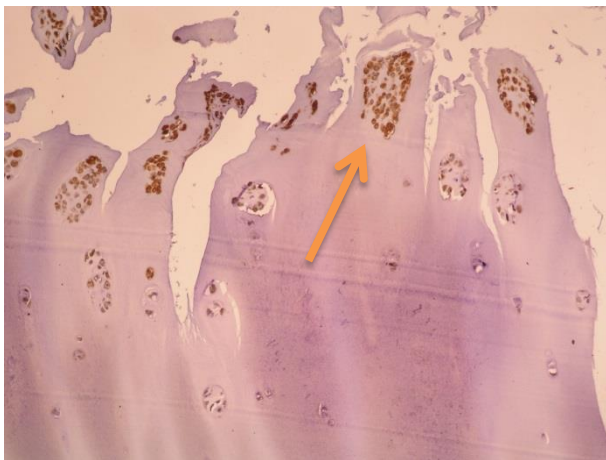
Kontrolní materiál – artrotické změny chrupavky



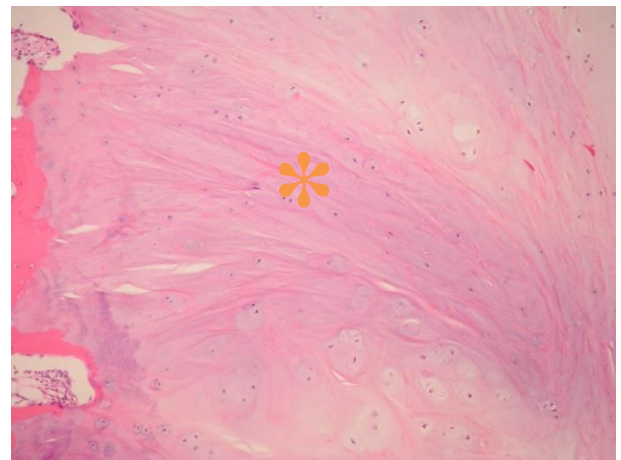
Obr. CXXV. Kloubní chrupavka při osteoartróze. Artrotické změny vedou k tzv. fibrilaci a povrch chrupavky je rozčleněn na menší úseky. HE 140x zvětšení



Obr. CXXVI. Chondrocyty artrotické kloubní chrupavky vykazují v místě fibrilace povrchu zřetelnou pozitivitu alfa-SMA. 140x zvětšení

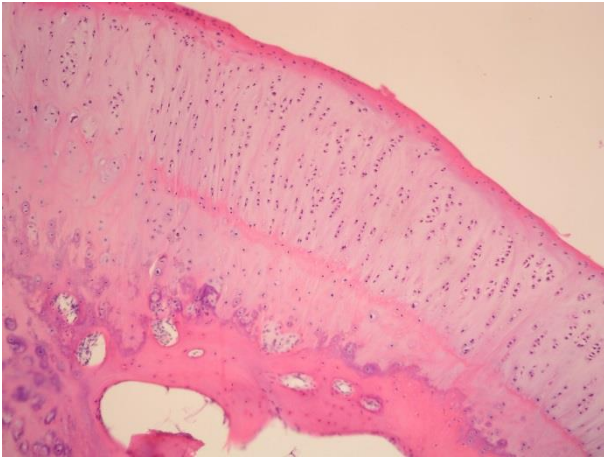


Obr. CXXVII. Chondrocyty se známkami tzv. klonální diferenciace artrotické kloubní chrupavky vykazují zřetelnou pozitivitu alfa-SMA (šipka). 140x zvětšení

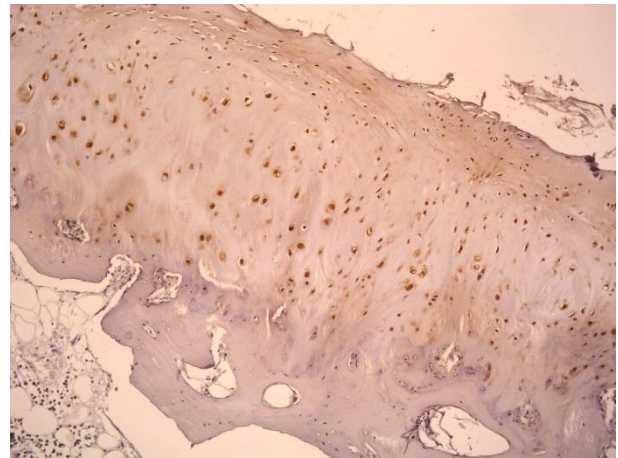


Obr. CXXVIII. Artrotická chrupavka s okrskem vazivové chrupavky s fibrilární úpravou (hvězdička). HE 140x zvětšení

**Kontrolní materiál – artrotické změny
chrupavky, pokračování**



Obr. CXXIX. Výrazné zúžení kloubní chrupavky při artrotických změnách. Chrupavka nabývá převážně vazivového charakteru. HE 140x zvětšení



Obr. CXXX. Ve všech vrstvách zúžené vazivové chrupavky jeví většina chondrocytů pozitivitu alfa-SMA. 140x zvětšení

11. Přiložené publikované práce

THE JOURNAL OF BONE & JOINT SURGERY

JB&JS

This is an enhanced PDF from The Journal of Bone and Joint Surgery

The PDF of the article you requested follows this cover page.

Computed Tomographic Angiography in Proximal Femoral Focal Deficiency

Jiri Chomiak, Martin Horák, Martin Masek, Monika Frydrychová and Pavel Dungal
J Bone Joint Surg Am. 2009;91:1954-1964. doi:10.2106/JBJS.H.00902

This information is current as of August 28, 2009

Reprints and Permissions

Click here to **order reprints or request permission** to use material from this article, or locate the article citation on jbjs.org and click on the [Reprints and Permissions] link.

Publisher Information

The Journal of Bone and Joint Surgery
20 Pickering Street, Needham, MA 02492-3157
www.jbjs.org

Computed Tomographic Angiography in Proximal Femoral Focal Deficiency

By Jiří Chomiak, MD, PhD, Martin Horák, MD, Martin Mašek, MD, Monika Frydrychová, MD, and Pavel Dungal, MD, PhD

Investigation performed at the Departments of Orthopaedics and Radiodiagnostics, Institute for Postgraduate Medical Education and First Faculty of Medicine, Charles University and Teaching Hospital Na Bulovce, Prague, Czech Republic

Background: Because there is limited information concerning the vascular pattern and the role of vessels in patients with proximal femoral focal deficiency, the vascular supply of the lower extremities was studied systematically with use of computed tomographic angiography in order to identify vascular changes, relate any vascular changes to the classification of the deficiency, and establish that there are no major changes in the topographical anatomy of the vessels.

Methods: Standardized computed tomographic techniques were used in twenty-one patients (thirteen boys and eight girls who ranged from one to nineteen years old) with proximal femoral focal deficiency types I through IV and VII, VIII, and IX, according to the Pappas classification.

Results: A common anatomical vascular pattern, in which the hypoplastic extremity was supplied through the femoral artery, was detected in nineteen patients. In patients with Pappas type-I through IV disease, the external iliac, femoral, and deep femoral arteries were substantially reduced in length and diameter and the deep femoral artery arose more proximally in comparison with that in the contralateral extremity; however, in the patients with Pappas type-VII, VIII, or IX disease, the diameters of the arteries and the origin of the deep femoral artery were similar to those of the contralateral extremity. In two patients with Pappas type-III disease, atypical anatomy of the vessels was found. The anterior part of the thigh and the pseudarthrosis were supplied through the femoral artery (the external iliac artery) as a terminal branch, while the remainder of the extremity was supplied from the internal iliac artery, which entered the thigh posterior to the hip as the inferior gluteal artery and continued as the artery to the sciatic nerve to the popliteal artery. No substantial anastomoses were found between the femoral and the posterior arteries in these vascular patterns.

Conclusions: Computed tomographic-angiographic reconstruction can be used to depict the spatial configuration of the pseudarthrosis and the vascular pattern of the extremity in patients with proximal femoral focal deficiency. We found distinct vascular changes in the majority of the involved thighs, but there were no typical changes related to the Pappas classification. Because we found atypical vascular patterns in two patients, evaluation of the vessels with use of various diagnostic methods is recommended in patients with severe types of proximal femoral focal deficiency.

Proximal femoral focal deficiency represents a rare and complex deformity manifested by hypoplasia of variable portions of the femur. Associated components vary according to the type of the deficiency, but the main association is fibular aplasia or hypoplasia. The cause of this malformation remains unknown, but a primary vascular defect probably does not contribute to it¹⁻³. Among the various classifications⁴⁻⁷, we prefer two: the Pappas classification system⁸, which describes

nine classes of abnormalities of the femur together with the associated abnormalities of the lower limb, and the commonly used Aitken classification system⁴. Pappas type I is the absence of the femur. The most challenging patients to treat are those with Pappas types II and III. Pappas type II (Aitken D) is characterized by the absence of the acetabulum and the femoral head, with the remainder of the femoral shaft being hypoplastic and dislocated proximally. In Pappas type III (Aitken

Disclosure: In support of their research for or preparation of this work, one or more of the authors received, in any one year, outside funding or grants in excess of \$10,000 from the Ministry of Health of the Czech Republic (project #0002384101). Neither they nor a member of their immediate families received payments or other benefits or a commitment or agreement to provide such benefits from a commercial entity. No commercial entity paid or directed, or agreed to pay or direct, any benefits to any research fund, foundation, division, center, clinical practice, or other charitable or nonprofit organization with which the authors, or a member of their immediate families, are affiliated or associated.

TABLE I Demographic Data on Patients with Proximal Femoral Focal Deficiency, Vascular Pattern, Other Findings, and Treatment

Case	Sex	Age at Time of Examination (yr)	Pappas Type	Side	Vascular Pattern on Computed Tomographic Angiography	Other Findings	Treatment	Diameter of Femoral Artery in Upper Edge of Symphysis (mm)		Distance of Bifurcation of Femoral Artery in Relation to Triradiate Cartilage* (mm)	
								R	L	R	L
1†	F	3	I	R	Typical		Knee-for-hip procedure	3	5	-9	+29
2†	M	3	III	L	Atypical extremity supply		Pseudarthrosis reconstruction	5	2	+18	-12
3†	M	5	III	R	Atypical extremity supply		Pseudarthrosis reconstruction	1	6	-8	+30
4†	M	7	III	R	Typical		Orthotic device	5	6	0	+17
5†	M	2	III	R	Typical	Hypoplasia of tibia and fibula and 2-ray foot	Orthotic device	8	9	+30	+45
6†	F	1	III	R	Typical		Orthotic device	2	4	-8	+20
7†	M	4	IV	L	Typical		Pseudarthrosis reconstruction	5	4	+23	-5
8†	M	3	IV	R	Typical		Pseudarthrosis reconstruction	2	4	+13	+24
9†	M	3	VII	R	Typical		Lengthening of femur	4	4	+19	+28
10†	M	5	VII	L	Typical	Clubfoot on contralateral side	Valgus osteotomy of femur	5	5	+24	+24
11†	M	7	VIII	R	Typical	4-ray foot	Lengthening of femur	6	6	+33	+31
12†	F	4	IX	L	Typical		Salter osteotomy	5	4	+22	+26
13†	M	6	IX	R	Typical	3 and 4-ray hands	Salter osteotomy	5	4	+32	+19
14†	F	4	IX	R	Typical		Lengthening of femur	4	4	+24	+23
15†	F	13	II	L	Typical	4-ray foot	Knee-for-hip procedure	7	3	+41	-13
16†	M	16	II	L	Typical		Knee-for-hip procedure	8	2	+48	0
17†	F	17	III	R	Typical, with short common iliac artery		Reconstruction and lengthening	5	6	+10	+41
18†	F	13	III	R	Typical		Reconstruction and lengthening	5	6	+19	+27
19†	M	11	III	R	Typical		Reconstruction and lengthening	5	7	0	+59
20†	M	8	VII	L	Typical		Valgus osteotomy and lengthening	5	7	0	+40
21†	F	7	VII	R	Typical		Valgus osteotomy and lengthening	4	7	+25	+20

*Positive values indicate distal direction and negative values indicate proximal direction.†The computed tomography examination was done before any surgical procedure.‡The computed tomography examination was done after the surgical procedure.

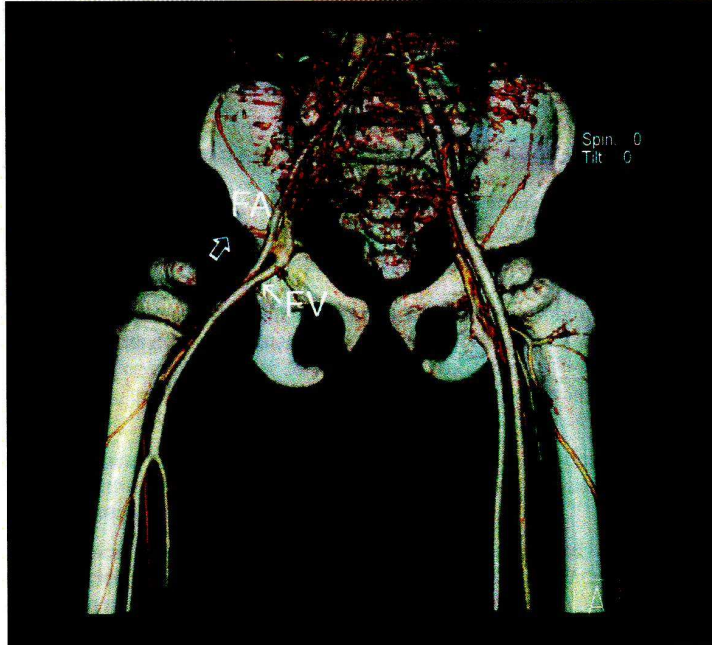


Fig. 1

Case 1. A three-year-old patient who had Pappas type-I proximal femoral focal deficiency on the right side. Computed tomographic angiogram, performed with the volume-rendering technique of reconstruction, showing the vascular pattern of both extremities through the external iliac and femoral vessels. There is only one visible artery approaching the thigh with a diameter of >0.5 mm (thick arrow). FA = femoral artery, and FV = femoral vein (thin arrow).

C), the femoral head and the acetabulum are present, but there is no osseous connection between the femoral head and the femoral shaft. In Pappas type IV (Aitken B), the femoral shaft and head are joined by irregular calcification in a fibrocartilaginous matrix. In Pappas type V, the midshaft of the femur is abnormal, and, in Pappas type VI, the distal part of the femur is hypoplastic and irregular. Pappas type VII (Aitken A) and type VIII represent congenital coxa vara and congenital coxa valga, respectively. In Pappas type IX, the shape of the femur is normal, but it is hypoplastic. The correct categorization of Pappas types II, III, and IV (Aitken D, C, and B, respectively) during early childhood is sometimes difficult, with use of plain radiographs alone. As the patient increases in age, the Pappas type may change. In Pappas types III and IV, the mobility of the proximal femoral epiphysis in the acetabulum plays a crucial role in further treatment, which involves either reconstruction of the pseudarthrosis between the femoral shaft and the proximal part of the femur and/or a salvage procedure (a so-called knee-for-hip procedure). Various imaging methods^{1,3,9-11} have been used to identify (a) whether the proximal femoral epiphysis is in the acetabulum, (b) the mobility of the epiphysis in the acetabulum, and (c) the spatial configuration of the connection between the epiphysis and

the shaft. Because there is limited information concerning the vascular pattern^{1,11} and the role of the vessels in proximal femoral focal deficiency, we sought to study the vascular supply systematically with use of computed tomographic angiography with the purpose of identifying the vascular supply of the femur and the entire lower extremity. Our hypotheses were that (1) there are some vascular changes in proximal femoral focal deficiency in comparison with the normal, contralateral extremity, (2) the vascular changes vary according to the type of proximal femoral focal deficiency, and (3) the primary vascular anatomy does not differ substantially from that of the contralateral, noninvolved extremity.

Materials and Methods

Twenty-one patients (thirteen boys and eight girls, who ranged from one to nineteen years old) with proximal femoral focal deficiency underwent computed tomographic examinations with visualization of the vessels between July 2005 and March 2008 (Table I). Fourteen patients were examined before any surgical treatment, and seven patients were examined after surgery. The proximal femoral focal deficiency in the patients was classified according to the Pappas classification system, with use of plain radiographs initially and later

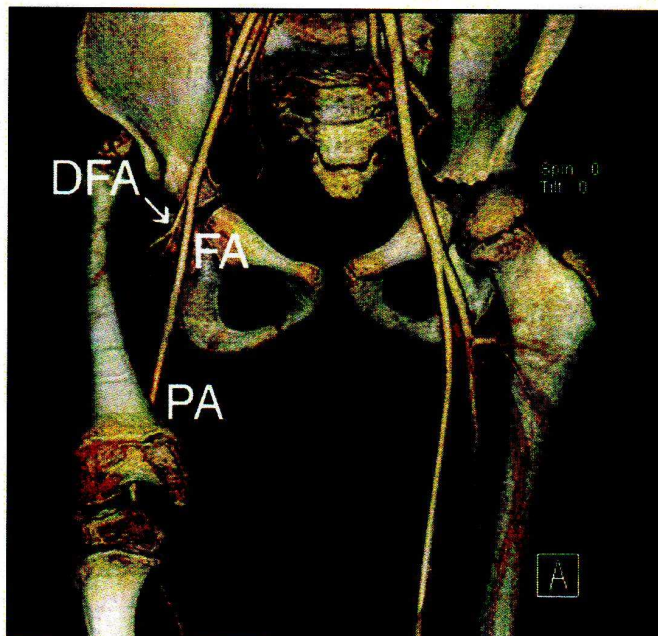


Fig. 2

Case 4. A seven-year-old patient with Pappas type-III proximal femoral focal deficiency on the right side. Anterior computed tomographic angiogram, with the volume-rendering technique of reconstruction, showing the vascular pattern of the extremity supplied through the hypoplastic external iliac and femoral arteries (FA) and the popliteal artery (PA). The deep femoral artery (DFA) supplies the pseudarthrosis. It is substantially reduced in diameter and length, and it arises at the level of the pelvic brim. A small proximal fixed femoral epiphysis is obvious in the dysplastic acetabulum under the femoral artery without an osseous anlage between the shaft and the epiphysis.

by computed tomographic examination. One patient had type-I disease, two patients had type-II (Aitken-D), eight patients had type-III (Aitken-C), two patients had type-IV (Aitken-B), four patients had type-VII, one patient had type-VIII, and three patients had type-IX disease. The right side was predominantly involved in fourteen patients. The feet were normal in eighteen patients, and severe hypoplasia of the tibia and fibula and a two-ray foot was seen in one patient (Case 5). In two patients (Cases 11 and 15), four-ray feet were present. In one patient (Case 13) who had type-IX proximal femoral focal deficiency, three and four-ray hands were present. A clubfoot on the contralateral side was present in one patient (Case 10), who had type-VII proximal femoral focal deficiency. In all patients, the family history was negative for proximal femoral focal deficiency or other congenital anomalies.

Computed tomographic angiography was carried out in the following manner: Iomeron (iomeprol) 400 (in doses of 2 mL/kg of body weight) was injected intravenously with use of the technique of bolus tracking. The examinations were performed with the SOMATOM Sensation 16 scanner until 2005 and with the Sensation 40 since 2006 (both scanners were

from Siemens, Erlangen, Germany) with use of standardized computed tomography techniques, namely, volume rendering, multiplanar reconstruction, and maximum intensity projection techniques. These techniques make it possible to visualize vessels of 0.5-mm diameter and to reduce the radiation doses according to the age and the weight of the patients. The outer diameter of the femoral artery was measured bilaterally at the level of the upper edge of the pubic symphysis. The level of origin of the deep femoral artery was compared with the tri-radiate cartilage level. The average duration of the examination was ten minutes. Short-term general anesthesia was used in younger children, but no anesthesia was used in children who were five years of age or older. The parents of the younger patients and the adult patients were fully informed about the examination and gave their written consent. The ethics committee of our institution agreed with the design of the study.

Source of Funding

The funding source was the Ministry of Health of the Czech Republic (project #0002384101). It did not play a role in the investigation.

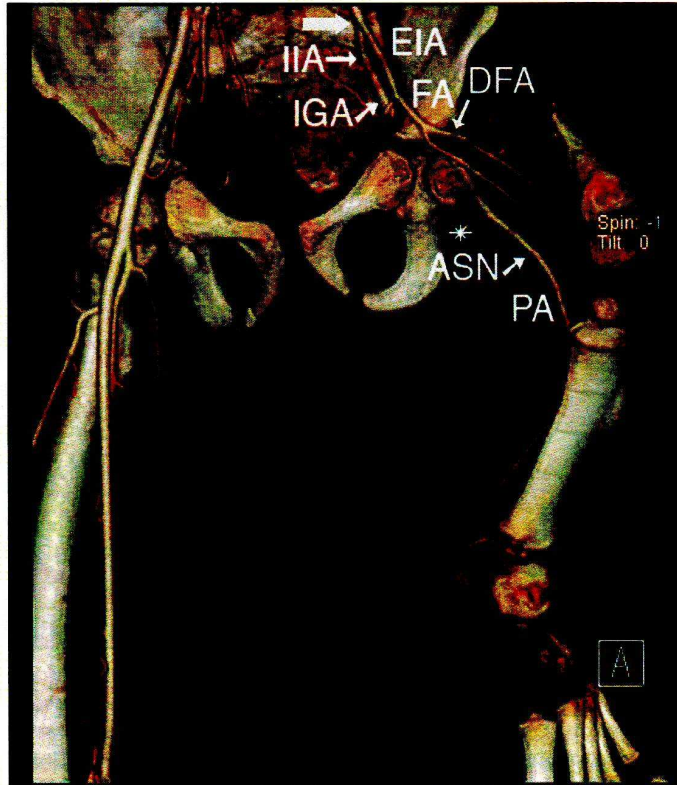


Fig. 3-A

Figs. 3-A through 3-C Computed tomographic angiograms, with the volume-rendering technique of reconstruction, of a three-year-old patient (Case 2) with Pappas type-III proximal femoral focal deficiency on the left side with an atypical vascular pattern. **Fig. 3-A** Anterior image showing the low division of the common iliac arteries into the external and internal iliac artery (thick arrow). The external iliac artery (EIA) is hypoplastic and continues as the femoral artery (FA), which provides a lateral branch (deep femoral artery; DFA) supplying the connection between the epiphysis and the femoral shaft and a medial branch (femoral artery) supplying and terminating in the thigh. The lower extremity is supplied from the internal iliac artery (IIA) through the inferior gluteal artery (IGA), which enters the thigh posterior to the hip and continues as the artery to the sciatic nerve (ASN) and the popliteal artery (PA). One important branch (asterisk) originates from the artery to the sciatic nerve in the middle part of the thigh.

Results

Patients Examined Before Treatment (Cases 1 Through 14, Table I)

In twelve patients, a computed tomographic-angiographic reconstruction showed the typical anatomical vascular pattern of the extremity, in which the hypoplastic extremity and the pseudarthrosis were supplied through the femoral artery as a branch of the external iliac artery, similar to that on the contralateral, normal side, as observed in patients with type-I (Fig. 1), type-III (Fig. 2), and type-IV proximal femoral focal deficiency. The diameters of the external iliac and deep

femoral arteries were reduced in all patients. The diameter of the femoral artery was reduced in types I through IV, whereas in types VII, VIII, and IX, the diameter was the same, or nearly the same, as that on the contralateral side (Table I). The deep femoral artery arose more proximally in contrast to the contralateral side in patients with types I through IV and in one patient with type-VII disease. In the remaining patients with types-VII, VIII, and IX disease, the deep femoral artery arose more distally (three patients) or at the same level (two patients) as that on the uninvolved side. There were no typical changes in the vascular supply corresponding to the Pappas

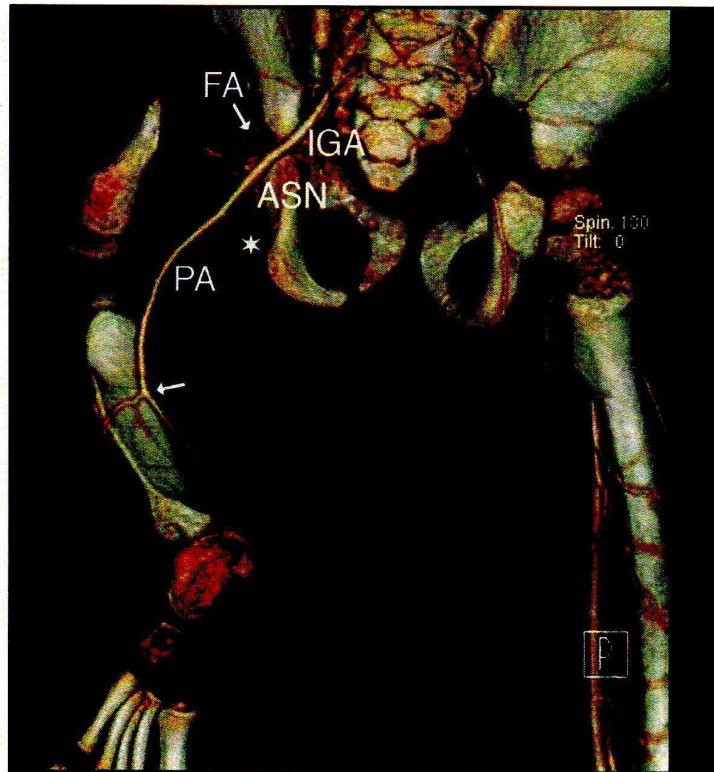


Fig. 3-B
Posterior image showing the inferior gluteal artery (IGA), the branch of the internal iliac artery, which enters the thigh posterior to the hip and continues to the distal part of the thigh and lower leg as the artery to the sciatic nerve (ASN) and the popliteal artery (PA), respectively. One important branch (asterisk) arises on the thigh. No anastomosis with the femoral artery (FA) (arrow) is obvious. The popliteal artery divides into the anterior and posterior tibial arteries in the middle part of the lower leg (arrow).

type of deficiency that could be considered pathognomonic for specific type. Computed tomographic angiography and three-dimensional computed tomographic reconstructions in all patients with Pappas types-I, III, and IV disease showed more precise spatial reconstructions of the pseudarthroses because the vessels help to accentuate the soft-tissue connection. There were no complications of the angiography.

The remaining two patients, who are described below, both had Pappas type-III (Aitken-C) disease and had substantial changes of the entire vascular pattern of the lower extremity.

Case 2: A Patient with Pappas Type-III Disease on the Left Side

On examination with computed tomographic angiography, the femoral neck and proximal two-thirds of the femoral shaft were absent, and the distal hypoplastic shaft was dislocated proximally and connected through a soft-tissue band with the proximal epiphysis. The external iliac artery was hypoplastic and continued as the femoral artery, dividing at the level of the

triradiate cartilage into a lateral branch (the deep femoral artery) and a medial branch (the femoral artery). The lateral branch supplied the pseudarthrosis and terminated in the thigh (Fig. 3-A). The medial branch supplied the muscles and terminated above the knee. The rest of the lower extremity was supplied from the parietal branch of the internal iliac artery, namely, the inferior gluteal artery, which entered the thigh through the greater sciatic foramen, posterior to the hip, and descended between the greater trochanter and the ischial tuberosity to the sciatic nerve (Figs. 3-B and 3-C). This artery accompanied the sciatic nerve as the artery to the sciatic nerve^{12,13} (arteria comitans nervi ischiadici^{12,13}, or the ischiadic artery according to Senior¹⁴) to the distal part of the thigh and continued as the popliteal artery. Only one important branch originated from this artery in the middle part of the thigh supplying the hamstring muscles (Fig. 3-A; asterisk). No substantial visible anastomoses of the inferior gluteal artery or the artery to the sciatic nerve and the deep femoral artery were

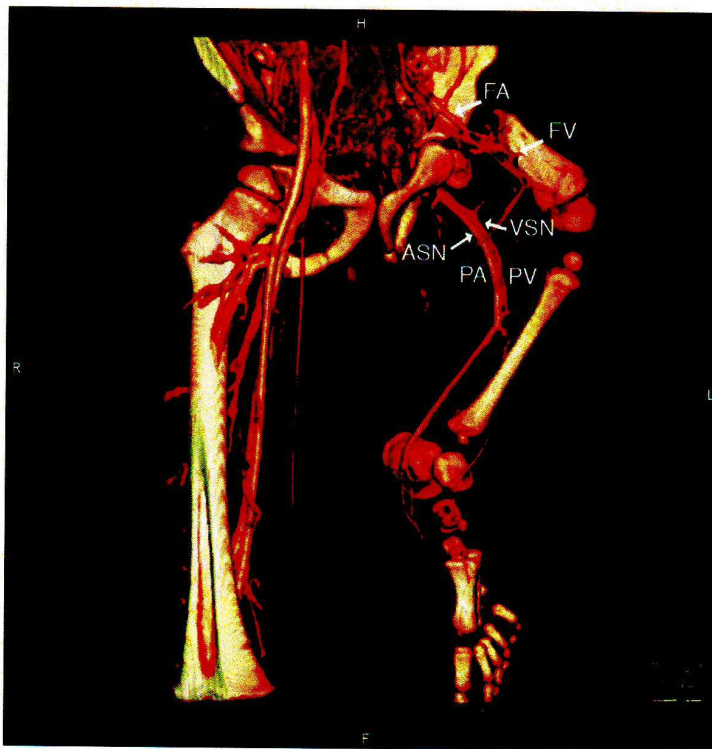


Fig. 3-C

Anterolateral image in the venous phase. The popliteal artery (PA) is conjoined with the popliteal vein (PV), which follows as the vein to the sciatic nerve (VSN) to the inferior gluteal vein and enters the internal iliac vein. The femoral vein (FV) is hypoplastic and drains the blood from the thigh and from the greater saphenous vein. FA = femoral artery, and ASN = artery to the sciatic nerve.

identified, as has been described in anatomical textbooks^{12,13}. The popliteal artery divided into the two typical main branches to the lower leg, namely, the anterior and posterior tibial arteries. This division occurred in the lower half of the leg, more distal than in the normal, contralateral leg (Fig. 3-B). The popliteal artery was accompanied by the popliteal vein, which drained the deep veins of the leg and continued as the vein to the sciatic nerve (vena comitans nervi ischiadici) and after that as the inferior gluteal vein and the internal iliac vein, respectively (Fig. 3-C). The femoral vein was hypoplastic and ran in the typical position in the anterior half of the thigh and drained the blood from the thigh and from the greater saphenous vein. The vascular supply in the contralateral extremity was normal.

Case 3: A Patient with Pappas Type-III Disease on the Right Side

The examination with computed tomographic angiography revealed a hypoplastic and mobile proximal femoral epiphysis in the acetabulum. The femoral neck and proximal one-quarter of the femoral shaft were absent, and the remnant of the shaft was dislocated proximally. Similar to the previous patient

(Case 2), the external iliac artery was hypoplastic and continued as the femoral artery that divided at the level of the triradiate cartilage into a lateral branch (the deep femoral artery) and a medial branch (the femoral artery). The lateral branch supplied the proximal part of the femur, the pseudarthrosis, and the thigh (Fig. 4-A), whereas the medial branch supplied the muscles and terminated above the knee. The remnant of this lower extremity was supplied through the inferior gluteal artery, which continued with the sciatic nerve as the artery to the sciatic nerve (arteria comitans nervi ischiadici^{12,13}) on the posterior part of the thigh (Figs. 4-A and 4-B). This artery entered the popliteal fossa and continued as the popliteal artery. The popliteal artery supplied, through its branches, the knee and thereafter divided into the anterior and posterior tibial arteries in the typical proximal location. Only one branch arose from the artery to the sciatic nerve in the proximal half of the thigh (Fig. 4-B). No anastomoses between these arteries and the femoral artery were seen. The distribution of veins in this patient differed from that in the previous patient because companion veins of the artery to the sciatic nerve were not present. The popliteal artery was conjoined with the popliteal

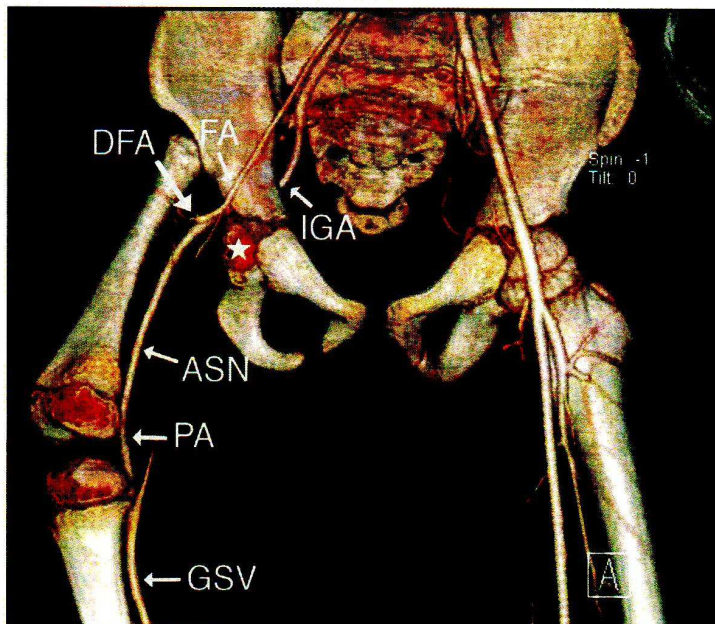


Fig. 4-A

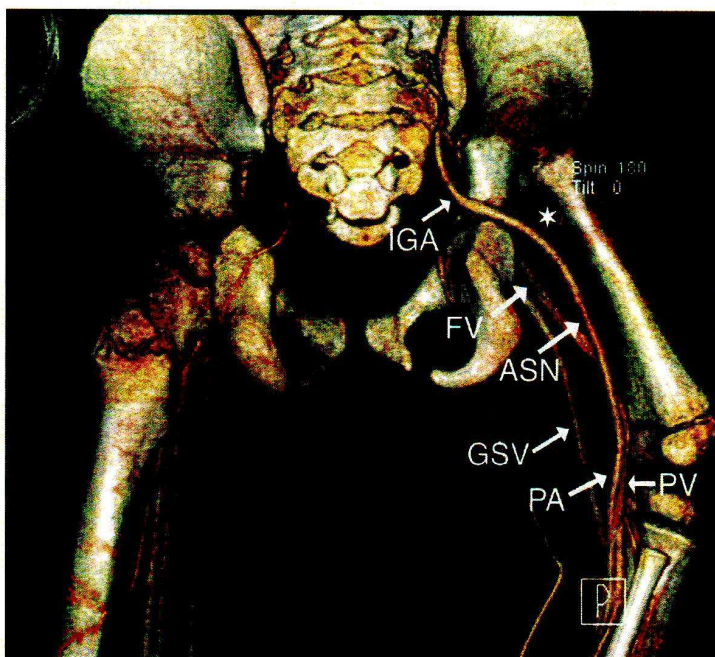


Fig. 4-B

Figs. 4-A and 4-B Computed tomographic angiograms, with the volume-rendering technique of reconstruction, of a five-year-old patient (Case 3) with Pappas type-III proximal femoral focal deficiency on the right side with an atypical vascular pattern. **Fig. 4-A** Anterior image in the arterial phase. The femoral artery (FA) bifurcates into two branches, namely, lateral (deep femoral artery; DFA) and medial (femoral artery). The lateral branch supplies the femur and the pseudarthrosis. Both branches terminate in the thigh. The inferior gluteal artery (IGA) continues to the artery to the sciatic nerve (ASN) and the popliteal artery (PA). The femoral epiphysis (asterisk) is visible in the acetabulum. GSV = greater saphenous vein. **Fig. 4-B** Posterior image in the late arterial phase. The inferior gluteal artery (IGA) enters the thigh and continues to the artery to the sciatic nerve (ASN) and the popliteal artery (PA). One branch (asterisk) arises from this artery in the proximal half of the thigh. The popliteal vein (PV) does not follow the arteries and drains into the femoral vein (FV), which is proximally conjoined with the greater saphenous vein (GSV).

vein, but this vein left the artery in the proximal part of the popliteal fossa and drained into the femoral vein through the adductor canal. The femoral vein ran to the femoral triangle

and, after joining with the greater saphenous vein, continued to the external iliac vein (Fig. 4-B). Importantly, the principal veins of the extremity did not follow the principal arterial

supply of the extremity. The vascular supply on the contralateral side was normal.

In both of the patients described, these atypical vascular patterns were not associated with any further external body deformities, except for the common typical anomalies described in type-III proximal femoral focal deficiency.

The specific treatment of the patients in this subgroup differed (Table I). In both patients with abnormal vascular patterns, the surgery was performed very carefully in order to preserve the vascular supply of the extremities.

Patients Examined After the Treatment (Cases 15 Through 21, Table I)

Seven patients were treated surgically before the examination with computed tomographic angiography according to their age and the type of deficiency. The vascular pattern of the extremities was typical in all, except for the external iliac and deep femoral arteries, which were diminished in their length and diameter in conformance with the shortening and atrophy of the thigh in contrast to the normal, contralateral side. The diameter of the femoral artery (Table I) was reduced in all but one patient (Case 20) in comparison with the normal, contralateral side. The deep femoral artery arose substantially more proximally on the involved side in the patients with types-II and III proximal femoral focal deficiency, whereas it arose more distally in comparison with the uninvolved side in two patients with type-VII disease. High division of the external iliac artery into the deep femoral artery and the femoral artery was also obvious in two patients with types-II and III disease. In one patient (Case 16), the division of the common iliac artery into external and internal iliac arteries was localized between L4-L5, which was 35 mm more proximal than that on the contralateral, normal side. Similar to the previous group of patients, there were no pathognomonic changes in the vascular supply corresponding to the type of proximal femoral focal deficiency.

Discussion

Goldman et al.¹ reported that there is no disturbance of the vessels and nerves in patients with proximal femoral focal deficiency. Pirani et al.¹⁵ described the soft-tissue anatomy of proximal femoral focal deficiency, primarily the muscles, but provided no description of the vessels.

The first of our hypotheses in this study was confirmed, namely, that the majority of patients with proximal femoral focal deficiency show distinct vascular changes in the involved extremity, including reduction of the diameter and length of the arteries in contrast to the unaffected, contralateral extremity. Femoral artery diameters were reduced in all patients with type-I through type-IV disease, whereas the diameters were almost normal in patients with type-VII, VIII, or IX disease. The diameter of the femoral artery was reduced more in the patients with more severe forms of proximal femoral focal deficiency. This may be explained by the nearly similar demands on the blood supply of both lower extremities in types VII, VIII, and IX, whereas muscle and bone mass are

reduced in types I through IV. The reduction in the length of vessels was noted from measurements of the origin of the deep femoral artery. This artery arose more proximally in contrast to the contralateral side in patients with type-I through type-IV disease and in one patient with type-VII disease. In the remaining patients with types VII, VIII, or IX, the deep femoral artery arose more distally (five patients) or at the same level (two patients) in comparison with the uninvolved side. The more proximal origin of the deep femoral artery was expected with the proximal position of the thigh in types I through IV. Why the deep femoral artery arose more distally in the majority of patients with type-VII, VIII, or IX proximal femoral focal deficiency remains unclear. The musculoskeletal development of the extremity in types VII, VIII, and IX is similar to the uninvolved side, and thus common variations of the origin of the deep femoral artery of 2 to 5 cm distal to the inguinal ligament, described in anatomical textbooks¹², may be one possible explanation. In one patient, the division of the common iliac artery was more proximal in comparison with that on the contralateral side.

The second of our hypotheses was not confirmed because there were no changes in the vascular pattern that could be described as specific for a particular type of proximal femoral focal deficiency.

The third of our hypotheses concerning changes in the topographical anatomy of the vessels supplying the extremity in proximal femoral focal deficiency was not confirmed because atypical vascular patterns were found in only two patients, both with Pappas type-III (Aitken-C) proximal femoral focal deficiency. In these two patients, the inferior gluteal artery continued as the artery to the sciatic nerve (arteria comitans nervi ischiadici^{12,13} or ischiadic artery^{14,16}) and then formed the popliteal artery as the main supply of the distal end of the extremity.

What is the explanation for variation in the vascular supply of the extremity? From anatomical studies of lower mammals, it is known that the artery to the sciatic nerve (the ischiadic artery) is the main artery of the lower extremity¹⁷. In human anatomy, the vascular supply of the lower extremity through the inferior gluteal artery and the artery to the sciatic nerve (the ischiadic artery) has been described as a rare variation in otherwise normal extremities^{13,16}. Adachi¹⁶, in 1928, reviewed the history of the description of this variation in fifteen individuals (five had the variation bilaterally) and described one individual with a unilateral ischiadic artery, which continued to the popliteal artery. The femoral artery was hypoplastic and descended to the medial side of the leg as the saphenous artery, which supplied the skin on the medial side of the leg. He described the anastomosis between the femoral artery (the medial superior genicular artery) and the ischiadic artery in the popliteal fossa. The other authors cited in that book¹⁶ described the continuation of the femoral artery to the knee level in seven individuals and its anastomosis with the popliteal artery through the superior genicular artery. Only three authors observed the ending of the femoral artery on the medial side of the leg. We did not observe this continuation of the femoral artery into the leg with anastomoses between the

femoral artery and popliteal artery, similar to the descriptions by Green in 1831, Manec in 1843, and Ellis in 1853, in the book by Adachi¹⁶.

In our two unusual patients, the lateral branch after bifurcation of the femoral artery became the deep femoral artery, and this artery supplied the pseudarthrosis and the femur and terminated in the thigh. The medial branch (probably the femoral artery) supplied the muscles and skin on the medial side of the thigh, but did not continue to the leg. The main vascular supply of the extremity through the inferior gluteal artery and the artery to the sciatic nerve (the ischiadic artery) observed in these two patients can be attributed to the persistence of an embryological pattern of the vascular supply of the lower extremity. From the excellent description of the embryological development of the vascular supply of the lower extremity by Senior¹⁴, it is known that the lower limb is primarily supplied through a primitive artery of the limb, referred to as the axial artery^{12,14}, which courses along the dorsal surface of the thigh and continues to the ischiadic artery. The ischiadic artery enters the popliteal artery, which continues to the leg and foot (in the 6-mm embryonic stage at about 4.0 to 4.5 weeks of gestation). The external iliac artery arises later in the 8.5-mm stage (at about five weeks of gestation) and bifurcates into the inferior epigastric artery and the femoral artery in the 12-mm stage (at approximately six weeks of gestation). The femoral artery runs parallel with and on the medial side of the saphenous nerve and bifurcates into medial and lateral branches. The medial branch later joins the ischiadic artery in the 14-mm stage (at approximately 6.5 weeks of gestation) and participates in the blood supply of the leg. In the 18-mm stage (at approximately 7.5 weeks of gestation), the caliber of the femoral artery gradually exceeds that of the ischiadic artery and individual muscles become differentiated. In the 22-mm stage of development (the end of the eighth week), the continuity of the ischiadic artery has been interrupted and the femoral artery alone conveys blood to the region beyond the knee. The former embryonic axial artery of the lower extremity and the ischiadic artery^{12,14} persist in further development as the inferior gluteal artery and as a very small artery to the sciatic nerve (arteria comitans nervi ischiadici^{12,13}) and terminate in the thigh. This implies that the critical time for connection between the femoral artery and the ischiadic artery is between the 12 and 14-mm stages of development (about 6.0 to 6.5 weeks of gestation). If the femoral artery does not join the ischiadic artery, the ischiadic artery (the artery to the sciatic nerve) remains as the principal vessel supplying the extremity. The cause of this remains unknown. One explanation may be the variable effects of disruption by the development in proximal femoral focal deficiency, which includes defects in the pubic portion of the pelvis, the proximal part of the femur, the patella, the anterior cruciate ligament, the femoral condyles, the fibula, a variable number of lateral and/or axial toes, the talus and cuboid, and, secondarily, all of the nerves, muscles, arteries, and veins associated with fibular development^{18,19}. It is possible that the defects may also include the development of the femoral artery.

What is the clinical relevance of the findings of an abnormal vascular pattern in a lower extremity with proximal femoral focal deficiency? On the basis of our knowledge and reports in the literature, a variation in the embryonic blood supply of the lower extremity through the artery to the sciatic nerve is rare^{13,16}. Because proximal femoral focal deficiency is also rare, namely, 0.2 per 10,000⁵, and two individuals with this variation were found among our twenty-one patients, a greater prevalence of this vascular anomaly in proximal femoral focal deficiency is probable. Therefore, it is our opinion that major vascular variations should be sought in every patient with severe proximal femoral focal deficiency.

Minor vascular variations, which were found in all of our patients, did not change the treatment strategy we used, including the surgical treatment. In the two patients with major vascular changes with the primary blood supply of the extremities occurring through the artery to the sciatic nerve, the surgeon must be careful to avoid damage to the inferior gluteal artery and the artery to the sciatic nerve during any proximal femoral and hip reconstruction. In the knee-for-hip procedure, the risks of vascular injury are similar. The application of a spica cast and the construction of prosthetic or orthotic devices should also respect the atypical vascular supply to avoid applying pressure to the posterior side of the hip and thigh. Because substantial anastomoses between the femoral artery and the inferior gluteal artery and the artery to the sciatic nerve were not found in our patients, the collateral circulation may be problematic after an injury to the inferior gluteal artery and the artery to the sciatic nerve. In addition, the vascular supply of the leg and foot may be impaired.

Visualization of the vessels with computed tomographic angiography is very satisfactory because the least visible diameter is 0.5 mm. Computed tomographic angiography also enables us to visualize the muscles of the extremity using the method of bone removal, similar to that used in magnetic resonance imaging. A disadvantage of our study is the use of computed tomography techniques for the identification of vessels because they involve radiation exposure and the necessity of general anesthesia in very young children. The use of modern equipment and adjusting the intensity according to the age and the weight of the patient can minimize the radiation exposure. The use of intravenous Iomeron (iomeprol) and the rapidity of the whole procedure (a maximum of ten minutes) allows examination without general anesthesia in children who are five years of age and older. Limited visualization of the nerves by computed tomographic angiography, particularly with regard to the sciatic nerve and its relation to the atypical artery of the thigh (the artery to the sciatic nerve), represents a further weakness, but the close position of these structures is visible by careful analysis of selected computed tomography sections.

In conclusion, although only two patients with an atypical vascular supply of the extremity were found, evaluation of the vascular supply in patients with proximal femoral focal deficiency through various imaging methods is recommended as a standard diagnostic procedure, especially in severe types of

proximal femoral focal deficiency. With modern diagnostic methods and respecting these new findings of atypical vascular patterns, the treatment of proximal femoral focal deficiency should be improved. ■

Jiří Chomiak, MD, PhD
Martin Horák, MD

Martin Mašek, MD
Monika Frydrychová, MD
Pavel Dungal, MD, PhD
Departments of Orthopaedics (J.C., M.F., and P.D.)
and Radiodiagnostics (M.H. and M.M.),
Institute for Postgraduate Medical Education
and First Faculty of Medicine,
Charles University and
Teaching Hospital Na Bulovce, Budínova 2,
180 81 Prague 8, Czech Republic.
E-mail address for J. Chomiak: jirichomiak@yahoo.com

References

1. Goldman AB, Schneider R, Wilson PD Jr. Proximal focal femoral deficiency. *J Can Assoc Radiol.* 1978;29:101-7.
2. Boden SD, Fallon MD, Davidson R, Mennuti MT, Kaplan FS. Proximal femoral focal deficiency. Evidence for a defect in proliferation and maturation of chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 1989;71:1119-29.
3. Anton CG, Applegate KE, Kuivila TE, Wilkes DC. Proximal femoral focal deficiency. *Semin Musculoskelet Radiol.* 1999;3:215-26.
4. Aitken GT, editor. Proximal femoral focal deficiency: a congenital anomaly. A symposium on proximal femoral focal deficiency. Washington, DC: National Academy of Sciences-National Research Council; 1969. Proximal femoral focal deficiency—definition, classification and management; p 1-22.
5. Hamanishi C. Congenital short femur. Clinical, genetic and epidemiological comparison of the naturally occurring condition with that caused by thalidomide. *J Bone Joint Surg Br.* 1980;62:307-20.
6. Gillespie R, Torode IP. Classification and management of congenital abnormalities of the femur. *J Bone Joint Surg Br.* 1983;65:557-68.
7. Paley D. Lengthening reconstruction surgery for congenital femoral deficiency. In: Herring JA, Birch JG, editors. *The child with a limb deficiency.* Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1998. p 113-32.
8. Pappas AM. Congenital abnormalities of the femur and related lower extremity malformations: classification and treatment. *J Pediatr Orthop.* 1983;3:45-60.
9. Court C, Carioz H. Radiological study of severe proximal femoral focal deficiency. *J Pediatr Orthop.* 1997;17:520-4.
10. Hillmann JS, Mesgarzadeh M, Revesz G, Bonakpador A, Clancy M, Betz RR. Proximal femoral focal deficiency: radiologic analysis of 49 cases. *Radiology.* 1987;165:769-73.
11. Maldjian C, Patel TY, Klein RM, Smith RC. Efficacy of MRI in classifying proximal femoral focal deficiency. *Skeletal Radiol.* 2007;36:215-20.
12. Warwick R, Williams PL, editors. *Gray's anatomy.* 35th ed. Edinburgh: Longman; 1973. p 162-3, 673-8.
13. Standring S, editor. *Gray's anatomy. The anatomical basis of clinical practice.* 39th ed. Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p 1450, 1470.
14. Senior HD. The development of the arteries of the human lower extremity. *Am J Anat.* 1919;25:55-95.
15. Pirani S, Beauchamp RD, Li D, Sawatzky B. Soft tissue anatomy of proximal femoral focal deficiency. *J Pediatr Orthop.* 1991;11:563-70.
16. Adachi B. *Das arteriensystem der Japaner. Band II.* Kyoto: Verlag der Kaiserlich-Japanischen Universitaet zu Kyoto; 1928. p 36-143.
17. Cihak R. *Anatomie 3.* Prague: Grada Publishing; 1997. p 115.
18. Lewin SO, Opitz JM. Fibular a/hypoplasia: review and documentation of the fibular developmental field. *Am J Med Genet Suppl.* 1986;2:215-38.
19. 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;55:427-32.

ANOMÁLIE CÉVNÍHO ZÁSOBENÍ DOLNÍ KONČETINY U PACIENTŮ S VROZENĚ KRÁTKÝM FEMUREM (PFFD) A VÝZNAM CTAG PŘI JEJICH DIAGNOSTICE

ANOMALIES OF BLOOD SUPPLY TO THE LOWER EXTREMITY IN PATIENTS WITH PROXIMAL FEMORAL FOCAL DEFICIENCY (PFFD): THE VALUE OF CT ANGIOGRAPHY

kazuistika

Martin Horák¹
 Jiří Chomiak²
 Miroslav Kašpar¹
 Zuzana Ryznarová¹
 Martin Mašek¹
 Monika Frydrychová²
 Pavel Dungl²

¹Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a FN Na Bulovce, Praha

²Ortopedická klinika IPVZ a 1. LF UK a FN Na Bulovce, Praha

Přijato: xx. xx. 2007

Korespondenční adresa:

MUDr. Bc. Martin Horák
 Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a FN Na Bulovce
 Budínova 2, 180 81 Praha 8
 e-mail: horakm@fnb.cz

SOUHRN

Horák M, Chomiak J, Kašpar M, Ryznarová Z, Mašek M, Frydrychová M, Dungl P. Anomálie cévního zásobení dolní končetiny u pacientů s vrozeně krátkým femurem (PFFD) a význam CTAG při jejich diagnostice

Vrozeně zkrácený femur (PFFD) je vzácná vrozená anomálie, kterou řadíme mezi onemocnění kyčelního kloubu dětského věku. Na souboru pacientů vyšetřených na počítačové tomografii (CT) i se zobrazením cév pomocí CT angiografie (CTAG) byla popsána ve dvou případech anomálie cévního zásobení postižené dolní končetiny. Hlavní zásobující tepnou se stala arteria iliaca interna a její větev arteria glutea inferior. Zároveň byla nalezena v jednom ze dvou případů i anomálie v žilním řečišti, kdy hluboká žíla stehna sleduje anomální tepenné zásobení a sbírá krev do vena iliaca interna. Nově popsaný nález není jen zajímavost, ale může umožnit i lepší plánování operačního přístupu při korekci anomálie.

Klíčová slova: anomálie cévního zásobení, arteria ischiadica, CTAG, abnormální dolní končetina, PFFD, vrozeně zkrácený femur.

SUMMARY

Horák M, Chomiak J, Kašpar M, Ryznarová Z, Mašek M, Frydrychová M, Dungl P. Anomalies of blood supply to the lower extremity in patients with proximal femoral focal deficiency (PFFD): the value of CT angiography

Proximal femoral focal deficiency (PFFD) is a rare inborn abnormality that belongs to the disorders of hip joint of infant age. Abnormal vascular supply was revealed in two cases examined on CT with vessel visualization using CT angiography (CTA) at the affected lower extremity. Internal iliac artery and its branch inferior gluteal artery were the major supplying arteries. There was also abnormal venous drainage in one of these cases, via a deep vein of the thigh leading blood to internal iliac vein. These findings allow for better planning of the surgical correction treatment.

Key words: anomalous vascular supply, CTA, abnormal lower extremity, sciatic artery, PFFD, proximal femoral focal deficiency.

DEFINICE

Vrozeně krátký femur řadíme mezi onemocnění kyčelního kloubu dětského věku. Jde o spojitou řadu poruch vývoje dolní končetiny různé závažnosti s převahou postižení stehenní kosti. Femur může buď úplně chybět, nebo může být téměř normálně vyvinut pouze s lehkým zkratem. Při časté agenezi zkřížených vazů bývá pravidelně postižena stabilita kolenního kloubu. Zkrácení až chybění fibuly je také pravidelnou součástí všech vývojových stupňů této deformity. Méně časté doprovodné anomálie jsou hypoplazie a lateralizace pately, valgózní koleno, na noze potom chybění laterálních paprsků či kulový hlezenní kloub (1). V neposlední řadě bude právě zde popsán nový objev přidružené anomálie – anomálie cévní.

Maximum patologických změn na skeletu bývá na proximálním femuru, proto se též používá i u nás anglického názvu se zkratkou PFFD (proximal femoral focal deficiency). Lze se setkat i s názvem vrozený paklob kyčelního kloubu.

ETIOLOGIE A INCIDENCE

Výskyt vady je udáván s četností 1–2 na 100 000 novorozenců. Vzhledem k tomu, že některé případy jsou po narození nenápadné, lze předpokládat, že je incidence ještě vyšší. V České republice se ročně vyskytnou minimálně dva nové případy. Nejčastěji se jedná o typ II, III a IV v klasifikaci dle Pappase (2).

Proximální femorální defekt vzniká působením noxy neznámého původu mezi 4.–9. týdnem těhotenství. Do současné doby se nepodařilo zjistit, zda se jedná o virovou infekci, ozáření, chemické, polékové či mechanické vlivy. Muže jít i o kombinaci výše uvedených činitelů (3).

KLASIFIKACE

Existuje několik klasifikací, jedna z nejstarších rozlišuje defekty podle RTG obrazu A–D sec Aitken (4). Ve FN Na Bulovce se nejvíce osvědčila novější klasifikace podle RTG obrazu dle Pappase (2), která dělí kongenitální defekty podle rozsahu postižení do vzestupné řady od I do IX.

Typ I: Femur zcela chybí, acetabulum není vyvinuto, proximální tibia je ve výši kyčelního kloubu.

Typ II: Chybí proximální polovina femuru, acetabulum není vyvinuto.

Typ III: Kyčelní kloub je vytvořen, i když často nedokonalé, hlavice femuru je hypoplastická, ale pohyblivá, později osifikuje.

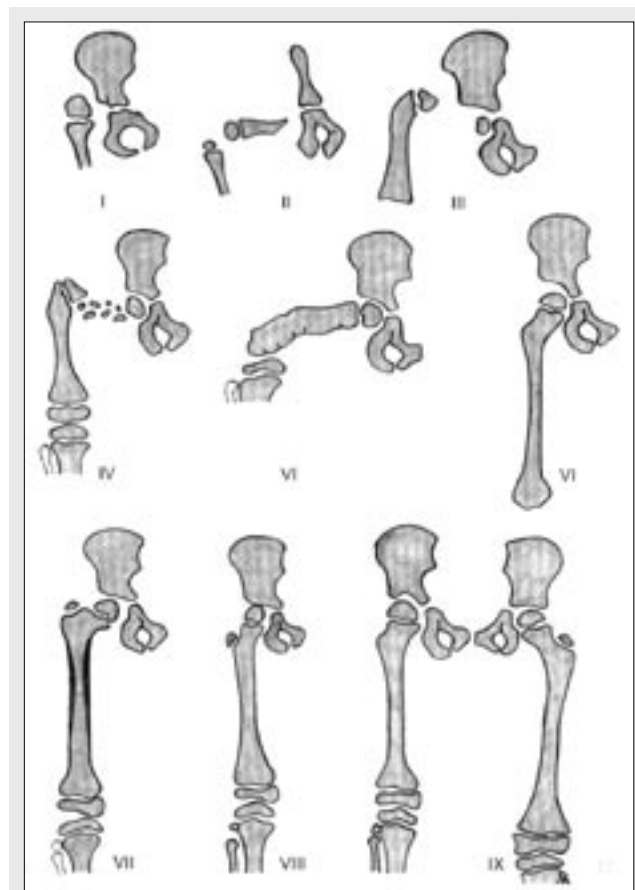
Typ IV: Kyčelní kloub je vytvořen, mezi hlavici a diafýzou femuru je fibrokartilaginózní spojení s ostrůvky kalcifikací.

Typ V: Defekt femuru v diafýze.

Typ VI: Femur je defektní distálně, chybí funkční kolenní kloub, někdy se sdružuje s aplazií fibuly.

Typ VII: Proximální diafýza je skleroticky zúžená, koleno je valgózní, laterální kondyl hypoplastický, česka má tendenci k luxaci.

Typ VIII: Hypoplastický femur s valgózní krčku, hlavice v retroverzi.



Obr. 1. Tabulka klasifikace změn vrozeně krátkého femuru (PFFD) sec Pappas

Fig. 1. Table of classification of differences in proximal femoral focal deficiency (PFFD) sec Pappas

Typ IX: Femur normálního tvaru, avšak hypoplastický proti druhé straně, častá je nestabilita v kolenu (obr. 1).

KLINICKÝ NÁLEZ

Kongenitální defekt je nápadný ihned po narození, některá hypoplazie se odkryje až během růstu. U nejčastěji se vyskytujících defektů je stehno krátké, masivní, nožka postižené strany stojí často v úrovni protilehlého kolena nebo končí v úrovni proximálního bérce. Končetina je v abdukci, zevní rotaci a flexi v kyčli, velmi často přetrvává proximální posun femuru. Koleno bývá ve flexi. Často chybí fibulární paprsek nohy, chodidlo je ve valgózním postavení. Zkrat se s věkem zvětšuje, bez léčení se na konci růstového období pohybuje mezi 5 cm u IX až do 40 cm u II a III. Konzervativní terapie spočívá v protetické péči. Chirurgické řešení je dlouhodobé a komplikované, většinou probíhá v etapách po celé dětství a dospívání, zahrnuje prolongace, korekční osteotomie, derotace a na zdravé končetině i epifyzeodézy (1, 5) (obr. 2A,B).

METODIKA

Ve FN Na Bulovce je od poloviny roku 2006 používán CT přístroj Siemens Somatom Sensation 40 (Erlangen, Německo), před tím byl používán CT přístroj Siemens Somatom Sensation 16 (Erlangen, Německo). Samotný protokol se



▲ Obr. 2A



▲ Obr. 2B

Obr. 2A,B. **Příklad zobrazení skeletu PFFD typ II pravé dolní končetiny**
A – rtg snímek AP pravé dolní končetiny; B – CT 3D rekonstrukce pánve – VRT
anteriorní pohled

Chybí celý femur s výjimkou distální epifyzy femuru s patrnými kondylly, patela
není osifikována. V kyčli chybí hlavice femuru, acetabulum je velmi strmé.

Fig. 2A,B. **An example of skeletal finding in PFFD type II of the right
lower extremity**

A – radiograph, anteroposterior view of the right lower extremity; B – CT 3D re-
construction of pelvis – VRT, anterior view

The whole femur is missing except for the distal epiphysis with visible condyls,
patella is not ossified. The femoral head is missing in the hip joint, the acetabu-
lum is very steep.

příliš nezměnil, jen byl přizpůsoben možnostem novějšího rychlejšího přístroje. Náběr dat je prováděn kolimací 0,6 mm, pitch 0,9. Rekonstrukční inkrement 0,5 se šíří obrazu 0,6 mm v kernelu 10. Nastavení kV a mAs na lampě je korigováno podle věku a váhy pacienta s minimalizací dávky. Náběr dat je prováděn nativně a po podání kontrastní látky Iomeprolum 400 (Iomeron 400, Altana Pharma) v dávce 2 ml/kg rychlostí 4 ml/s ve dvou fázích arteriální a venózní. Na správné načasování se používá technika Bolus timing. Kontrastní látka je podávána tlakovým injektorem Ulrich Missouri (Ulm, Německo) (7, 8).

3D rekonstrukce skeletu se provádí z nativního náběru dat ve VRT obrazu. Postkontrastně se provádí multiplanární rekonstrukce (MPR) rekonstrukce v 5 mm širokých řezech s posunem 5 mm v sagitální a frontální rovině. Další rekonstrukce se provádí v tenkých řezech maximum intensity projection (MIP) šíře 50 mm s posunem 5 mm v sagitální a frontální rovině. Celý obrazový dataset se dále zpracovává ve volume rendering technique obrazech (VRT) ve vhodném náklonu. V případě odstranění skeletu metodou Bone Removal, případně Editací objektu, se opakuje zobrazení cév VRT rekonstrukcí a doplňuje se MIP rekonstrukce celého 3D objemu dat (7).

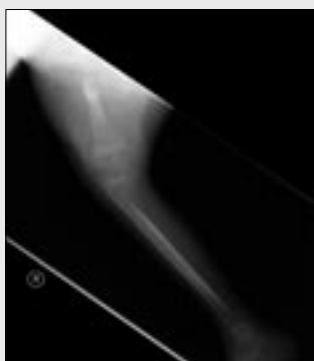
Ortopedická klinika ve spolupráci s Radiodiagnostickou klinikou FN Na Bulovce vede dlouhodobý registr pacientů s PFFD z celé České republiky. V současné době obsahuje již více jak 60 pacientů s různými typy postižení. V posledních třech letech se rozvinula diagnostika pacientů s PFFD na CT, a to i s podáním k.l. i.v. a s vyšetřením cév obou dolních končetin pomocí metody CTAG. Během doby od VI/2005 do III/2007 let bylo vyšetřeno 17 pacientů ve věkovém rozmezí 1–19 let na CT, a to vždy i s provedením CTAG se zachycením cév v arteriální i venózní fázi.

Pacienti jsou pravidelně sledováni a snímkováni klasickým RTG na předozadní snímek pánve a případně dolní končetiny

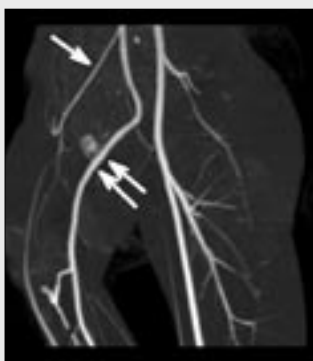
ny dle požadavků kliniků. I když se jedná o dětské pacienty, bylo jako další zobrazovací metoda zvoleno vyšetření pomocí CT. Důvodem je diagnostický přínos, a to především ve správném zobrazení skeletu, jeho vymodelování do 3D obrazu VRT technikou, což nejlépe informuje ortopedy o prostorové topologii celé dolní končetiny. Zároveň s vyšetřením skeletu se ihned podává k.l. i.v. a provádí se CTAG, kde se zobrazují probíhající cévy na postižené dolní končetině. Rekonstrukce se provádí jak v MIP, tak VRT obrazech, zároveň se u prokázaných cévních anomálií prováděly i rekonstrukce s odstraněním skeletu, a tedy ještě s lepší vizualizací dané cévní anomálie (7). Další výhodou CT vyšetření je i jeho rychlost, neboť s dětmi ve věku 3–4 roky se lze již domluvit, aby vydržely několik minut v klidu, a tak může být většina malých dětí vyšetřena bez použití celkové anestezie. Zároveň je část vyšetřovaných pacientů již po prvních korekčních operacích s implantovanými kovy, a proto by bylo případné vyšetřování na magnetické rezonanci (MR) pro implantovaný kovový materiál ve vyšetřované oblasti téměř nemožné. Navíc vzhledem k délce MR vyšetření by bylo nutné malé dětské pacienty téměř vždy vyšetřovat v celkové anestezii.

VÝSLEDKY

V 15 případech byl průběh cév na dolních končetinách anatomicky normální. Nicméně ve dvou případech byla nalezena rozsáhlá anatomická anomálie v cévním zásobení postižené dolní končetiny, dosud v odborné literatuře nepopsaná. V obou případech se jednalo o pacienty s PFFD typ III sec Pappas, kde dolní končetina byla zásobena cestou arteria iliaca interna. Domníváme se, že v prenatálním vývoji došlo k hypertrofii arteria glutea inferior, čemuž odpovídá průchod tepny skrze foramen infrapiriforme (8). Tato tepna nejspíše dále pokračuje jako hypertrofická a. comitans nervi ischiadi-



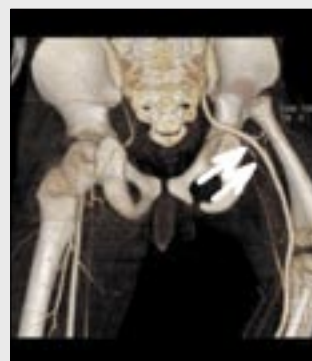
▲ Obr. 3A



▲ Obr. 3B



▲ Obr. 3C



▲ Obr. 3D

Obr. 3A–D. Případ 1: PFFD typ III pravé dolní končetiny

A – rtg snímek AP pravé dolní končetiny; B – CTA pánve, anomálně probíhající tepna a. ischiadica (dvě šipky), hypoplastická a. iliaca externa/a. femoralis (jedna šipka), MIP s odstraněním skeletu; C – VRT šikmý anteriorní pohled; D – VRT posteriorní pohled na průběh cév

Fig. 3A–D. Case 1: PFFD type III of the right lower extremity

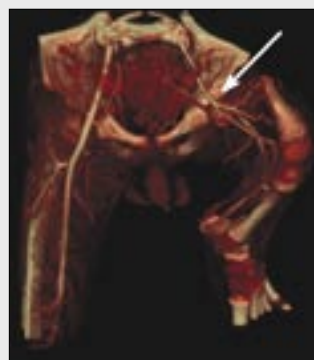
A – radiograph, anteroposterior view of the right lower extremity; B – CTA of the pelvis, abnormally running sciatic artery (two arrows), hypoplastic external iliac artery and femoral artery (single arrow), MIP with bone removal; C – VRT anterior oblique view; D – VRT posterior view of the course of the arteries



▲ Obr. 4A



▲ Obr. 4B



▲ Obr. 4C



▲ Obr. 4D



▲ Obr. 4E



▲ Obr. 4F

Obr. 4A–F. Případ 2: PFFD typ III levé dolní končetiny

A – rtg snímek pánve AP; B – CTA pánve a stehna, anomálně probíhající tepna a. ischiadica (dvě šipky), hypoplastická a. iliaca externa/a. femoralis (jedna šipka), MIP s odstraněním skeletu; C – VRT kranioanteriorní pohled; D – VRT anteriorní pohled; E – VRT posteriorní pohled; F – VRT v levé posteriorní pozici v žilní fázi se zobrazením arterií i žil, podél jasně a. ischiadica probíhá málo zřetelná červená céva: hlavní hluboká žíla postižené končetiny (vena ischiadica)

Fig. 4A–F. Case 2: PFFD type III of the left lower extremity

A – radiograph, anteroposterior view of the pelvis; B – CTA of pelvis and thighs shows abnormally running artery – sciatic artery (two arrows), hypoplastic external iliac and femoral arteries (single arrow), MIP with bone removal; C – VRT, cranioanterior view; D – VRT, anterior view; E – VRT, posterior view of the course of the arteries; F – VRT, left posterior view in venous phase shows both arteries and veins, less conspicuous vein (in red) runs parallel to the sciatic artery: the main deep vein (sciatic vein) of the affected extremity

ci (a. ischiadica je hlavní tepnou dolních končetin u nižších obratlovců (9)) a postupně se v obou případech přesunuje do oblasti Hunterova kanálu, kde již pokračuje klasicky jako a. poplitea s následným anatomickým dělením na tepny bérce. Samotná arteria iliaca externa je v obou případech hypoplastická a slouží jen k zásobení části svalů, převážně adduktorů, na celkově zkráceném stehně postižené dolní končetiny. Diagnostika výše popsané cévní anomálie může mít zásadní vliv i na správnou volbu operační terapie.

Případ 1: Chlapec narozený v roce 2000 s postižením pravé dolní končetiny s PFFD typ III sec Pappas

Na skeletu pravé dolní končetiny je patrná ageneze proximální třetiny stehenní kosti pouze se zachovalou hypoplastickou hlavicí kyčle. Na CT je sice hůře, avšak dostatečně zřetelně patrný vazivový pruh spojující hlavicí kyčelní a distální skelet femuru.

Na CTAG se zobrazuje anomální průběh tepen, kde dolní končetina je zásobena cestou arteria iliaca interna. Patrná je hypertrofická arteria glutea inferior, která dále pokračuje jako hypertrofická a. comitans nervi ischiadici do oblasti Hunterova kanálu. Poté již pokračuje anatomicky jako a. poplitea s obvyklým dělením na tepny bérce. Samotná arteria iliaca externa je hypoplastická a slouží jen k zásobení části svalů na celkově zkráceném stehně postižené dolní končetiny.

Žíly bérce jsou zachovalé, vena poplitea vede Hunterovým kanálem a dále přechází do vena femoralis a pokračuje mediálně až k hypoplastické a. femoralis k tříslu. V pánvi probíhá jako v. iliaca externa. Průběh je tedy anatomický, nesleduje průběh hypertrofické a. comitans nervi ischiadici (obr. 3A–D).

Případ 2: Pacient narozený v roce 2002 s postižením levé dolní končetiny s PFFD typ III sec Pappas

Na skeletu levé dolní končetiny je patrná aplazie proximálních dvou třetin femuru, distální třetina je hypoplastická se zachovalou distální epifýzou. Skelet kolenního kloubu je zachovalý, kloubní plochy jsou kongruentní. Na CT lze diferencovat vazivový pruh spojující hypoplastickou hlavicí kyčelní a distální skelet femuru. Hlavice kyčle je v úrovni acetabula, které je však málo vyvinuté, velmi ploché a strmé.

Na CTAG se zobrazuje anomální průběh tepen obdobně jako v případě 1. Dolní končetina je opět zásobena cestou arteria iliaca interna. Je patrná hypertrofická arteria glutea inferior, která dále pokračuje jako hypertrofická a. comitans nervi ischiadici a postupně se přesunuje do oblasti Hunterova kanálu, kde probíhá jako a. poplitea s následným ana-

tomickým dělením na tepny bérce. Samotná arteria iliaca externa je hypoplastická, arteria femoralis slouží jen k zásobení mediálních a ventrálních svalových skupin na celkově zkráceném stehně postižené dolní končetiny.

Na žilním systému bérce nejsou patrné anatomické odchylky. Oproti případu 1 jsou patrné změny na stehně, kde vena poplitea pokračuje Hunterovým kanálem a sleduje dále n. ischiadicus a hypertrofickou a. comitans nervi ischiadici jako v. comitans nervi ischiadici (vena ischiadica). Do pánve probíhá jako přítok v. glutea inferior a vlévá se do v. iliaca interna. Vena femoralis je hypoplastická a sbírá krev hlavně ze stehna a z povrchových žil pravé dolní končetiny přes vena saphena magna (obr. 4A–F).

DISKUZE

Bylo prokázáno, že u pacientů s PFFD je velmi výhodné použití CTAG vzhledem k rychlosti vyšetření a k možnosti získání kvalitní prostorové topologie skeletu i cév současně.

V našem souboru pacientů byla ve dvou případech – vždy u typu III sec. Pappas – zjištěna cévní anomálie. Postižená dolní končetina byla v těchto případech zásobena z povodí a. iliaca interna přes hypertrofickou a. glutea inferior – a. comitans nervi ischiadici (a. ischiadica). Zajímavostí je, že a. ischiadica je hlavní tepnou dolních končetin u nižších obratlovců. Za normálních okolností dominantní a. iliaca externa je zde hypoplastická a zásobuje pouze část svalů stehna. Co se týče žilního systému dolních končetin, byl zachycen anomální průběh pouze v jednom z obou případů, kdy hlavní žíla hlubokého žilního systému dolní končetiny sleduje průběh n. ischiadicus, a krev tedy odvádí v. iliaca interna. Ve druhém případě má žilní systém anatomický průběh.

Získané poznatky o anomáliích v cévním zásobení dolní končetiny u pacientů s PFFD jen potvrzují celkovou komplexnost a složitost této vrozené vývojové vady, která vzniká časně prenatálně v době zakládání končetin.

Význam informace o stavu cévního zásobení spočívá v možnosti navržení vhodnějšího operačního přístupu při korekci vady.

Nález cévní anomálie u PFFD je velmi cenný, dosud nikde v literatuře nebyl publikován. Vyšetřování dalších pacientů bude na RDG klinice FN Na Bulovce dále pokračovat s cílem získat dostatečně velký soubor vyšetřených pacientů, který umožní statisticky zjistit frekvenci výskytu popsané anomálie v cévním zásobení dolní končetiny.

LITERATURA

- Dungl P, et al.** Ortopedie. Praha: Avicenum, Grada Publishing 2005.
- Pappas AM.** Congenital abnormalities of the femur and related lower extremity malformations: classification and treatment. *J Pediatr Orthop* 1983; 3(1): 45–60.
- Gillespie R.** Classification of congenital abnormalities of the femur. In Herring JA, Birch J, eds. *The Child With a Limb Deficiency*. Chicago, USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1998.
- Aitken GT.** Proximal femoral focal deficiency-Definition, classification, and management. In: Aitken GT (ed.) *Proximal Femoral Focal Deficiency. A Congenital Anomaly*. Washington, DC, USA: National Academy of Sciences 1969.
- Murray RO, Jacobson HG, Stoker DJ.** *The Radiology of Skeletal Disorders: exercises in diagnosis*. New York: Churchill Livingstone 1990: 37–38.
- Ferda J, Novák M, Kreutzberg B.** *Výpočetní Tomografie*. Praha: Galén 2002.
- Ferda J.** *CT Angiografie*. Praha: Galén 2004.
- Čihák R, et al.** *Anatomie Vol. I*. Praha: Avicenum, Grada Publishing 1987.
- Čihák R, et al.** *Anatomie Vol. III*. Praha: Avicenum, Grada Publishing 1997.

Original article

Comparison of the Cellular Composition of Two Different Chondrocyte-Seeded Biomaterials and the Results of Their Transplantation in Humans

(tissue engineering of cartilage / autologous chondrocyte transplantation / biopsy and immunohistochemical analysis / HYAFF 11 / fibrin scaffold)

M. HORÁK¹, M. HANDL², A. PODŠKUBKA³, R. KAŇA⁴, J. ADLER⁵, C. POVÝŠIL⁶

¹Department of Radiology, Homolka Hospital, Prague, Czech Republic

²Department of Orthopedics, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³Department of Orthopedics, Teaching Hospital Na Bulovce, Prague, Czech Republic

⁴Department of Otorhinolaryngology, General University Hospital, Prague, Czech Republic

⁵Tissue Bank, University Hospital Bohunice, Brno, Czech Republic

⁶Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract. Our study compares the histological and immunohistochemical cellular composition of two different chondrocyte-seeded biomaterials and the results of their transplantation. Our study cohort included 21 patients, comprising 19 men and two women with a mean age of 32 years, who were affected by single chondral lesions of the femoral condyles. These patients were enrolled in our study and treated with arthroscopic implantation of the tissue Hyalograft C and/or Brno culture. Brno culture bioengineered with a fibrin-based scaffold contains round cells showing features of differentiated chondrocytes expressing S-100 protein and α -smooth muscle actin. In contrast, in the case of Hyalograft C, the scaffold was made up of a fibrillar network composed of biomaterial fibres of the esters of hyaluronic acid and cells resembling fibroblasts and myofibroblasts and expressing only α -smooth muscle actin. The average size of the defects was 2.5 cm². Patients were evaluated using the standardized guidelines of the International Knee Documentation Committee. During the comparison of bioptic samples obtained from both patient cohorts, we did not observe any important differences in the histological makeup of the newly formed cartilage. This was predominantly composed

of hyaline cartilage with small areas of fibrocartilage. The histological analysis of these two groups of homogeneous patients shows that this bioengineered approach, under proper indications, may offer favourable and stable clinical results over time, in spite of the different matrix and cellular composition of the two transplants used.

Introduction

Articular cartilage defects are a major problem in orthopedic surgery (Magnusen et al., 2008). Since cartilage shows little tendency for self-repair, injuries persist for years, and their healing is very limited and can eventually lead to further degeneration of the joint. Fibrocartilage, which is mechanically and chemically inferior to hyaline cartilage, is the predominant repair tissue found in articular defects. The treatment of isolated defects may therefore prevent or delay the development of osteochondritis. During the past decades, many investigations have pursued techniques to stimulate articular cartilage repair or regeneration (Brittberg et al., 1994; Hendrickson et al., 1994; Frenkel et al., 1997; Lee et al., 2003; Tognana et al., 2007; Pelttari et al. 2008).

Surgical standard techniques such as drilling or microfracturing of subchondral bone, debridement, osteotomy, mosaicplasty, transplantation of autographs from non-weight bearing zones into former defect area, and soft tissue grafts, such as perichondrium, periosteal flap, joint capsule, or fascia (Magnusen et al., 2008) have the potential to stimulate formation of new articular surface and improve the joint function. However, in the majority of cases they are not able to restore normal articular cartilage (Buckwalter and Mankin, 1998a).

Received July 3, 2013. Accepted August 27, 2013.

This work was supported by grant PRVOUK- P27/LF1/1.

Corresponding author: Martin Horák, Department of Radiology, Homolka Hospital, Roentgenova 2, 150 00 Prague 5, Czech Republic. e-mail: martin.horak@homolka.cz

Abbreviations: ACT – autologous chondrocyte transplantation, QC – quality control.

The most modern methods involve the use of autologous chondrocyte transplantation (ACT) by different techniques (Henrickson et al., 1994; Hollander et al., 2003, 2006; Lee et al., 2003; Knutsen et al., 2004; Podškebka et al., 2006; Filardo et al., 2011). The third generation of ACT is based on using autologous chondrocyte-seeded biomaterials as cell carriers. According to the original method described by Brittberg et al. (1994) the chondrocyte suspension was injected into the defect and covered by a periosteal flap. This was not always optimal, because the periosteal flap fixation was not always ideally strong or even water proof, and this resulted in chondrocyte loss. For this reason, the modifications of the original technique consist in improved fixation of cultured chondrocytes using a suitable three-dimensional carrier scaffold. Such a chondrograft is ready for immediate use and convenient for the surgeon because of its mechanical properties. The size and thickness of the graft is possible to adapt according to the cavity size and depth. Hydrogels most closely mimic the natural highly hydrated cartilage. Among the materials used have been demineralized bone, polylactic acid, polyglycolic acid, hydroxyapatite/Dacron composites, fibrin, collagen gels, and collagen fibres (Frenkel et al., 1997). The list of products which are commercially available or entering clinical trials for cartilage engineering are reported by Coates and Fisher (2010).

We had the opportunity of comparing the cell composition of two different chondrocyte-seeded biomaterials and compare the results of their transplantation when different scaffolds for cartilage regeneration were used in two groups of patients. In our study, we also compared the immunophenotype of transplanted cell-seeded biomaterials and chondrocytes in new-formed articular cartilage. The results of our study are summarized in this article, and we are confident that no similar work has been presented in the literature so far.

Material and Methods

Patients

A cohort of 21 patients; 19 men and two women with the mean age of 32 years, affected by a single posttraumatic chondral lesion of the femoral condyles, were enrolled and treated with arthroscopic implantation of the two different bioengineered tissues Hyalograft C (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy) and Brno Chondrograft (Tissue Bank, University Hospital Brno-Bohunice, Czech Republic) with a fibrin-based scaffold. The average size of the defects was 2.5 cm². Patients were evaluated using criteria standardized by the International Knee Documentation Committee (Mainil-Varlet et al., 2002). All patients gave informed consent for arthroscopy and biopsy examinations in accordance with local ethical committee guidelines. Standard serological tests (HIV 1/ HIV 2 Antibody, Hepatitis B Surface Antigen, Hepatitis B Core Antibody, Hepatitis C Antibody, test for Syphilis) were required.

The part of clinical findings of this study has been reported elsewhere, and these have confirmed improvement of knee function and symptoms in more than 90 % of patients (Podškebka et al., 2006).

The samples analysed in our work represent a series of biopsies received in our laboratory from 12 patients treated with Hyalograft C in the Prague Orthopedic Clinic of Bulovka Hospital and nine patients treated with Brno culture in the Orthopedic Clinic of Prague Motol Hospital.

The first step was arthroscopic verification of the articular cartilage defect. During this examination, we obtained samples from the thin layer of residual cartilage filling the traumatic defect of the articular cartilage surface of the distal femur (N = 21). Simultaneously, a small piece from the low-weight-bearing femoral cartilage was removed for culture.

Chondrocytes isolated from the low-weight-bearing cartilage of patients were expanded in a monolayer culture, seeded onto Hyalograft C scaffolds, and cultured for a further 14 days as previously described (Grigolo et al. 2002; Tognana et al., 2007) in an Italian laboratory. The second type of culture was a fibrin-based scaffold prepared in the Brno laboratory. Cartilage tissue was cleaned and cut into small pieces under laminar air flow hood conditions. The fragments of cartilage were treated with 0.2% trypsin and 0.2% collagenase to digest the matrix and to isolate the chondrocytes. The released chondrocytes were propagated by conventional monolayer technique. The chondrocytes suspended in Ham's F12 medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 12% foetal bovine serum and gentamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were inoculated into the flasks and cultured in a carbon dioxide (environment) atmosphere at 37 °C. During successful primocultivation, the cell monolayer was formed via subculturing the primoculture, and the required number of cells was obtained.

Proliferation of chondrocytes was monitored using inverted phase contrast microscopy. The quality control (QC) of the process was done periodically and included QC of cultured chondrocytes (morphology and viability) and QC of the culture medium (microbiological controls). The combination of chondrocytes with fibrin glue resulted in a solid graft formation.

The cell-loaded scaffold was implanted into traumatic cartilage lesions in the knee which were first debrided as necessary. Most were at the medial femoral condyles, though some were at the lateral condyles.

During second-look arthroscopy, which was performed 10–12 months after autologous-chondrocyte transplantation, samples from the newly formed cartilage at the site of the posttraumatic chondral defect were obtained (N = 21).

We evaluated the quality of the repair tissue generated *in vivo* following implantation of autologous chondrocytes seeded onto hyaluronic acid-based scaffolds (Hyalografts C) or fibrin glue scaffolds in humans.

Tissue processing

Histopathological examination

Samples of the articular cartilage obtained during the first and second arthroscopy, and the remaining scaffolds used for transplantation were processed without decalcification. Following fixation in buffered 10% formalin for 72 h, the samples were processed with paraffin and sectioned into 5-micron sections. Each section was stained with haematoxylin and eosin to evaluate the general morphology and cell organization. Staining with safranin O (Fluka Chemie GmbH, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) enabled evaluating the content of proteoglycans. Polarized light was used to examine the collagen organization of the cartilage samples.

Each biopsy was scored histologically and the cartilage tissue was classified as hyaline, fibrocartilage, or mixed tissue, according to the guidelines of ICRS (Mainil-Varlet et al., 2002). For each biopsy, we set out to determine: 1) the histological organization; 2) the relative proportions of hyaline and fibrocartilage; 3) the abundance of extracellular matrix; 4) the immunophenotype of cartilage cells; 5) the presence of the residual scaffold.

Immunocytochemical staining

For the purposes of immunohistochemical studies, we used the avidin-biotin complex (ABC) technique. Primary monoclonal antibodies against S-100 protein (1 : 600, DAKO, Glostrup, Denmark); S-100 A1 and A2 protein (Labvision Corp. Neomarkers, Westinghouse,

Fremont, CA); S-100 proteins A4 and A6 (1 : 200, Neomarkers); S-100 protein P (1 : 40, RnD Systems, Minneapolis, MN); S-100 protein A10 (ready to use, Neomarkers); (α -smooth muscle actin (1 : 100, Sigma, St. Louis, MO); muscle-specific actin HHF35 (1 : 100, DAKO); desmin (1 : 200, DAKO); CD68 (1 : 50, DAKO); CD34 (1 : 50, DAKO); Ki67 (1 : 50, DAKO); and anti-human collagen type II (1 : 100, Santa Cruz, CA) were applied. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with non-immune mouse serum.

Results

Defective cartilage removed before transplantation

In our cohort, we examined samples of residual chondral tissue of the chondral defects. In some samples the original structure of hyaline cartilage was partly preserved (Fig. 1a). The base of the defects was composed of a deep cartilage layer including the residua of calcified cartilage tissue. In other cases, there were regions composed of cellular fibrous cartilage (Fig. 1b) with an admixture of original articular hyaline cartilage showing features of degeneration consistent with that of osteoarthritis. In such cases, we observed degenerative changes including superficial fibrillation, cartilage fragmentation, and chondrocytes in the process of clonal grouping.

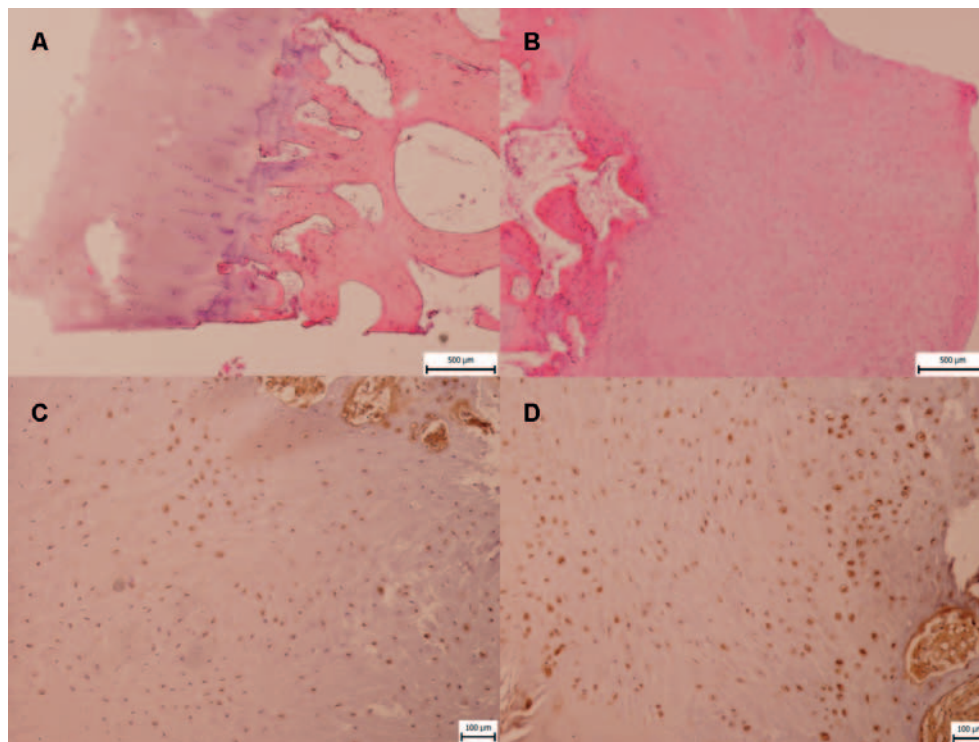


Fig. 1. Biopsy specimens of the residual chondral tissue removed from the chondral defects before transplantation. Residual cartilage was only composed of deep layers of the normal structure (a). In some cases original hyaline cartilage was substituted with predominant fibrous cartilage (b) HE \times 40. Chondrocytes of the fibrous cartilage expressed α -smooth muscle actin and S-100 protein (c, d) \times 100.

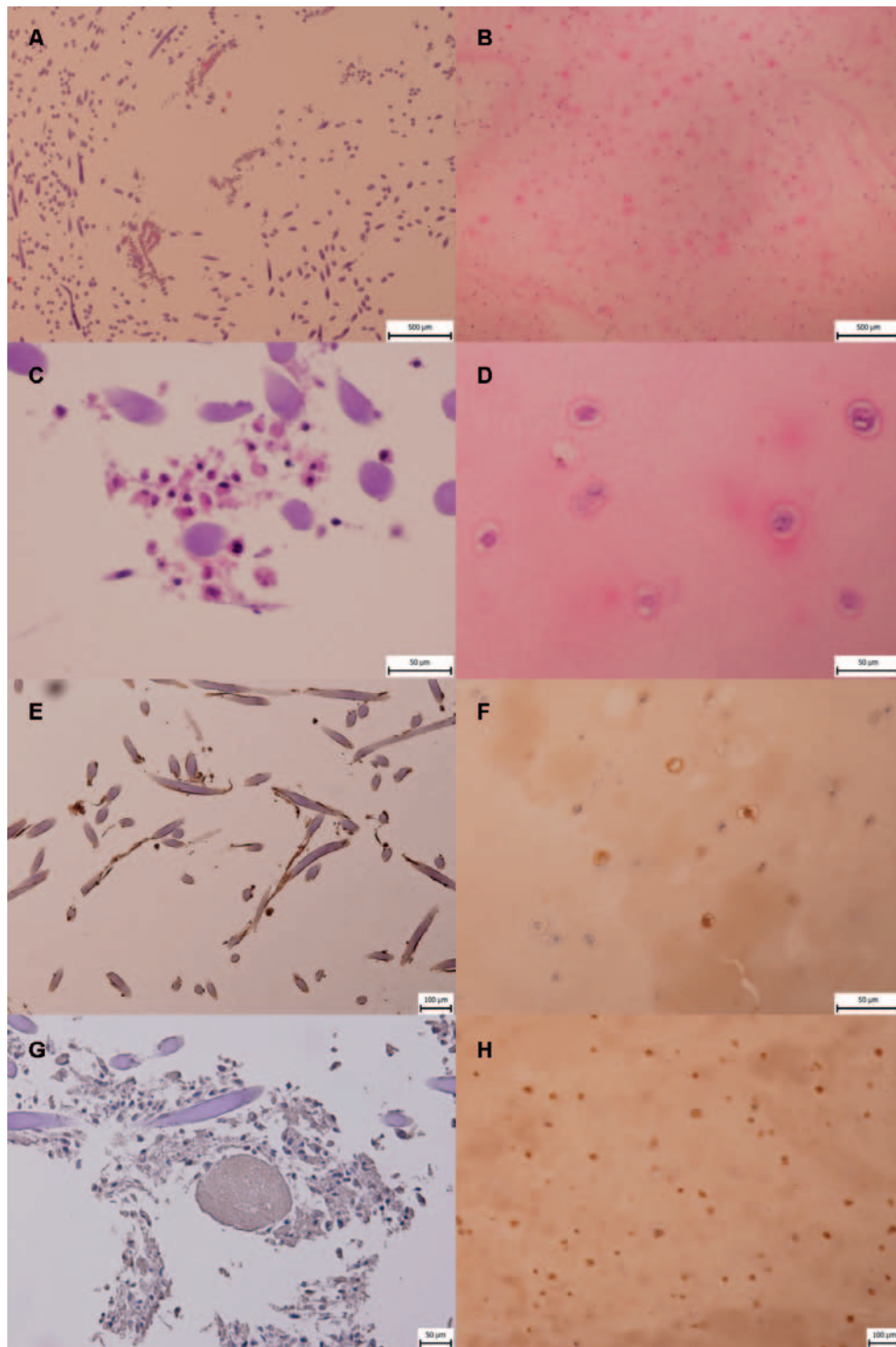


Fig. 2. Two scaffolds used in our study had a different histological structure.

The scaffold Hyalograft C was made up of a fibrillar network composed of biomaterial fibres of the esters of hyaluronic acid and clusters of small cells (a, c), HE, $\times 40$ and $\times 400$. The cells seeded onto the fibers expressed smooth muscle actin only (e), S-100 protein was negative (g) $\times 100$. Brno Chondrograft culture was composed of a fibrin scaffold and round cells rather resembling differentiated chondrocytes (b, d), HE, $\times 40$ and $\times 400$. The cells of Brno Chondrograft culture expressed smooth muscle actin and different isoforms of the S-100 protein (f, h) $\times 100$.

The main difference, when compared with normal articular cartilage, was the predominance of chondrocytes expressing smooth muscle actin (Fig. 1c). It was also possible to stain the chondrocytes with antibodies

against different isoforms of S-100 protein (Fig. 1d). The most intensive staining was observed when antibodies against S-100 A6 protein were used.

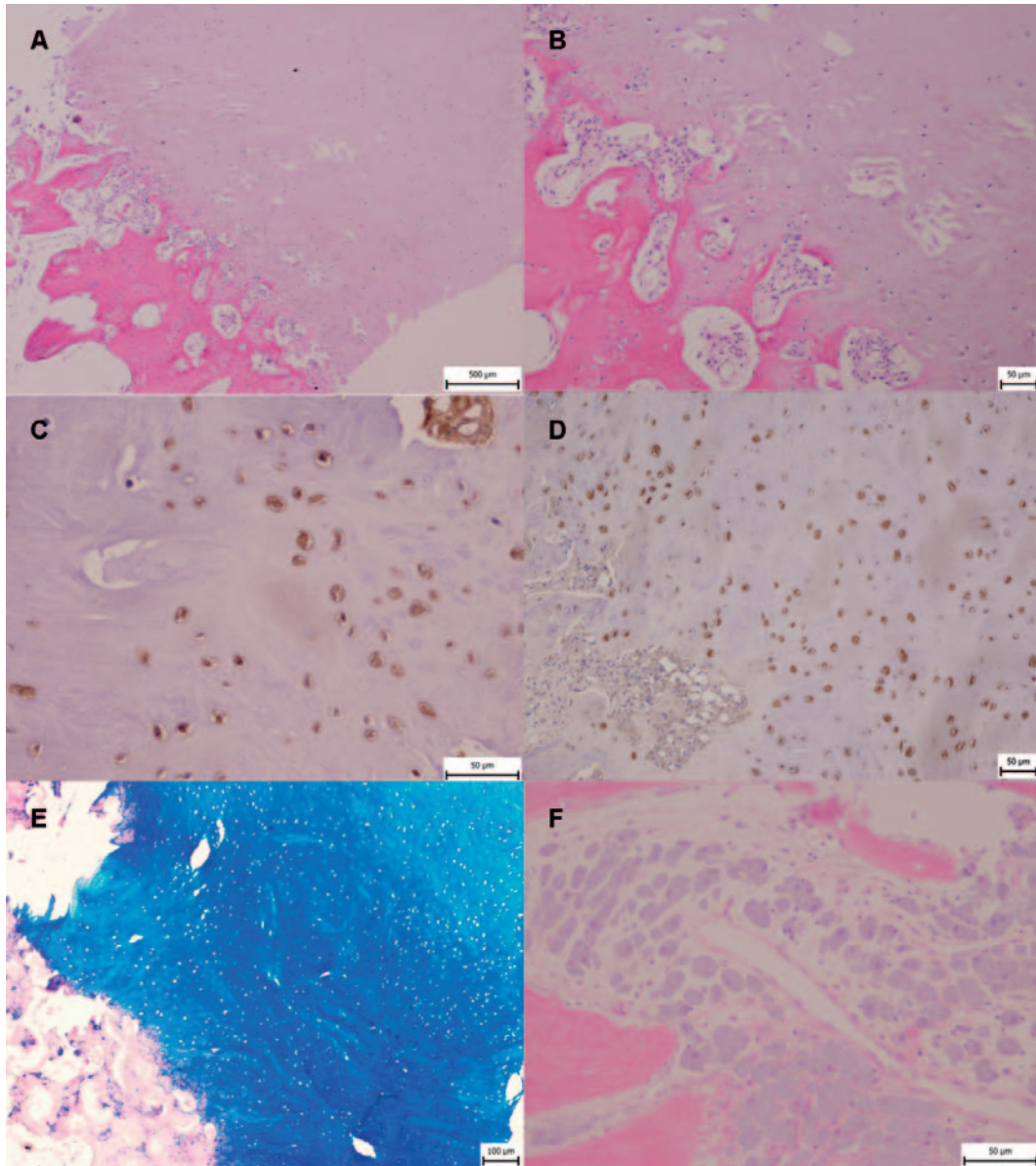


Fig. 3. The newly formed cartilage after autologous-chondrocyte transplantation of Hyalograft C after 10 months had a predominantly hyaline cartilage. Columnar distribution of cells in the deep zone was irregular and the zone of calcified cartilage as well as the subchondral bone plate were incomplete (a, b), HE, $\times 40$ and $\times 200$.

The cells of the newly formed cartilage expressed α -smooth muscle actin and S-100 protein (c, d) and intercellular matrix was alcian blue positive (e) $\times 100$ and $\times 400$.

In the intertrabecular spaces of subchondral bone there was focal accumulation of macrophages with blue-coloured cytoplasm containing residual phagocytized material from the scaffold composed of the esters of hyaluronic acid.

Histology of cell-seeded scaffolds

Histological examination of both types of cell-seeded scaffolds used during the transplantation showed markedly significant differences (Fig. 2 a-h).

In the case of Hyalograft C, the composition of the transplanted scaffold was remarkably different. The scaffold was made up of a fibrillar network composed of biomaterial fibres of the esters of hyaluronic acid. The distribution of cells was completely irregular and their concentration differed from site to site. Clusters of small cells around the fibres were observed (Fig. 2a, c, e, h). The cells seeded onto the fibres resembled fibroblasts

and myofibroblasts not only by their spindle shape, but also by their expression of smooth muscle actin (Fig. 2e). All cells were completely negative during immunohistochemical examination with antibodies against different isoforms of S-100 protein (Fig. 2g). It was supposed that these cells may represent immature mesenchymal cells with features resembling stem mesenchymal cells and myofibroblasts. The proliferation index was not evaluated because the staining with antibody against Ki67 gave unclear results.

Brno culture was composed of a fibrillar fibrin scaffold and round cells relatively regularly distributed that rather resembled differentiated chondrocytes (Fig. 2b, d,

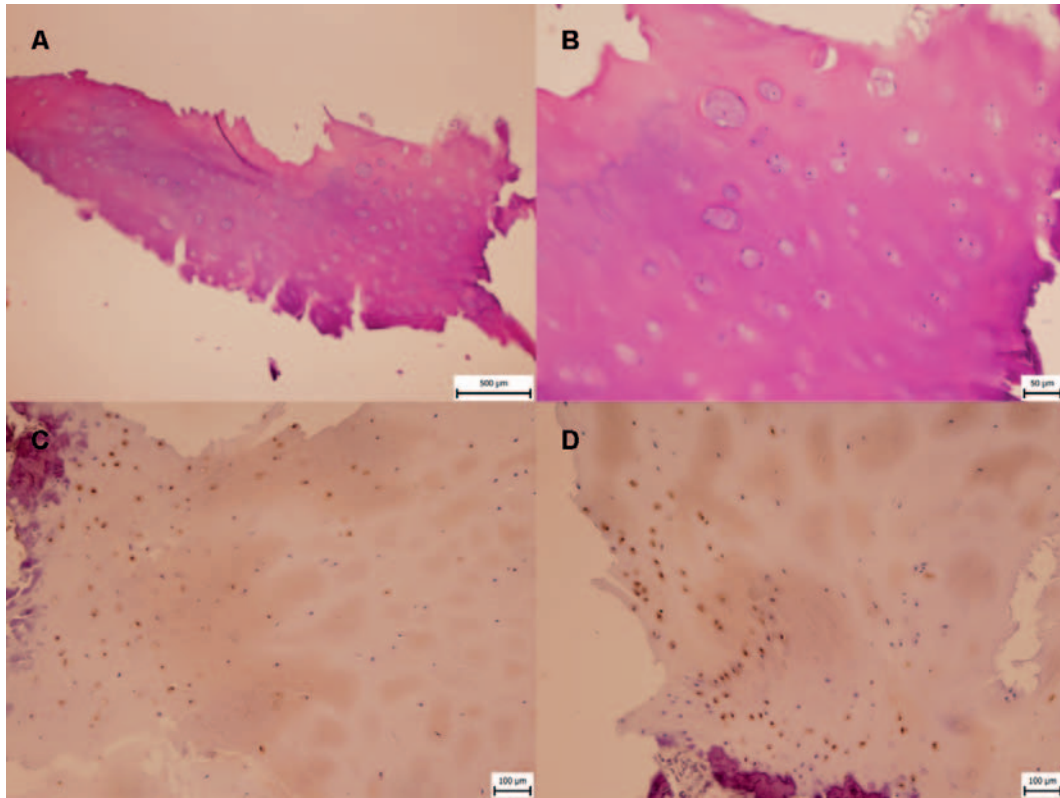


Fig. 4. The newly formed cartilage 10 months after transplantation of Brno Chondrograft culture was mature and predominantly composed of lacunar cells (a, b), HE, $\times 40$ and $\times 200$. Chondrocytes expressed smooth muscle actin and S-100 protein (c, d) $\times 100$.

f, h). The cells of this culture also expressed α -smooth actin (Fig. 2f). The nature of the chondrocytes was confirmed immunohistochemically, because the cells expressed different isoforms of S-100 protein (Fig. 2h). The most intensive staining was observed when antibodies against S-100A6 protein were used. The proliferation index was rather high, around 5 %. We used antibodies against the Ki67 protein.

Cartilage after autologous-chondrocyte transplantation

The newly formed cartilage obtained 10 months after autologous-chondrocyte transplantation of Hyalograft C had a predominantly hyaline character (Fig. 3 a-e).

The distribution of chondrocytes in the cartilage was rather irregular (Fig. 3a, b). All cells were viable and exhibited a clearly delineated nucleus. The columnar distribution of cells in the deep zone was irregular. This finding indicated incomplete maturation of the newly formed cartilage tissue.

The new cartilage contained proteoglycans which were verified upon staining with alcian blue (Fig. 3e) and safranin O. Immunohistochemical staining for collagen II was also positive, but for this examination we only had formol-fixed material. However, polarized light microscopy demonstrated randomly oriented collagen bundles in smaller areas of fibrocartilage. In con-

trast, the areas of newly formed hyaline cartilage did not differ from normal hyaline cartilage.

The zone of calcified cartilage was also incomplete, as well as the subchondral bone plate (Fig. 3a, b). In all biopsies, there was nearly perfect integration of cartilage to the bone. In subchondral bone tissue, we observed features of remodelling represented by the presence of osteoclasts showing positivity in reaction with antibody against CD68 and by the presence of osteoblast rims on the surface of bone trabecules.

In other areas fibrocartilage predominated. The majority of the newly formed cartilage cells contained α -smooth muscle actin (Fig. 3c) and were S-100 protein positive (Fig. 3d). Other immunohistochemical reactions such as for CD 34, desmin, and muscle-specific actin were negative.

Unusual findings were observed in two cases. In both of these cases, we observed focal accumulation of macrophages with blue-coloured cytoplasm in newly formed cartilage and in the intertrabecular spaces of subchondral bone (Fig. 3f). We suppose that macrophages contain residual phagocytized fibrillar material from the scaffold composed of the esters of hyaluronic acid in their cytoplasm. Such an interpretation is supported by their positivity when stained with alcian blue.

Results of the transplantation of the second type of scaffold from Brno were verified in nine patients by second-look biopsy (Fig. 4 a-d). The cartilage was a little more mature and predominantly composed of lacu-

nar cells (Fig. 4a, b) in contrast with the first group of patients. Fibrocartilage was identified in small areas of the bioptic samples. Immunohistochemical staining of α -smooth muscle actin and S-100 protein were similar to that observed in the Hyalograft C group. No residual scaffold was identified.

Discussion

Cartilage tissue obtained from the surface of articular defects is composed of an admixture of hyaline cartilage and fibrocartilage. Many chondrocytic cells contained α -smooth muscle actin as we have described previously (Povýšil et al., 2008). This finding suggests that chondrocytes may have an adaptation mechanism enabling such transformation of the immunophenotype of cartilage depending on different situations. The chondrocytes probably adopt smooth muscle features during the healing process to produce the initial fibrocartilage step. Based on this finding, we presume that the chondrocyte phenotype is variable and can be modulated by microenvironmental stimuli (Povýšil et al., 2008). Such stimuli include mechanical pressure. The mechanisms regulating the expression of α -smooth muscle actin and other cytoskeletal proteins in chondrocytes are only poorly understood.

However, it is well known that the structure of chondrocytes and the composition of extracellular matrix vary with tissue depth. The chondrocyte phenotype varies considerably by zone, and it is supposed that phenotypically stable zonal cell populations are maintained in articular hyaline cartilage (Coates and Fisher, 2010). Zonal differences in the matrix organization and content are largely due to variations in cellular activity (Aydelotte and Kuettner, 1988; Aydelotte et al., 1988; Coates and Fisher, 2010). Cells of the different zones display differences in morphology, density, and metabolic activity. Superficial zone cells are the smallest, and manifest as elongated and thin cells oriented parallel to the articular surface. A portion of them contain smooth muscle actin in their cytoplasm (Povýšil et al., 2008) and they are responsible for producing large glycoprotein proteoglycans occurring in the synovial fluid. The large cells of the deep zone, which are oriented perpendicularly to the articular surface, serve to anchor the articular cartilage to the calcified layer below. Chondrocytes of various zones secrete several other proteins, but their functions are not completely known (Coates and Fisher, 2010).

Recently, the newly developed treatment modality of autologous chondrocyte transplantation has shown great promise, and is now widely used for the treatment of cartilage defects (Brittberg et al., 1994). Tissue engineering combines cells, scaffolds and bio-active factors, which represent one of the most promising approaches to the restoration of damaged tissues. The main purpose of our study was to compare cartilage repair tissue at the femoral condyle after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation using two different scaffolds.

Hyalograft C is a tissue-engineered product composed of autologous chondrocytes grown on a 3D scaffold made of HYAFF11 (Brun et al., 1999; Grigolo et al., 2002; Giroto et al., 2003; Hollander et al., 2006; Tognana et al., 2007), which is a benzyl ester of hyaluronic acid. This biodegradable and biocompatible 3D product has been repeatedly used for treatment of articular cartilage defects, and the results of the transplantation were excellent. This technique with its inherent safety profile has already been introduced into clinical practice. Immunohistochemical studies as well as RT-PCR analysis *in vitro* confirmed that chondrocytes seeded on HYAFF 11 express and produce type II collagen and aggrecan (Giroto et al., 2003; Hollander et al. 2003), but the cytological characteristics of the cell populations were not mentioned in these reports. A similar situation is evident in the case of Brno culture based on the fibrin glue composition of the carrier. The cellular composition of these two products was completely different in our study. Despite having been cultivated on 3D scaffolds, the cell differentiation on both transplant types did not reach the levels of native cartilage. Hyalograft C was made up of a fibrillar network composed of biomaterial fibres of the esters of hyaluronic acid. The cells seeded on the fibres may represent immature mesenchymal cells resembling fibroblasts and myofibroblasts primarily by their shape and expression of smooth muscle actin. No signs of chondrocyte differentiation were observed. The cell components of Brno culture had features native to chondrocytes because they had a round shape and expressed S-100 proteins, and also displayed a high proliferation index when we used antibodies against Ki67.

Both methods of transplantation had acceptable short-term clinical results. There were no significant differences in the macroscopic or histological results between the two treatment groups. All patients showed clinical improvement, and the macroscopic appearance of repair tissue at arthroscopy was either normal, or nearly normal in all cases.

Biopsies of the repair tissue were available for 21 of these patients and were analysed according to standard histological and immunohistochemical techniques used for chondrocyte morphology and presence of proteoglycans. The following major conclusions can be drawn from our study. Chondrocytes engineered *in vitro* onto these two different scaffolds produce new cartilage with similar properties after transplantation into cartilage defects. However, it seemed that after transplantation with Brno culture, the newly formed cartilage was a little more mature and predominantly composed of lacunar cells.

We uphold the results of previous works (Grigolo et al., 2002; Giroto et al., 2003; Hollander et al., 2003; Podškubka et al., 2006) that demonstrate that tissue-engineered cartilage implanted into knees matures into an articular cartilage structure as early as 11 months after transplantation of the Hyalograft C. We also observed very similar results in the patients transplanted with Brno culture.

In both groups of patients with transplanted autologous chondrocytes, the newly formed cartilage had a partly hyaline character with an admixture of fibrocartilage. Chondrocyte distribution in the cartilage matrix was rather irregular. All cells were viable and exhibited a clearly delineated nucleus. The columnar distribution of cells in the lower zone was irregular. This finding indicated an incomplete maturation of the new cartilage tissue. The zone of calcified cartilage, as well as the subchondral bone plate, was also incomplete in both groups.

In subchondral tissue, we observed features of bone remodelling with the presence of osteoclasts and osteoblasts on the surfaces of nonlamellar bone trabeculae. The majority of cartilage cells contained α -smooth muscle actin. It seems that actin-positive cells in normal hyaline cartilage, with the exception of the surface layer, occur in association with arthrotic changes (Wang et al., 2001; Povýšil et al., 2008) and predominantly during the process of repair (Povýšil et al., 2008). This includes new formation of the cartilage after transplantation. Chondrocytes containing actin, or so-called myochondrocytes (Povýšil et al., 1997), may utilize the contractile actin isoform in manipulating the extracellular matrix of articular cartilage (Povýšil et al., 2008). It is also possible that actin-containing chondrocytes have a higher potential for regeneration in contrast to chondrocytes that do not contain this contractile material in their cytoplasm.

However, transformation into hyaline cartilage was not complete in both groups. It may be caused by the fact that the second-look biopsy was performed too soon. We may suppose that complete restoration of the newly formed cartilage could develop later. This would have been seen if the second-look biopsy were performed after a longer time of patient follow up with this type of the treatment. We do not know what are the limits of the maturation process of newly formed cartilage after transplantation.

It is well known that a clear method for retaining and/or creating phenotypically stable zonal cell populations has not been established to date. Zonal differences in matrix organization and content are largely due to variations in cellular activity. Preliminary reports have indicated that this may be possibly due to zonal differentiation in these cells. It is supposed that such cultures will utilize progenitor cell populations, and therefore new commercial products in cartilage tissue have been analysed (Pelttari et al., 2008; Coates and Fisher, 2010). Future investigations will need to ascertain the factors that contribute to the maturational process of the cartilage after transplantation.

Conclusion

Our study was primarily aimed to compare the histological and immunohistochemical cellular composition of two different chondrocyte-seeded biomaterials and the results of their transplantation. Brno culture contained round cells showing features of differentiated

chondrocytes expressing S-100 protein and smooth muscle actin. The proliferation activity was rather high, around 5 %. In contrast, in the case of Hyalograft C, the scaffold was made up of a fibrillar network composed of biomaterial fibres of the esters of hyaluronic acid. The cells seeded onto these fibres resembled fibroblasts and myofibroblasts and expressed only smooth muscle actin. No signs of chondrocyte differentiation were observed. Therefore, they may represent pre-chondrocytes or immature mesenchymal cells with features resembling stem mesenchymal cells. During the comparison of both patient cohorts, we did not observe any important differences in the histological makeup of the newly formed cartilage. It is surprising that the results of transplantation were very similar because the cellular composition of the two cultures was completely different in terms of the degree of cell differentiation. On the basis of such findings, it is possible to conclude that more highly differentiated cells with the typical S-100 protein-positive phenotype of chondrocytic cells also have a sufficient growth potential for the healing of cartilage defects.

References

- Aydelotte, M. B., Kuettner, K. E. (1988) Differences between sub-population of cultured bovine articular chondrocytes I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect. Tissue Res.* **18**, 205-222.
- Aydelotte, M. B., Greenhill, R. R., Kuettner, K. E. (1988) Differences between sub-population of cultured bovine articular chondrocytes II. Proteoglycan metabolism. *Connect. Tissue Res.* **18**, 223-234.
- Brittberg, M., Lindall, A., Nilssen, A. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee without autologous chondrocytes transplantation. *N. England J. Med.* **331**, 889-895.
- Brun, P., Abatangelo, G., Radice, M., Zacchi, V., Gidolin, D., Gordini, D. D., Cortivo, R. (1999) Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* **46**, 337-346.
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. (1998) Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J. Bone Joint Surg.* **79**, 600-611.
- Coates, E. E., Fisher, J. E. (2010) Phenotypic variations in chondrocytes subpopulations and their response to *in vitro* culture and external stimuli. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 3371-3388.
- Filardo, G., Kon, E., Di Martino, A., Iacono, F., Marcacci, M. (2011) Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation: a prospective 7-year follow-up study. *Am. J. Sports Med.* **39**, 2153-2160.
- Frenkel, S. R., Toolan B., Menche, D., Pitman, M. I., Pachence, J. M. (1997) Chondrocyte transplantation using collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J. Bone Joint Surg. (Br)* **79**, 831-836.
- Giroto, D., Urbani, S., Brun, P., Renier, D., Barbucci, R., Abtangelo, G. (2003) Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials* **24**, 3265-3275.

- Grigolo, B., Lisignoli, G., Piacentini, A., Fiorini, M., Gobbi, P., Mazzotti, G., Duca, M., Pavesio, A., Facchini, A. (2002) Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF 11): molecular immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* **23**, 1187-1195.
- Hendrickson, D. A., Nixon, A. J., Grande, D. A. (1994) Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J. Orthop. Res.* **12**, 485-497.
- Hollander, A. P., Dickinson, S. C., Sims, T. J., Soranzo, C., Pavesio, A. (2003) Quantitative analysis of repair tissue biopsies following chondrocyte implantation. In: *Tissue Engineering of Cartilage and Bone: Novartis Foundation Symposium 249*, eds. Bock, G., Goode, J., pp. 218-233, Novartis Foundation, London, UK..
- Hollander, A. P., Dickinson, S. C., Sims, T. J., Brun, P., Cortivo, R., Kon, E., Marcacci, M., Zanasi, S., Borriero, A., De Luca, C., Pavesio, A., Soranzo, C., Abatangelo, G. (2006) Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue Eng.* **12**, 1778-1798.
- Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigen, T. C., Drogset, J. O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., Johansen, O. (2004) Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. *J. Bone Joint Surg.* **86**, 455-464.
- Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., Hsu, H. P., Spector, M. (2003) Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of chondral defect in a canine model. *J. Orthop. Res.* **21**, 272-281.
- Magnussen, R. A., Dunn, W. R., Carey, J. L., Spindler, K. P. (2008) Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systemic review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466**, 952-962.
- Mainil-Varlet, P., Ainer, T., Brittberg, M., Bullough, P., Hollander, A., Hunziker, E., Kandel, R., Nehrer, S., Pritsker, K., Roberts, S., Stauffer, E. (2002) The International Cartilage Repair Society (ICRS) – Histological visual scale. A preliminary report of the histological and point committee. I. Human biopsies, Toronto consensus. *Eur. Cell. Mater.* **4 (Suppl. 1)**, 44-57.
- Pelttari, K., Steck, E., Richter, W. (2008) The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury* **39 (Suppl. 1)**, S58-S65.
- Podškubka, A., Povýšil, C., Kubeš, R., Sprindrich, J., Sedláček, R. (2006) Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocytes transplantation on a hyaluronic acid ester scaffolds (Hyalografts C). *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* **73**, 251-263.
- Povýšil, C., Tomanová, R., Matějovský, Z. (1997) Muscle specific actin in chondroblastoma. *Hum. Pathol.* **28**, 316-324.
- Povýšil, C., Kaňa, R., Tvrđík, D., Horák, M., Vaculík, J., Podškubka, A., Kubeš, R. (2008) Distribution of chondrocytes containing α -smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic and transplanted articular cartilage. *Pathol. Res. Pract.* **204**, 885-890.
- Tognana, E., Borriero, A., De Luca, C., Pavesio, A. (2007) Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs* **186**, 97-103.
- Wang, Q. I., Breinan, H. A., Hsu, H. P., Spector, M. (2000) Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of nonvascular α -smooth muscle actin-containing cells. *Wound Rep. Reg.* **8**, 145-158.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Pathology – Research and Practice 204 (2008) 883–890

PATHOLOGY
RESEARCH AND PRACTICE

www.elsevier.de/prp

ORIGINAL ARTICLE

Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human normal, osteoarthrotic, and transplanted articular cartilage

Ctibor Povýšil^{a,b,c,*}, Radim Kaňad, Pavel Dundr^{a,b}, Daniel Tvrđík^{a,b},
Martin Horák^e, Jan Vaculík^f, Aleš Podškubka^f, Radovan Kubeš^f

^aDepartment of Pathology, 1st Medical Faculty, Charles University, Czech Republic

^bDepartment of Pathology, General University Hospital, Charles University, Czech Republic

^cDepartment of Pathology, Institute for Postgraduate Studies, Studničkova 2, Prague 128 00, Czech Republic

^dDepartment of Otorhinolaryngology, General University Hospital, Unemocnice 2, Prague, Czech Republic

^eDepartment of Radiodiagnostics, Teaching Hospital Na Bulovce, Budínova 2, 180 81 Prague, Czech Republic

^fDepartment of Orthopaedics, Teaching Hospital Na Bulovce, Budínova 2, 180 81 Prague, Czech Republic

Received 15 December 2007; accepted 14 May 2008

Abstract

The aim of our study was to evaluate the occurrence of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human normal and diseased cartilage. Immunohistochemistry using monoclonal antibodies for alpha-smooth actin, muscle-specific actin, S-100 protein, CD 34, and desmin was performed on samples of human articular cartilage obtained at autopsy following sudden death, during total hip and knee replacement for osteoarthritis, or after femoral neck fracture in patients without symptoms of osteoarthritis. Moreover, the layers of residual cartilage from chondral posttraumatic defects obtained during preoperative arthroscopy and of newly formed cartilage after autologous-chondrocyte transplantation (Hyalograft[®] C) obtained during second-look arthroscopy were also examined by immunohistochemistry and RT PCR. Our study showed that a significant percentage of articular chondrocytes express alpha-smooth muscle actin in healthy, diseased, and regenerated articular cartilage. Alpha-actin positive chondrocytes (18%) were observed predominantly in the upper zone of normal articular cartilage. By contrast, only approximately 10% of cartilage cells in the deep region stained for this contractile actin isoform. Actin-positive chondrocytes (myochondrocytes) are formed predominantly in response to injury to the osteoarthrotic cartilage, at sites of defective healing, and in newly formed cartilage after autologous chondrocyte transplantation. Fibrocartilage is present in some of these conditions, and it is known that this tissue contains chondrocytes with actin. The presence of myochondrocytes in the surface layer of normal articular cartilage indicates that this region probably plays an important role in maintaining cartilage integrity. Myochondrocytes may utilize the contractile actin isoform in manipulating the extracellular matrix of articular cartilage. It is also possible that actin-containing chondrocytes have a higher potential for regeneration in contrast to chondrocytes that do not contain this contractile material in their cytoplasm.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Articular cartilage; Immunohistochemistry; Actin-positive chondrocytes

*Corresponding author. Tel.: +420 2249 18877.

E-mail address: ctibor.povysil@lfl.cuni.cz (C. Povýšil).

Introduction

Relatively little is known about the cytoskeleton of human chondrocytes from different cartilage tissues, especially that pertaining to expression of a contractile actin isoform- α smooth muscle actin-in normal human articular chondrocytes and in chondrocytes seen in different pathological conditions. Povýšil et al. [10] reported on the occurrence of muscle-specific actin and α -smooth muscle actin in some neoplastic cells of chondroblastomas and also rarely in chondrosarcomas. Further research demonstrated the presence of α -smooth muscle actin in canine meniscus cells [7], in intervertebral discs [13], in chondromyxoid fibromas [8], in human osteoarthritic articular cartilage [6], as well as in human articular cartilage removed from deep traumatic defects [11] and human auricular cartilage [5]. The aim of our work was to evaluate the occurrence of α -smooth muscle actin in normal, osteoarthritic, and transplanted articular cartilage by means of immunohistochemistry and RT-PCR.

Materials and methods

Normal cartilage

Samples of macroscopically normal human articular cartilage from femoral heads were obtained at time of autopsy following sudden death. In all cases ($n = 7$), the sampling took place within 24 h of death. Four subjects were male (range 23–46 years), and three were female (range 19–37 years). Further samples of normal human articular cartilage were obtained during total hip replacement for femoral neck fracture in patients without symptoms of osteoarthritis ($n = 15$). Seven subjects were male (range 57–72 years), and eight were female (range 55–68 years). All femoral heads had a completely normal surface free of visible degenerative changes.

Osteoarthritic cartilage

Human articular cartilage was also obtained during total hip replacement for femoral osteoarthritis ($n = 12$). Six subjects were male (range 52–67 years), and six were female (range 54–70 years). All femoral heads in both groups had a visibly roughened surface with obvious small defects. Moreover, the tibial plateau was retrieved from seven males (range 23–42 years) with hemophilic knee arthropathy undergoing total knee arthroplasty.

Cartilage from the chondral posttraumatic defects before transplantation

During preoperative arthroscopy, we obtained samples from the thin layer of residual cartilage filling the

traumatic defect of the articular cartilage surface of distal femurs ($n = 12$). All 12 subjects were male (range 23–35 years).

The newly formed cartilage after autologous-chondrocyte transplantation (Hyalograft[®] C)

Graft composed of autologous chondrocytes grown on a biocompatible and degradable 3D scaffold made of HYAFF and benzyl of ester of hyaluronic acid was used for the transplantation [3]. During second-look arthroscopy (range 23–35 years), which was performed 10 months after autologous-chondrocyte transplantation [9], samples from newly formed cartilage at the site of the posttraumatic chondral defect were obtained ($n = 9$).

Tissue processing

The femoral heads were cut into thin slices (3–5 mm), and samples containing both articular cartilage and adjacent subchondral bone were taken from the central and peripheral areas of the femoral heads. Moreover, samples composed purely of cartilage were also removed from the surfaces of the heads. Samples with bone were fixed in 10% buffered formalin and decalcified in a saturated solution of EDTA at 40% centigrade. Samples without bony structures were processed without decalcification. Following decalcification, samples were then processed with paraffin.

Immunocytochemical staining

For the purposes of immunohistochemical studies, we used the avidin–biotin complex (ABC) technique. Primary monoclonal antibodies against S-100 protein (1: 200, DAKO, Glostrup Denmark), α -smooth muscle actin (1:100, Sigma, St. Louis, MO), muscle-specific actin HHF35 (1:100, DAKO), and desmin (1:200, DAKO) were applied. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with non-immune mouse serum.

RNA isolation, cDNA preparation, and RT-PCR analysis

Isolation of total RNA, synthesis of cDNA, and RT-PCR analysis were performed using standard procedures described in our previous work [16] using deparaffinized samples composed only of articular cartilage tissue. Table 1 presents the complete list of primer sets including their sequences, annealing temperatures, and PCR product sizes. PCR conditions were: 95 °C for 3 min, annealing at 57 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, followed by 45 cycles with denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 47–57 °C

Table 1. List of primers used for RT-PCR analysis

Gene	Primer	Sequence (5'–3')	T_a (°C)	PCR product (in bp)
α -SKA	Sense	TTCCATTTTCTTCCACAGGG	53	103
α -SKA	Antisense	GCTGCCATCGTAAACTGACA	53	103
α -SMA	Sense	AGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGC	53	199
α -SMA	Antisense	CTCTCTGTCCACCTTCCAGCAG	53	199
α -CAA	Sense	CCTTCTCTCTCCATCTACCTTCC	47	177
α -CAA	Antisense	AGGTTGCAAGTCCTAGTCTGG	47	177
γ -SMA	Sense	CCACCTTCCAGCAGATGTG	47	155
γ -SMA	Antisense	AGGCTTGTAGGTTTTAATGTTTCA	47	155
β -actin	Sense	AGGCCAACC GCGAGAAGATGACC	53	332
β -actin	Antisense	GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC	53	332
γ -actin	Sense	GTCTGTGGCTTGGTGAGTCT	57	166
γ -actin	Antisense	GAAACTGGGTCCTACGGCTT	57	166

Each primer was chosen to span introns. The specific annealing temperature (T_a) of each primer and the size of expected PCR products are listed below. The abbreviations used are: bp base pairs; α -SKA alpha-skeletal muscle actin; α -SMA alpha-smooth muscle actin; α -CAA alpha-cardiac muscle actin; γ -SMA gamma-smooth muscle actin.

Table 2. Basic information on the patients examined

Type of examined tissue	Number of patients	Age	Actin-positive chondrocytes	
			Superficial layer (%)	Deep regions (%)
Normal femoral head (from autopsy)	7	19–46	18	10
Normal femoral head (after femoral neck fracture)	15	55–72	22	15
Osteoarthritic femoral head	12	52–70	100 cells in clonal grouping 80 in fibrocartilaginous tissue	
Tibial plateau in hemophiliacs	7	23–42	80 in fibrocartilaginous tissue	
Posttraumatic defect of the distal femur	12	23–35	Absent	80
Distal femoral cartilage after chondrocytes transplantation	9	23–35	80	80

Note: In the cases of osteoarthritic femoral head and in tibial plateau in hemophiliacs, we evaluated only regions with osteoarthritic changes.

(see Table 1) for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. The reaction was accomplished with a final extension at 72 °C for 10 min.

distribution of actin-positive chondrocytes in deep regions differed from case to case. Immunohistochemical staining for muscle-specific actin, CD34, and desmin was negative.

Results

The basic findings from our study are summarized in Table 2.

Cartilage from normal femoral heads

The small part of chondrocytes in all layers of the cartilage was S-100 protein-positive (Fig. 1). Approximately 20% of chondrocytes in the superficial region of normal cartilage from young patients expressed alpha-smooth muscle actin, as demonstrated by immunohistochemistry (Fig. 2). It was readily apparent that fewer cells in deep regions contained alpha-smooth muscle actin. However, the

Cartilage from osteoarthritic patients

In these cases, degenerative changes in articular cartilage were evident as superficial fibrillation, cartilage fragmentation, and decreased thickness. In some regions with defective cartilage, formation of fibrocartilaginous repair tissue was observed. In osteoarthritic cartilage from femoral heads and knee cartilage from hemophilic patients with arthrotic changes, cells comprising clonal grouping and stained for alpha-smooth muscle actin were the predominant cell types seen (Fig. 3). In regions with newly formed fibrocartilaginous repair tissue, the majority of cells also stained positive (Figs. 4 and 5), and some cells even stained with antibody

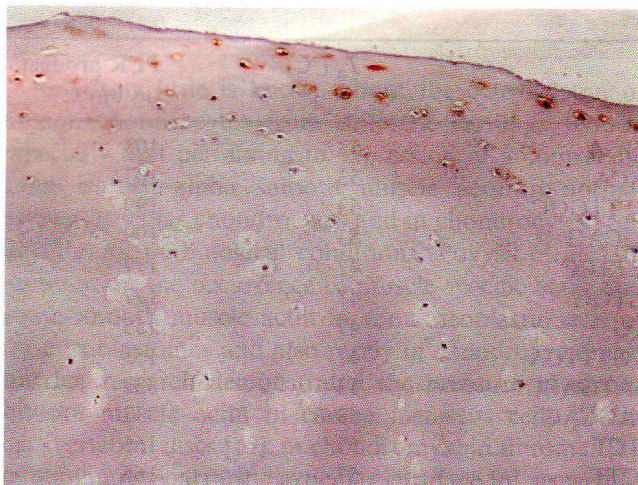


Fig. 1. S-100 protein-positive chondrocytes are predominant in the superficial layer of the cartilage from normal femoral head ($\times 200$).

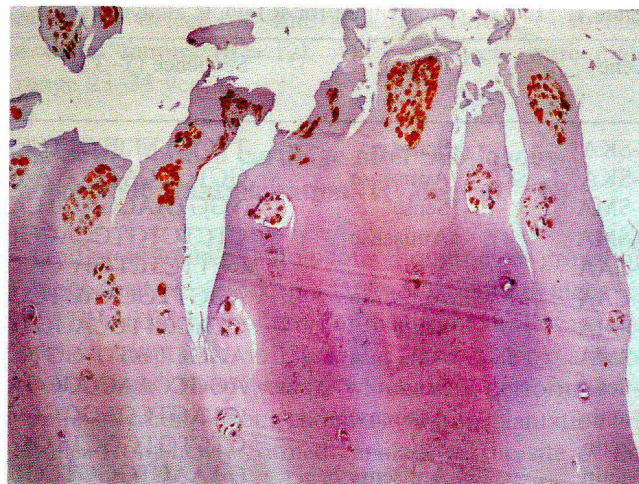


Fig. 3. Femoral head articular cartilage from an osteoarthrotic patient. The chondrocytes comprising clonal grouping stained for alpha smooth muscle actin ($\times 200$).

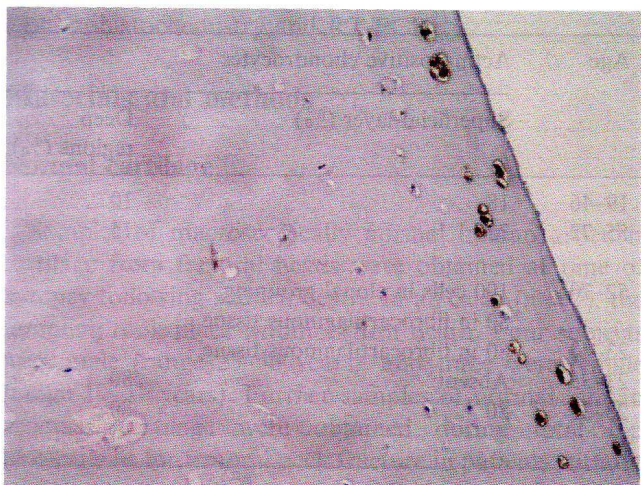


Fig. 2. Articular cartilage from normal femoral head obtained during total hip replacement for femoral neck fracture. The chondrocytes from superficial zone showed alpha-smooth muscle actin positivity ($\times 200$).

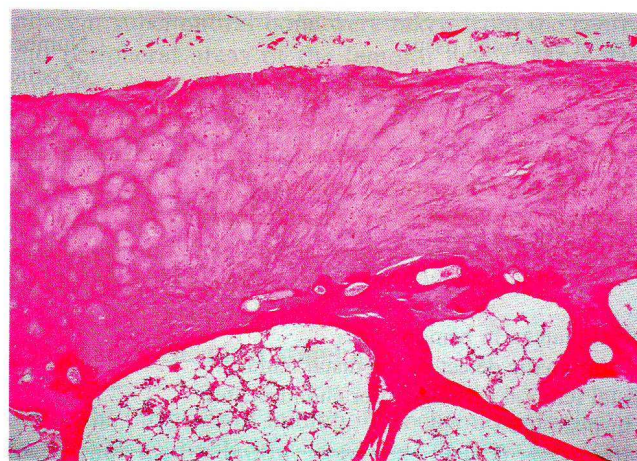


Fig. 4. Femoral head articular cartilage from an osteoarthrotic patient from the region with formation of fibrocartilaginous repair tissue (HE, $\times 120$).

against muscle-specific actin. In other regions with a structure similar to that of normal cartilage, the distribution of actin-positive chondrocytes was completely irregular in all zones of preserved cartilage and varied from case to case. Other immunohistochemical reactions, excluding those involving the S-100 protein, were negative.

Defective cartilage removed before transplantation from young patients

Actin-positive chondrocytes were not only present, but also predominated in all 12 samples, which were removed from the site of the cartilage defect. This

indicates that changes in repaired cartilage are confirmed by the presence of fibrocartilage tissue. Moreover, in one case, we also observed the typical desmin-positive type in the majority of the chondrocytes. Other immunohistochemical reactions were negative. By contrast, the majority of chondrocytes showed S-100 protein positivity.

Cartilage after autologous-chondrocyte transplantation

In cases of transplanted autologous chondrocytes, the samples obtained 10 months after surgery – the newly formed cartilage – had a partly hyaline character with an admixture of fibrocartilage. Chondrocyte distribution in the cartilage matrix was rather irregular. All cells were

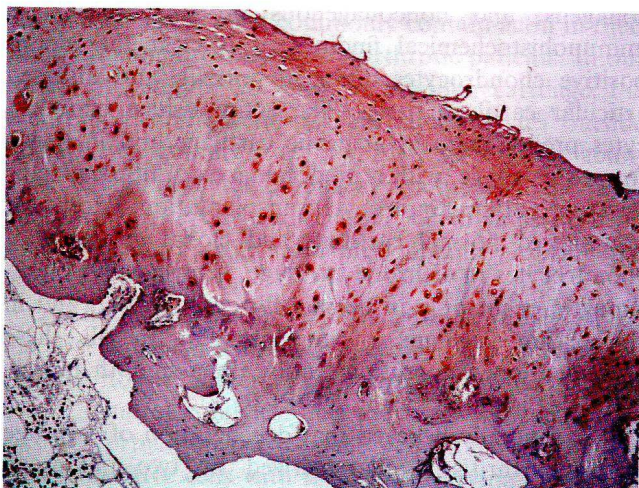


Fig. 5. The fibrocartilaginous repair tissue from osteoarthrotic cartilage predominantly contained alpha-smooth muscle actin-positive chondrocytes ($\times 200$).

viable and exhibited a clearly delineated nucleus. Columnar distribution of cells in the lower zone was irregular. This finding indicated incomplete maturation of the new cartilage tissue. The zone of calcified cartilage was also incomplete, as well as the subchondral bone plate. In subchondral bone tissue, we observed features of remodeling. The majority of cartilage cells contained alpha-smooth muscle actin (Figs. 6 and 7) and were S-100 protein-positive (Fig. 8). Other immunohistochemical reactions such as CD34, desmin, and muscle-specific actin were negative.

RT-PCR analysis

RT-PCR analysis detected the putative alpha-smooth muscle actin and beta- and gamma actin in all specimens examined (Fig. 9). This confirmed the results of our immunohistochemical examinations in all groups. The presence of other actin isoforms was not proved.

Discussion

In mammals, actin isoforms are expressed in a tissue-specific pattern that is strictly conserved although, up to now, no specific functions have been clearly defined for each of them [1]. It is generally accepted that four actin isoforms are tissue-restricted: alpha-skeletal actin, alpha-cardiac actin, alpha-smooth muscle actin, and gamma-smooth muscle actin. Two other actin isoforms are ubiquitous, i.e., cytoplasmic beta- and gamma actins. Their content and character in different tissues may change during development.

Alpha-smooth muscle actin plays a role in regulating motility and contractility [1]. It is expressed in



Fig. 6. Bioplastic cartilage specimen obtained during arthroscopy 10 months after autologous chondrocyte transplantation. The newly formed cartilage was composed of hyaline cartilage mixed with fibrocartilage (HE, $\times 120$).

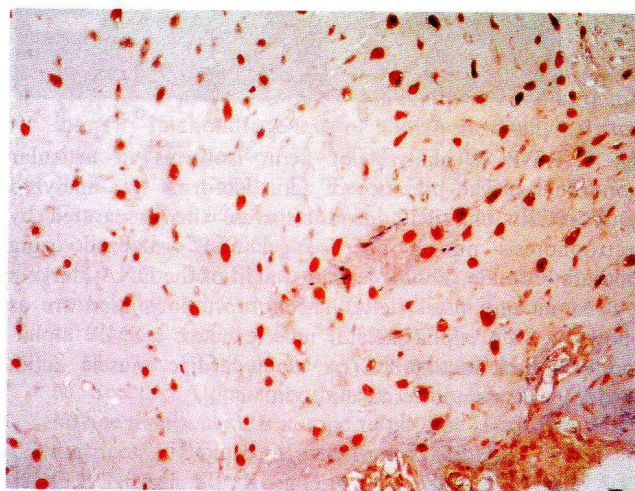


Fig. 7. The majority of chondrocytes from the newly formed cartilage contained alpha-smooth muscle actin ($\times 200$).

myofibroblasts during wound healing and fibrocontractive diseases. It is also distributed in myoepithelial cells, pericytes, vascular muscles, and different tumor cells. However, the scientific literature contains reports on the myofilament development in cells other than clearly defined smooth-muscle cells, myofibroblasts, pericytes, and myoepithelial cells. The occurrence of smooth muscle features can be regarded as a reaction to different stimuli such as trauma or genetic modification.

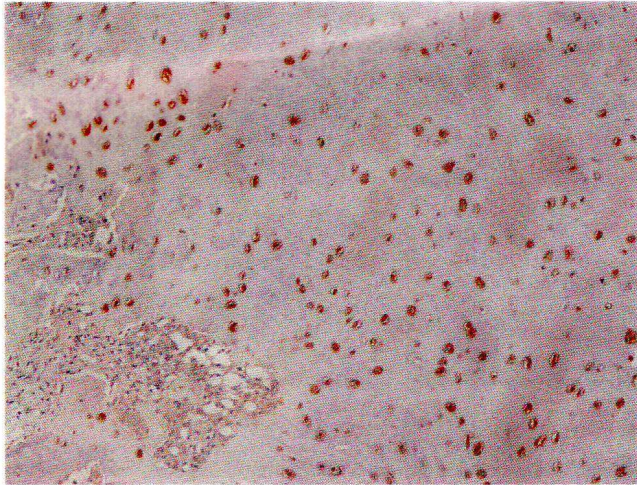


Fig. 8. S-100 protein-positive cells are predominant in newly formed cartilage after autologous chondrocyte transplantation ($\times 200$).

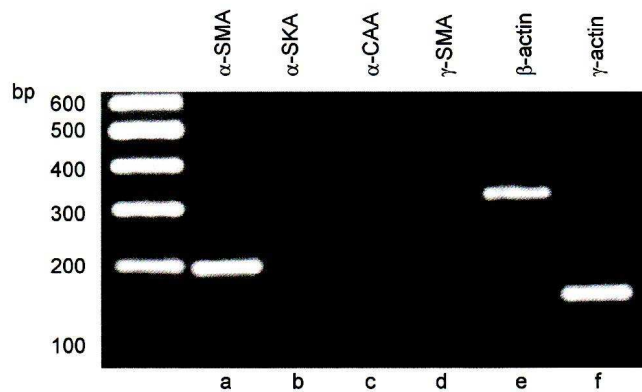


Fig. 9. RT-PCR analysis of actin isoforms in articular chondrocytes. The presence of actin isoforms was analyzed by RT-PCR. The PCR products were then separated by electrophoresis on an agarose gel and visualized using ethidium bromide. The molecular weight of the DNA markers is given in base pairs (left). The abbreviations used are as follows: α -SKA alpha-skeletal muscle actin; α -SMA alpha-smooth muscle actin; α -CAA alpha-cardiac muscle actin; γ -SMA gamma-smooth muscle actin.

The breadth of distribution of myofilaments and actin in normal, reactive, and neoplastic non-muscle cells is extensive [2]. Interpretation of this feature is different in varying situations because many questions regarding the specific functions of actin isoforms still remain to be answered.

No systemic study on the occurrence of actin containing chondrocytes in the human articular cartilage has been published previously. We can confirm that articular cartilage comprises two cell types differing in their cytoplasmic actin content, but their precise relationship is uncertain. Both types are embedded in an avascular matrix composed of water, proteoglycans,

collagens, and noncollagenous proteins. Based on immunohistochemical findings, it is clear that actin-positive chondrocytes differ in normal- and diseased articular cartilage tissue. The actin-positive chondrocytes predominate in arthrotic cartilage and in newly formed cartilage, with a predominance of fibrocartilage developed after chondrocyte transplantation. Except for non-altered normal cartilage and clonal grouping of chondrocytes in arthrotic cartilage, actin-positive chondrocytes occur only in normal fibrocartilage [7] and in the elastic cartilage of the ear [5]. In all these aforementioned conditions, only alpha-smooth muscle actin was identified using RT PCR.

It is generally believed that degeneration of cartilage in osteoarthritis is characterized by two phases: a biosynthetic and a degradative phase [12]. In the biosynthetic phase, the resident chondrocytes repair the damaged extracellular matrix. On the other hand, in the second phase, chondrocytes digest the matrix, and erosions develop on the cartilage. It is supposed that this is due to two processes: modulation of gene expression and a phenotypic modulation of the articular chondrocytes that are activated during the osteoarthrotic disease [12]. These changes may be accompanied by the hitherto unknown changes of the immunophenotype of chondrocytes, which is also represented by overexpression of smooth muscle actin. There are probably differences between cells of different cartilage zones with regard to the type of the reaction elicited; therefore, the so-called clonal grouping chondrocytes showing actin positivity are observed in osteoarthrotic articular cartilage. The following question remains: Is actin positivity a typical feature of the immunophenotype of chondroprogenitor cells? It was shown that at the molecular level, at least, a significant proportion of adult articular chondrocytes start to re-express a chondroprogenitor phenotype in osteoarthrotic degeneration [12].

Interestingly, we observed a predominance of actin-positive spindle cells in the culture of chondrocytes (Hyalograft[®] C) used for transplantation (unpublished data). These cells differed from chondrocytes not only in their shape but also in their immunophenotype because there were no S100 protein-positive prechondrocytes. However, transplantation in these patients was successful, as verified by us during an arthroscopic-biopic examination 10 months postoperatively. In all cases examined, cells of the newly developed cartilage tissue were S-100 protein- and actin- positive. This fact could show that actin- positive chondrocytes represent a line of cartilage cells closely resembling mesenchymal or chondrogenic progenitor cells.

The zonal structure of articular cartilage is well known. Based on the shape, number, cell arrangement, and the composition and organization of the cartilage matrix, five disparate zones are recognized. Zone I chondrocytes have disc-shaped nuclei and resemble

fibroblasts. These most commonly contain actin in their cytoplasm and are seen in non-arthrotic patients. In our cohort of patients with normal articular cartilage, the occurrence of the actin-positive chondrocytes outside Zone I was entirely exceptional. It seems that actin-positive chondrocytes in normal hyaline cartilage, with the exception of the surface layer, occur in association with arthrotic changes and predominantly during the process of reparation.

Our findings were very similar to those presented for the first time by Kim and Spector [5], who used, in contrast to us, material only from arthrotic femoral heads, femoral condyles, and the tibial plateau. There was no correlation between the percentage of smooth-muscle-positive cells with regions of varying degrees of osteoarthritis. Moreover, there was no correlation between the percentage of smooth-muscle containing cells in either region with patient age [5].

Our study confirmed that human articular cartilage has some potential for spontaneous regeneration. Cartilage tissue obtained from the surface of articular defects comprises a mixture of hyaline cartilage and fibrocartilage. Many chondrocytic cells contained alpha-smooth muscle actin; therefore, we confirm the findings of Wang et al. [17], who observed similar actin-containing chondrocytes present during healing from surgically created defects in adult canine articular cartilage. Moreover, in our previous study, we also demonstrated the presence of desmin- and actin-containing chondrocytes in human defective articular cartilage [11]. This finding suggests that chondrocytes may have an adaptation mechanism enabling such transformation of the immunophenotype of cartilage cells depending on different situations. The chondrocytes probably took on smooth muscle features during the healing process. This fact might support our previous supposition that cartilage cells expressing muscle markers could be designated as myochondroblasts and myochondrocytes [10], analogous to the terminology of myofibroblasts.

Based on this finding, we presume that chondrocyte phenotype is variable and can be modulated by microenvironmental stimuli. The mechanisms regulating the expression of alpha smooth muscle actin and other cytoskeletal proteins in chondrocytes are only poorly understood. This trait is similar to that found in myofibroblasts [15]. A wide variety of connective tissue cell types can express the gene for SMA under certain circumstances *in vitro* and *in vivo*. These include osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts occurring in tendons and ligaments, and in fibrocartilage [14]. These can also display contractile behavior. The exact role of spindle-shaped actin-positive cells occurring in the superficial layer of articular cartilage is unknown, but it is possible that they are also able to contract [4,14] and play a role in the process of cartilage tissue formation

and remodeling, in a process similar to that whereby myofibroblasts remodel the extracellular matrix. However, there is much work left to be done to reveal the role of myochondrocytes in the specific architecture of articular cartilage.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR/8150-4.

References

- [1] S. Clément, A. Orlandi, L. Bocchi, G. Pizzolato, M.P. Foschini, V. Eusebi, G. Gabbiani, Actin isoform pattern expression: a tool for the diagnosis and biological characterization of human rhabdomyosarcoma, *Virchows Arch.* 442 (2003) 31–38.
- [2] B. Eyden, Readers' forum- smooth-muscle-type myofilaments and actin in reactive and neoplastic nonmuscle cells, *Ultrastruct. Pathol.* 24 (2000) 347–362.
- [3] B. Gricolo, G. Lisignoli, A. Piacentini, M. Fiorini, P. Gobbi, G. Mazzoti, M. Duca, A. Pavesio, A. Faccini, Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis, *Biomaterials* 23 (2002) 1187–1195.
- [4] R.C. Hung, P.Y. Kuo, C.F. Chang, T.H. Chen, L.L.T. Ho, Alpha-smooth muscle actin expression and structure integrity in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells, *Cell Tissue Res.* 324 (2006) 457–466.
- [5] R. Kaňa, P. Dunder, D. Tvrđík, E. Nečas, C. Povýšil, Expression of actin isoforms in human auricular cartilage, *Folia Biol.* 52 (2006) 167–172.
- [6] A.C. Kim, M. Spector, Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage, *J. Orthop. Res.* 18 (2000) 749–755.
- [7] S. Mueller, T.O. Schneider, S. Shortkroff, H.A. Breinan, M. Spector, Alpha-smooth actin contractile behaviour in bovine meniscus cells in type I and type II collagen-GAC matrices, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 157–166.
- [8] G.P. Nielsen, S.B. Keel, G.R. Dickersin, M.K. Selig, A.K. Bhan, A.E. Rosenberg, Chondromyxoid fibroma: a tumour showing myofibroblastic, myochondroblastic, and chondrocytic differentiation, *Mod. Pathol.* 12 (1999) 514–517.
- [9] A. Podškubka, C. Povýšil, R. Kubeš, J. Šprindrich, R. Sedláček, Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation on a hyaluronic acid ester scaffolds (Hyalograft C), *Acta Chir. Orthoped. Traum. Čech.* 73 (2006) 251–263.
- [10] C. Povýšil, R. Tomanová, Z. Matějovský, Muscle-specific actin expression in chondroblastoma, *Hum. Pathol.* 28 (1997) 316–320.
- [11] C. Povýšil, P. Dunder, D. Tvrđík, A. Podškubka, R. Kaňa, M. Horák, Desmin-positive and alpha-smooth muscle

- actin positive chondrocytes in human defective articular cartilage – Preliminary report, *Cesk. Patol.* 41 (2005) 133–136.
- [12] L.J. Sandell, T. Aigner, Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis, *Arth. Res.* 3 (2001) 107–113.
- [13] T.O. Schneider, S.M. Mueller, S. Schortkroff, Expression of alpha-smooth muscle actin in canine intervertebral disc in situ and in collagen-glycosaminoglycan matrices in vitro, *J. Orthop. Res.* 17 (1999) 192–199.
- [14] M. Spector, Musculoskeletal connective tissue cells with muscle: expression of muscle actin in and contraction of fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts, *Wound Rep. Reg.* 9 (2001) 11–18.
- [15] J.J. Tomasek, J. McRae, G.K. Owens, C.J. Haaksma, Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor-beta1 control element, *Am. J. Pathol.* 166 (2005) 1343–1351.
- [16] D. Tvrđík, J. Svatošová, P. Dunder, C. Povýšil, Molecular diagnosis of synovial sarcoma: detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts by RT-PCR in paraffin-embedded tissue, *Med. Sci. Monit.* 11 (2005) MT1–7.
- [17] Q.I. Wang, H.A. Breinan, H. Hsu, M. Spector, Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of nonvascular alpha-smooth muscle actin-containing cells, *Wound Rep. Reg.* 8 (2000) 145–158.