

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Veronika Skoupá

Prenatální vývoj končetin a jeho patologie

Prenatal limb development and its pathology

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.

Praha 2020

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 6. 2020

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce RNDr. Márie Hovořákové, Ph.D. za trpělivost, čas a cenné rady při vedení této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, bez jejichž trpělivosti a podpory by tato práce nebyla možná.

ABSTRAKT

Končetinové vady jsou druhé nejčastější vrozené onemocnění u dětí. Vznikají v prenatálním období a za jejich vznik nejčastěji mohou genetické defekty nebo chromozomální abnormality. Vývojové vady končetin mohou být způsobeny i působením rozličných teratogenů, které mohou narušit vývoj plodu. Prenatální vývoj dítěte je nesmírně komplikovaný sled obrovského množství propojených událostí, kterému i přes značné pokroky a objevy v odvětví molekulární biologie za posledních několik desítek let, stále ne úplně rozumíme. Předložená práce se snaží souhrnně popsat problematiku končetinových defektů od jejich vzniku, přes možné příčiny až po několik onemocnění, které jsou s anomáliemi končetin spojeny. Prohlubování znalostí v oblasti vývoje končetin a defektů s ním spojených je důležité pro přesnou prenatální diagnostiku a následné úspěšné léčení pacientů.

Klíčová slova: vrozené vady končetin, teratogeny, Thalidomid, syndromy, končetinový pupen, genetické mutace

ABSTRACT

Limb defects are the second most common congenital disease in children. They occur in the prenatal period and are most often caused by genetic defects or chromosomal abnormalities. Limb defects can also be caused by the action of various teratogens, which can disrupt the development of the fetus. The prenatal development of a child is an extremely complicated sequence of a large number of interconnected events, which, despite considerable advances and discoveries in the field of molecular biology over the last few decades, we still do not fully understand. The present thesis tries to summarize the problem of limb defects from their origin, through possible causes to several diseases that are associated with limb anomalies. Improvement of our knowledge in the field of limb development and defects associated with it is important for accurate prenatal diagnosis and subsequent successful treatment of patients.

Keywords: congenital limb defects, teratogens, Thalidomid, syndroms, limb bud, genetic mutation

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	PRENATÁLNÍ VÝVOJ KONČETIN.....	3
2.1	MOLEKULÁRNÍ REGULACE VÝVOJE KONČETIN.....	4
2.1.1	<i>FGF</i>	6
2.1.2	<i>Hh</i>	7
2.1.3	<i>Hox</i>	8
2.1.4	<i>Tbx</i>	8
3	KLASIFIKACE KONČETINOVÝCH VAD.....	10
3.1	ČÁSTEČNÁ NEBO ÚPLNÁ ABSENCE KONČETINY.....	10
3.2	CHYBY V DIFERENCIACI A SEPARACI ČÁSTÍ KONČETIN.....	12
3.3	DUPLIKACE ČÁSTÍ KONČETIN.....	13
4	VYBRANÉ TERATOGENY ZPŮSOBUJÍCÍ POŠKOZENÍ.....	14
4.1	THALIDOMID.....	14
4.1.1	<i>Mechanismus působení thalidomidu</i>	15
4.2	VITAMIN A.....	16
5	KONČETINOVÉ VADY ZPŮSOBENÉ GENETICKÝMI ONEMOCNĚNÍMI.....	18
5.1	ACHONDROPLÁZIE.....	18
5.2	APERTŮV SYNDROM.....	19
5.3	MARFANŮV SYNDROM.....	20
5.4	ELLIS-VAN CREVELD SYNDROM (EVC).....	21
5.5	OSTEOGENESIS IMPERFECTA.....	22
6	ZÁVĚR.....	25
7	SEZNAM LITERATURY.....	26

Seznam zkratek

AER	Apikální ektodermální hřeben
BMP/Bmp	Kostní morfogenetický protein
CRBN	Cereblon
ECM	Extracelulární matrix
EvC	Ellis-van Creveld syndrom
FGF/Fgf	Fibroblastový růstový faktor
FGFR/Fgfr	Receptor fibroblastového růstového faktoru
Hh	Rodina hedgehog
Hox	Homeobox geny
ITR	Isotretinoin
LPM	Laterální ploténka mesodermu
OI	Osteogenesis imperfecta
Ptc1	Protein Patch1
RA	Kyselina retinová
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Protein Smoothened
WNT/Wnt	Wingless
ZPA	Zóna polarizační aktivity

1 Úvod

Tato bakalářská práce pojednává o prenatálním vývoji končetin a o patologiích, které jsou s ním spojené. Pokusím se zahrnout i molekulární podstatu vývoje a mutace či mechanismy zodpovědné za některé patologické stavy končetin.

Vývojové vady končetin vznikají odchylkou od normálního vývojového procesu v prenatálním období a jsou tedy pro svého nositele patologické. Tyto vady zahrnují široké spektrum změn, přičemž některé způsobí pouze mírnou odchylku oproti normální anatomii končetin. Jiné ovšem mohou být závažné až fatální a zapříčinit úmrtí již v prenatálním období nebo krátce po narození. V dnešní době existuje již množství moderních metod (např. ultrazvukové vyšetření, aminocentéza), které pomáhají vývojové vady či jejich příčiny včas odhalit.

Příčiny vrozených vad končetin jsou různé a může se jednat i o kombinace několika faktorů. Obecně ale tyto příčiny dělíme na genetické a na vnější, které označujeme jako teratogeny. Většina patologických stavů končetin je spojována s genetickými příčinami (až 90%) (Dungl, 2014). Může se jednat o chromozomální aberace či mutace v jednom nebo více genech. Teratogeny jsou vnější faktory, které zapříčiňují vznik vrozené vady nebo významně zvyšují riziko vzniku této vady. Dělíme je do tří skupin - chemické, biologické a mechanické. Mezi chemické teratogeny patří léky, například warfarin, cytostatika, retinoidy, látky steroidní povahy i některá antibiotika. Významným teratogenem je alkohol a některé další drogy i průmyslové látky (rtuť, insekticidy, benzen). Významné biologické teratogeny jsou některá infekční onemocnění, především virového původu (např. zarděnky, virus chřipky, herpes zoster) ale i onemocnění způsobené prvokem *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosa) případně bakteriemi (syfilis) (Dungl, 2014). Vývojové vady mohou zapříčinit i některá onemocnění matky (např. diabetes mellitus, fenyktonurie) nebo anomálie dělohy či placenty. Do fyzikálních teratogenů řadíme různé typy ionizujícího záření (např. RTG) a mechanické vlivy (např. amputace končetin amniotickými pruhy).

U jednotlivých teratogenů rozeznáváme tzv. kritickou periodu, po kterou je plod na určitý faktor obzvláště citlivý, respektive kdy se vyvíjí orgánová soustava nebo část embrya, na kterou má daný teratogen obzvláště nepříznivé účinky (Novotná *et al.*, 2005). Obecně ale platí, že nejhorší důsledky má působení teratogenů v průběhu prvního trimestru při samotné embryogenezi. Působením teratogenů v pozdějším období, tedy druhý a třetí trimestr,

většinou vzniká funkční vada (Dungl, 2014). Také závisí na dávce teratogenu, nízká koncentrace nemusí mít žádný nebo má pouze mírnější účinek.

Dnes již existuje samostatný vědní obor, který se působením teratogenů zabývá, nazývá se teratologie. Za zakladatele je považován francouzský přírodovědec É. G. Saint-Hilaire, hlavně zásluhou jeho publikace *Traité de teratologie* z roku 1832.

2 Prenatální vývoj končetin

Vývoj končetin začíná ve čtvrtém týdnu od oplození. Končetiny se zakládají jako zřasení tělní stěny ve formě párových pupenů horních i dolních končetin. Pupeny tvoří mesenchymové jádro, ze kterého vznikne skelet a všechny ostatní pojivové tkáně končetin. Toto jádro je kryto ektodermem. Vývoj dolních končetin je asi o dva dny opožděn oproti horním končetinám, tento trend platí v celém vývoji končetin (Moore *et al.*, 2002). Výchozí buňky ostatních tkání do končetin migrují (myogenní buňky, melanoblasty, Schwannovy buňky, angioblasty). Kolem šestého týdne vývoje plodu se distální části končetin zplošťují a vzniká autopodium - samotný základ ruky i nohy, díky rovnoměrnému zaškrčení a tím pádem oddělení od zbytku končetiny - axopodia (Sadler, 2011). Později se tvoří základní struktura charakteristická pro všechny terestrické obratlovcem, která se skládá se ze tří složek. První je stylopodium, což je proximální část tvořena humerem nebo femurem. Druhá složka, zeugopodium je prostřední část tvořená dvěma kostmi. Na horní končetině je to *radius* a *ulna*, na dolní *tibia* a *fibula*. Třetí segment, autopodium je distální část a představuje vlastní ruku nebo nohu s pěti prsty, které navazují na kosti *karpu* a *metakarpu* nebo *tarzu* a *metatarzu* (Slípka *et al.*, 2019). Pozice končetin na trupu je dána expresí Hox genů, které hrají významnou roli při organizaci tělního plánu a vývoji mnoha orgánových soustav.

Počátkem šestého týdne také dochází k zahušťování a zmnožování mesenchymových buněk, které se postupně diferencují na chondrocyty. Tyto chondrocyty poté vytváří první chrupavčité segmenty budoucích kostí (hyalinní chrupavky) (Sadler, 2011). V šestém týdnu už můžeme pozorovat první pohyby končetin. Mezi šestým a sedmým týdnem dochází k formování všech pěti prstových paprsků. Během sedmého týdne vývoje končetiny rotují. Horní končetiny se stáčí směrem ven, to znamená že extenzorová strana bude lokalizovaná dorsálně s palcem laterálně a dolní končetiny směrem dovnitř, takže extenzorová strana bude ventrálně s palcem mediálně (Sadler, 2011). Formují se prsty, a to díky neproliferujícímu interdigitálnímu mesenchymu nebo apoptóze v budoucích meziprstních štěrbinách (Slípka *et al.*, 2019). V osmém týdnu začíná chondrogenní osifikace kostí a mezi již determinovanými prsty stále přebývá blána, která prsty propojuje. Kolem dvanáctého týdne se vytvářejí primární osifikační centra v diafýze dlouhých kostí a obvykle je diafýza zcela osifikována již při narození. Sekundární osifikační centra se vytvářejí v epifýzách až v raném postnatálním vývoji (Sadler, 2011).

2.1 Molekulární regulace vývoje končetin

Končetinové pupeny se formují jako ztlustění laterální ploténky mesodermu (LPM) na bocích embrya. Transplantační experimenty ukázaly, že oblasti LPM jsou determinovány k vytvoření končetinových pupenů dlouho předtím, než je možné pozorovat jakékoli náznaky samotného pupenu. Je to dáno pozicí mezodermu, která určuje identitu mezodermálních buněk (Geduspan *et al.*, 1992). Kromě toho, aby pupeny vznikly na správném místě, je také klíčové, aby měly stejnou polaritu jako zbytek vznikajícího těla, a tedy aby končetiny byly na těle správně orientovány, což je zajištěno vytvořením signalizačních oblastí v pupenu. Oblast mezi pupeny, kde se žádné končetiny nevyvíjí se označují jako „mezikončetinová oblast“ (angl. *interlimb region*).

Samotné formování končetiny je uspořádáno podél tří kolmých os. Každá z těchto os se vyvíjí pod kontrolou specifické signalizační oblasti. Proximodistální osa, která sahá od trupu až ke konečkům prstů, je řízena signály z fibroblastových růstových faktorů (FGFs) produkovaných v apikálním ektodermálním hřebenem (AER) (Martin, 1998). Osa antero-posteriorní, sahající od palce k malíčku, je regulována signální molekulou Sonic hedgehog (Shh), která je produkována v zóně polarizační aktivity (ZPA) (Chiang *et al.*, 2001). Dorsoventrální osa, která probíhá od hřbetu ruky k dlani, je kontrolována signály z ektodermu, přičemž dorsální ektoderm produkuje signál Wnt7a a ventrální ektoderm produkuje kostní morfogenetické proteiny (BMPs) (Parr *et al.*, 1995; Pizette *et al.*, 2001). Proces, který vede k úspěšnému formování končetinového pupenu, vyžaduje úzkou interakci mezi mechanismy, které řídí tyto tři osy.

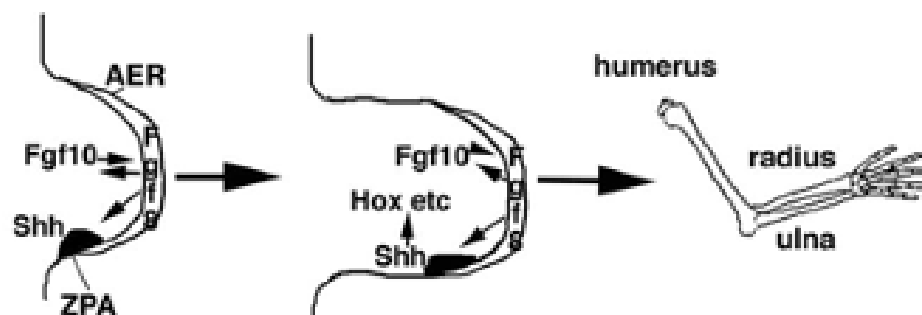
ZPA je shluk mezodermálních buněk, které se nacházejí v zadní distální oblasti mezenchymu končetinového pupenu (Young *et al.*, 2017). AER je zesílený epitel na špičce pupenu. Jeho významná signální role je zajištěna zejména FGF a Wnt signalizací (Yang *et al.*, 1995). Několik členů rodiny FGF a WNT3a je exprimováno z AER a je signalizováno do spodního mezodermu, což stimuluje růst a patterning v proximodistálním směru (Mariani *et al.*, 2008).

AER také produkuje Fgf8, díky kterému mezenchym produkuje Fgf10 a ZPA udržuje sekreci Shh, který zase zpětně udržuje produkci Fgf8. Tato zpětnovazebná smyčka zahrnuje i signální molekuly Gremlin1 a BMPs (Verheyden *et al.*, 2008). BMP jsou exprimovány v mezenchymu pod AER a jejich aktivita potlačuje AER a FGFs.

Udržování ZPA je stimulováno aktivací Shh díky expresi FGF v AER, zatímco udržování AER je stimulováno aktivací Gremlin pomocí Shh, která potlačuje BMPs.

Navíc FGF zabraňují nadměrné aktivaci pozitivní zpětnovazebné smyčky tím, že podporuje downregulaci signální molekuly Gremlin (Tzchori *et al.*, 2009). Tato regulační zpětnovazebná smyčka řídí proliferaci základního mezenchymu a vede tak k samotnému růstu končetinového pupenu (obr. 1). Signalizační oblasti v pupenech končetiny si tedy navzájem udržují aktivitu a poskytují relativně stabilní systém, který zajišťuje patterning a růst ve všech třech směrových osách. Jakmile jsou signalizační oblasti vytvořeny, končetina se může vyvíjet téměř nezávisle, což bylo dokázáno například na pupenu kuřecího křídla, který se vyvíjel normálně i přesto, že byl transplantován na úplně odlišné místo na embryu, než se běžně nachází (Stephens *et al.*, 1993).

Později smyčka také zajišťuje přerušení ZPA a AER aktivity a tím současně reguluje ukončení růstu končetin. Během normálního vývoje se díky růstu vytváří mezera mezi Grem1 a Shh v důsledku šíření bývalých ZPA buněk, které již nereagují na Shh signalizaci. Pokud je tato mezera dostatečně velká, nemůže Shh účinně stimulovat aktivaci Grem1 a zpětnovazebná smyčka se tím přerušuje (Scherz *et al.*, 2004). K přerušení smyčky také přispívá postupné zvyšování FGF signalizace, které inhibuje Grem1 v distální oblasti, což vede k vysokým hladinám BMP a ukončení smyčky (Verheyden *et al.*, 2008).



Obrázek 1: Normální vývoj končetiny řízený signálem z apikální ektodermální lišty (AER) a signálem ze zóny polarizační aktivity (ZPA) (adaptováno podle Vargesson, 2015).

Smyčka také aktivuje například Hox geny, které zajišťují stavbu kostí i měkkých tkání (Vargesson, 2015) a také pozici končetin na trupu podél kraniokaudální osy (Sadler, 2011). U amniot jsou pro udržení pozitivní zpětnovazebné smyčky klíčové transkripční faktory Tbx5 (v případě přední končetiny) nebo Tbx4 (případě zadní končetiny), které přímo regulují expresi Fgf10 (Agarwal *et al.*, 2003). Aby celý systém fungoval, je důležité udržet Fgf i Shh signalizaci v rostoucím distálním konci končetiny, ale zároveň signalizaci postupně utlumit v proximální části končetiny (Verheyden *et al.*, 2008).

2.1.1 FGF

Signální dráhy FGF jsou nezbytné pro regulaci vývoje kostry obratlovců. FGF signalizace reguluje vývoj končetinových pupenů, udržuje buněčnou proliferaci v rostoucí části a má klíčovou roli v regulaci chondrogenese a osteogeneze (Ornitz *et al.*, 2015). Společným znakem FGF rodiny je to, že jsou strukturně příbuzné a obecně signalizují prostřednictvím receptorových tyrosinkináz. Na FGF signalizaci také závisí Shh exprese, protože jak už bylo řečeno dříve, veškeré molekulární děje zajišťující tvorbu končetiny tvoří souvislý propojený cyklus, kdy exprese jednoho faktoru přímo či nepřímo ovlivňuje faktor jiný. Narušení FGF signalizace může vést k patologickým stavům hlavně díky *gain* nebo *loss of function* mutacím.

U člověka rozeznáváme 22 proteinů, které patří do FGF rodiny. Tyto proteiny mají vysokou afinitu pro heparin a vysokou sekvenční homologii v centrální doméně jádra, která interaguje s receptory fibroblastového růstového faktoru (FGFR) (Plotnikov *et al.*, 2000). FGF jsou difúzní a jejich aktivita závisí na koncentraci, to znamená že jsou schopny indukovat různé v geny v různých koncentracích (Green *et al.*, 1992). FGF lze rozdělit do podskupin podle struktury, biochemických vlastností a exprese. Například členové podskupiny FGF8 (FGF8, FGF17, FGF18) mají z 70–80% stejnou aminokyselinovou sekvenci, jejich exprese se překrývá a také se podobně váží na receptory (Goetz *et al.*, 2012). FGF indukují svou aktivitu tak, že se navážou a tím následně aktivují FGFR. U obratlovců se vyskytují 4 velmi příbuzné geny – FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, které kódují transmembránové proteiny s extracelulární oblastí vázající ligand a intercelulární doménou, která zajišťuje aktivitu tyrosinkináz. V okamžiku vazby FGF na FGFR dojde k dimerizaci receptoru a aktivaci tyrosinkináz, což má za následek autofosforylaci intracelulární domény (Ornitz *et al.*, 2015).

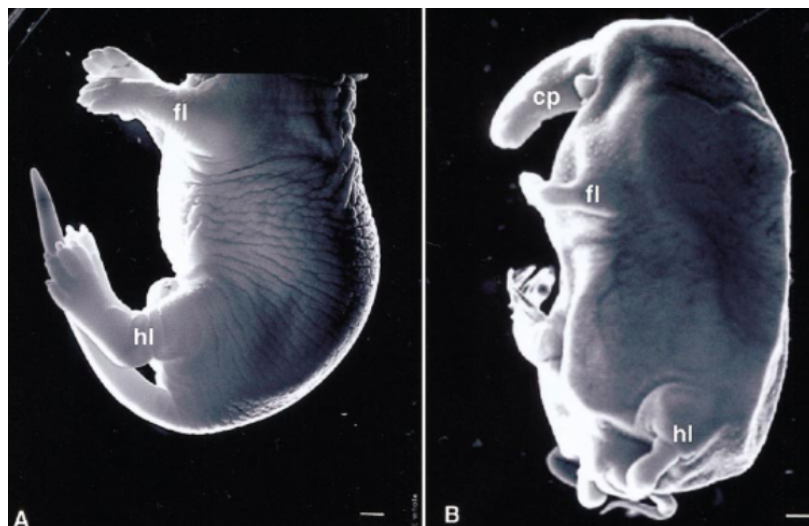
Další přenos FGF může probíhat několika mechanismy. Nejběžnější je přenos přes MAPK, který zahrnuje dokovací protein FRS2 ukotvený v lipidech, který se váže na FGFR1 (Ong *et al.*, 2000). Po navázání funguje FRS2 jako iniciátor sestavení multiproteinového komplexu, který následně aktivuje a řídí signální kaskádu Ras-MAPK. Fosforylovaný FRS2 zprostředkuje aktivaci Ras prostřednictvím GTP výměny. Jakmile je Ras aktivně navázaný na GTP, dojde prostřednictvím několika efektorových proteinů k aktivaci signální kaskády MAPK (Kouhara *et al.*, 1997).

2.1.2 Hh

Hh signální kaskáda zahrnuje několik molekulárních interakcí, které se podílejí na přenosu signálu. U obratlovců to jsou 3 hedgehogové proteiny, již zmíněný Shh, Indian Hedgehog (Ihh) a Desert Hedgehog (Dhh) (Pan *et al.*, 2013). Na myších bylo zjištěno, že vyřazení Dhh se fenotypově neprojeví, zatímco vyřazení Shh i Ihh mělo za následek vývojové vady nebo smrt (Chiang *et al.*, 2001; St-Jacques *et al.*, 1999).

K prvotní iniciaci Hh signalizace dochází v primární cíli, po které se do cíle přesouvají *Suppressor of Fused* (SUFU) proteiny společně s Gli (SUFU–GLI), což usnadní disociaci SUFU–GLI proteinového komplexu, které vede k uvolnění Gli proteinů a další aktivaci HH signalizace (Tukachinsky *et al.*, 2010). Ciliární proteiny jsou s velkou pravděpodobností kriticky důležité pro přenos HH signálů, protože embrya s mutací právě v těchto proteinech vykazovaly defekty charakteristické pro poruchy HH signalizace (např. kosterní a kraniofaciální defekty) (Ashe *et al.*, 2012). Pokud není přítomen HH morfogen, tak membránový protein Patch1 (Ptc1) brání aktivaci HH dráhy inhibicí aktivity Smoothened (Smo). Po navázání HH morfogenu mění Ptc1 svou konformaci a již není schopen potlačovat Smo aktivitu., což má za následek translokaci Gli proteinů do jádra (Rohatgi *et al.*, 2007).

Hedgehogový protein Shh je nezbytný pro vývoj dorzoventrálního uspořádání nervové trubice a antero-posteriorního uspořádání končetin (obr. 2). Jeho produkci udržuje ZPA, jejíž buňky produkuje RA, která spouští expresi Shh (Sadler, 2011). V nepřítomnosti Shh AER ustupuje a posteriorní části vyvíjející se končetiny se ztrácí (Chiang *et al.*, 2001). Shh také ovlivňuje šířku končetinového pupenu tím, že stimuluje proliferaci buněk mezenchymu a reguluje antero-posteriorní délku AER (Tickle *et al.*, 1975). Samotnou aktivaci Shh signalizace zajišťuje vzájemná regulace Hand2 (pozitivní regulátor) a Gli3 (negativní regulátor), která dává nezbytný základ pro další indukci Shh. Tato regulace ovlivňuje úroveň aktivity Hand2, která přímo indukuje Shh expresi (Matsubara *et al.*, 2017). FGF exprimované v AER jsou nezbytné pro další aktivaci a následné udržení Shh signalizace.



Obrázek 2: Porovnání normálního fenotypu myši (viz obr. A) s mutantem (B), který postrádá *Shh* signalizaci. U mutantního fenotypu se vyvinuly všechny 4 končetiny včetně kostí a je dodržena antero-posteriorní polarita. Distálně od loketních a kolenních kloubů se také vyvinuly kosti, ovšem už chybí antero-posteriorní polarita. AER má i v mutantech relativně normální morfologii, která se ale postupem času narušuje a souběžně s tím se snižuje exprese *FGF8* v AER a navíc dochází k abnormální apoptóze v mesenchymu přední (fl) i zadní (hl) končetiny (adaptováno podle Chiang *et al.*, 2001).

2.1.3 Hox

Expresí Hox genů je aktivována v paraxiálních mezodermálních buňkách díky FGF signalizaci. Expresní domény se pak šíří dopředu, takže mesodermální buňky v různých polohách podél antero-posteriorní osy těla exprimují různé kombinace Hox genů: anteriorní buňky exprimují 3' Hox geny a posteriorní buňky exprimující 5' Hox geny (Iimura *et al.*, 2007). K formování posteriorní části pupenu přední končetiny je nutná aktivita Hox9 (Xu *et al.*, 2011). U zadních končetin plní téměř totožnou funkci jako Hox9 transkripční faktor *Islet1* (který se mi jiné podílí na expresi *Tbx4*). Tudiž zatím nebylo prokázáno, že by Hox geny byly do vývoje zadních končetin zapojeny tak, jako jsou ve vývoji těch předních (Narkis *et al.*, 2012).

Hox genová aktivita je přímo spojena se zahájením exprese *Tbx5* genu podél antero-posteriorní osy těla, ze které se později vytvoří přední končetiny (Koop *et al.*, 2010).

2.1.4 Tbx

Tbx5 je nezbytné pro tvorbu přední končetiny a Tbx4 je nezbytná pro tvorbu zadní končetiny. V experimentech vynucená exprese Tbx5 nebo Tbx4 v buňkách mezikončetinové oblasti u embryí kuřat způsobila vznik struktur, které byly podobné křídům nebo nohám (Takeuchi *et al.*, 2003). Nedošlo tedy k vývoji samotných křídel nebo nohou, proto je více než pravděpodobné, že k vývoji samotných končetin jsou nezbytné i další signály či transkripční faktory, které působí v kombinaci s Tbx5 a Tbx4.

Tbx geny jsou tedy nezbytné, nicméně studie odhalily, že ve vývoji končetin hrají neméně důležitou roli i další faktory, například kyselina retinová (RA) (Stratford *et al.*, 1996). Exprese Tbx5 v LPM a následný vývoj končetinového pupene přední končetiny vyžaduje signalizaci RA. Dosud je nejasné, zda je RA signalizace nutná i pro formování zadní končetiny. Bylo provedeno několik studií, kdy některé uvádějí, že RA je nezbytná pro formování pupenu zadní končetiny (Nishimoto *et al.*, 2015) a několik dalších, které naznačují opak (Zhao *et al.*, 2009).

3 Klasifikace končetinových vad

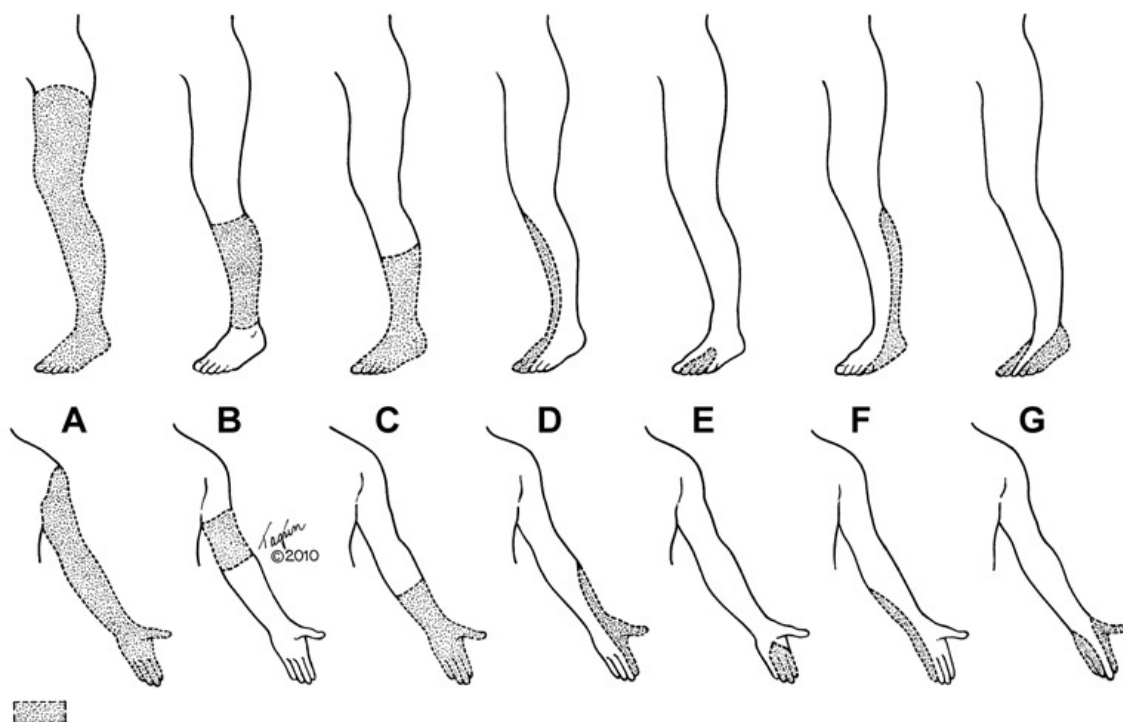
Jakýkoliv vrozený defekt končetin se všeobecně označuje jako dysmelie. Vrozené končetinové vady mohou být rozděleny do několika skupin podle rozličných kritérií. Bohužel tato klasifikace je velice nejednotná a záleží na úhlu pohledu každého odborníka. Světová zdravotnická organizace (WHO) projevila snahu vytvořit jednotný vzor, a to Mezinárodní klasifikaci nemocí (ICD), podle kterého by bylo možné vady zařazovat. Pro vady končetin byly vytvořeny následující kategorie: vrozené deformity kyčle, vrozené deformity nohou, jiné vrozené svalově-kosterní deformity, polydaktylie, syndaktylie, redukční defekty horní, dolní a neurčené končetiny, jiné vrozené vady končetin, osteochondrodysplázie s poruchou růstu dlouhých kostí a páteře a jiné osteochondrodysplázie (Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů, 2018). V klinické praxi se také využívá klasifikace podle mechanismu vzniku defektu - malformace a deformace. Malformací se rozumí vada, která vznikla v průběhu vývoje samotné končetiny, zásadní je tedy embryonální období. Deformace znamená poškození již vyvinuté končetiny, např. vykloubení ve fetálním období.

Vývin vrozených končetinových vad může být spojen s dalšími vrozenými anomáliemi, což se týká hlavně defektů horní končetiny. V dnešní době už o těchto kombinovaných vrozených abnormalitách víme trochu více a u většiny známe genetické příčiny i dědičnost. Nicméně každé dítě narozené s defektem končetiny by mělo být komplexně vyšetřeno kvůli případným dalším postižením.

3.1 Částečná nebo úplná absence končetiny

Relativně novější rozdělení, které ve velké míře navazuje na první vědeckou klasifikaci dle Frantz *et al.*, 1961, je rozdělení podle Gold *et al.* (2011), které dělí redukční vady končetin na částečnou nebo úplnou absenci. Úplná absence se odborně nazývá amelie a jedná se o nejvyšší stupeň poškození v rámci končetinových vad (Frantz *et al.*, 1961). Částečná absence se dále dělí na interkalární, terminální transverzální (příčné) a longitudinální (podélné). Pro interkalární defekty se v literatuře také používá výraz ektromelie, což je absence střední struktury končetiny (např. *femur*), přičemž distální část (např. noha) je vyvinuta normálně. Pro terminální transverzální vady je charakteristická absence všech distálních struktur, které se nacházejí za pomyslnou osou, která je kolmá na končetinu (např. půlka předloktí nebo samotná ruka). Longitudinální, tedy podélné defekty

jsou definovány jako absence struktur rovnoběžných s podélnou osou končetiny a dělí se dále na několik kategorií, v závislosti na chybějící části končetiny (Frantz et al., 1961) (obr. 3).



Obrázek 3: *A - amelie, B - interkalární defekt (ektromelie), C - terminální transverzální defekt, D,E,F,G - různé typy longitudinálních defektů (adaptováno podle Gold et al., 2011).*

Existuje několik mechanismů, které mohou způsobit částečnou či úplnou absenci končetiny. Jedním z nich je chyba při tvorbě základu končetiny v raných stádiích vývoje embrya, což je nejčastěji způsobeno chybou v genetické kontrole vývoje končetin (Bermejo-Sánchez *et al.*, 2011). Nicméně amelie je jako symptom spojována s asi 31 syndromy (Bermejo-Sánchez *et al.*, 2011), takže je poměrně vzácná a obecně není považována za geneticky podmíněnou vadu, její výskyt je většinou ojedinělý (Lenz, 1980).

Další příčina absence končetiny může být amputace amniotickými pásy *in utero*. Byly zaznamenány případy, kdy amniotické pásy vytvořily kolem vyvíjející se končetiny zúžení, které narušilo její růst a v těžkých případech způsobilo amputaci (Tadmor *et al.*, 1997).

Posledním mechanismem je narušení krevního zásobení vyvíjející se končetiny, které může způsobit nedostatečné prokrvení končetinových pupenů, což vede k defektům se širokou škálou závažnosti. Takové narušení krevního zásobování může být důsledkem uzavření děložních tepen nebo vystavení faktorům, které snižují průtok krve v děložní či placentární jednotce (např. kokain) (Bermejo-Sánchez *et al.*, 2011). Kromě toho některé abnormality placentálně-fetální jednotky (např. obstrukce pupeční šňůry), vnější stlačení

krevních cév nebo embolické jevy mohou narušit krevní zásobení vyvíjejících se končetin a tím způsobit absenci celé končetiny, nebo její části.

3.2 Chyby v diferenciaci a separaci částí končetin

Nesprávná separace či diferenciacie se nejčastěji týká článků prstů a nazývá se syndaktylie. Tento abnormální srůst sousedních článků prstů způsobují poruchy apoptózy v průběhu embryogeneze. Nejčastěji se jedná o srůst prostředníku a prsteníku (tedy *digitus medius* a *digitus annularis*) (Chong, 2010). Syndaktylie se dělí na několik typů. Podle délky spojení prstů rozlišujeme kompletní (srůst v celé délce) (obr. 4) a nekompletní (srůst jen části prstů) syndaktylii a podle charakteru spojení rozlišujeme jednoduchou (prsty spojeny jen kůží) a komplexní (spojení kostí) syndaktylii.

Vznik syndaktylie začíná aktivací WNT signalizace nebo supresí BMP signalizace, což vede ke zvýšené expresi *Fgf8* v AER a také v mesodermu (Villacorte *et al.*, 2010). Spuštění WNT signalizace může mít na svědomí např. LRP4, což je silný supresor signalizace WNT, a proto ztráta funkčních mutací LRP4 povede k aktivaci WNT (Li *et al.*, 2010). LRP4 je exprimován v AER. Ztráta LRP4 způsobuje strukturální změny právě v AER a narušuje expresi různých klíčových signálních molekul (např. *Fgf8*, *Bmp4* a *Shh*). Klíčová je nadměrná exprese *Fgf8*, která vede k potlačení RA v interdigitálních prostorách, což nakonec vyústí k syndaktylii, protože dojde k potlačení apoptózy a degradace extracelulární matrix (ECM) (Hernández-Martínez *et al.* 2011). Normálně je apoptóza zahájena působením proapoptotických proteinů, jako je BAX a BAK (Ren *et al.*, 2010), jejichž promotorová oblast reaguje právě na RA (Hernández-Martínez *et al.*, 2009).



Obrázek 4: Kompletní jednoduchá syndaktylie (adaptováno podle Chong, 2010).

3.3 Duplikace částí končetin

Stav, kdy dojde k vývoji nadpočetných končetinových segmentů se nazývá polydaktylie a vzniká kvůli rozštěpení embryonálních tkání. Nejčastěji dochází k duplikaci palce (digitus primus) (Chong, 2010) (obr. 5). Duplikované části mají různé podoby i velikosti a měli bychom na ně nahlížet spíše jako na struktury, které se rozštěpily než samostatné články, které jsou navíc. Polydaktylie se buď vyskytuje jako součást syndromu (syndromická polydaktylie) nebo se může objevit jako samostatná událost (nesyndromická polydaktylie) (Umair *et al.*, 2018). Nesyndromickou polydaktylii dělíme do 3 typů: duplikace palce (preaxiální), duplikace malíku (postaxiální) a duplikace ukazováku, prostředníku nebo prsteníku (centrální).

Současná genetická a molekulární klasifikace naznačuje, že nejméně šest různých typů polydaktylií je způsobeno mutacemi ve dvou různých genech, *ZRS* a *GLI3*, což jsou Shh enhancery (Umair *et al.*, 2018). Narušení signalizace Shh - Patched – *Gli* vede k rozličným onemocněním (např. vrozené vady, kostní anomálie) a obecně je tato rovnováha velmi důležitá k udržení předozadní osy při vývoji končetin. Patogenní mutace v *GLI3* může způsobit preaxiální i postaxiální polydaktylii (Radhakrishna *et al.*, 1999). Nicméně složitost polydaktylie spočívá v genetické heterogenitě, která se liší napříč různými etnickými skupinami i populacemi (Dy *et al.*, 2014).

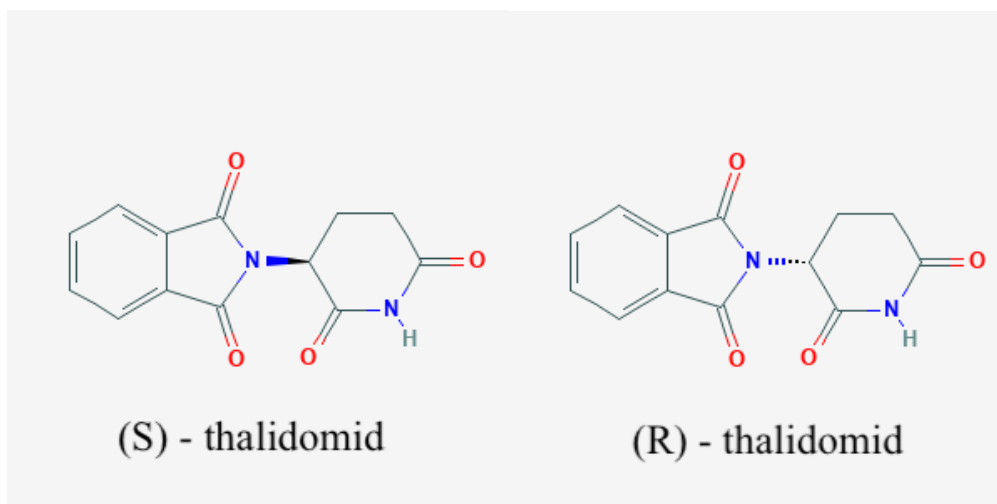


Obrázek 5: Duplikace palce, která vyústila v polydaktylii (adaptováno podle Chong, 2010).

4 Vybrané teratogeny způsobující poškození

4.1 Thalidomid

Thalidomid je chemická látka, která se používala v 50. letech 20. století zejména v západní Evropě, jako sedativum a lék proti nevolnosti pro těhotné ženy. Chemicky se jedná o derivát kyseliny glutamové, složen z glutarimidového a phtalimidového kruhu. V léčivých přípravcích se využívala směs S (-) a R (+) izomerů (obr. 7). R (+) izomer je účinné sedativum, zatímco S (-) izomer je příčinou teratogenity. Bohužel nelze použít jen jeden izomer, protože mezi nimi dochází za fyziologických podmínek k vzájemným přechodům (Mori *et al.*, 2018).



Obrázek 6: Převzato a upraveno z www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

Začátkem 60. let náhle vzrostl počet vrozených končetinových vad (úplných i částečných defektů), a proto začalo zpětné pátrání po příčině. Bylo zjištěno, že velké procento matek na začátku těhotenství užívalo právě lék thalidomid. Spojitost mezi vrozenými vadami postižených dětí a tímto lékem byla odhaleno hlavně díky neobvyklosti abnormalit (Sadler, 2011). Vlivem tragédie, kterou thalidomid způsobil, bylo zavedeno systematictější a přísnější testování léčiv před uvedením na trh. Také došlo k tomu, že léky musí být testovány minimálně na dvou živočišných druzích, z nichž jeden není hlodavec, protože mezi druhy existuje rozdílná citlivost na toxicitu látek (Kim *et al.*, 2012).

Teratogenní účinky thalidomidu nejčastěji postihují končetiny, ale byla zaznamenána i postižení urogenitálního systému, gastrointestinálního systému a kardiovaskulárního systému.

Také se vyskytlo postižení některých obličejových smyslových orgánů (absence uší, deformace nosu, poškození zrakové ústrojí). Tento výčet symptomů se dá shrnout a pojmenovat jako thalidomidový syndrom (Newman, 1985).

Poškození končetin závisí na fázi, kdy byl plod thalidomidu vystaven a také na délce jeho působení a na množství léku. Má se za to, že thalidomid nemůže poškodit končetinu po uplynutí kritické periody jejího vývoje, nicméně se ukázalo, že působení thalidomidu ještě před kritickou periodou vývoje končetiny způsobuje potrat. Naopak působením v pozdější fázi může vyvolat poškození mozku (Kajii *et al.*, 1973; James, 1965). Tento fakt naznačuje, že v prenatálním vývoji neexistuje časové období, kdy by thalidomid nepůsobil na plod teratogenně (Vargesson, 2015).

4.1.1 Mechanismus působení thalidomidu

Od okamžiku odhalení negativních účinků thalidomidu na nenarozené děti proběhlo mnoho studií a bylo vysloveno mnoho různých teorií, které se snažily vysvětlit a popsat mechanismus působení léku. Tyto hypotézy mohou být částečně pravdivé, ale určení přesného působení thalidomidu není snadné, vzhledem k jeho chemickému složení a metabolismu (Vargesson, 2015).

Několik teorií bylo ověřeno a dokázáno, například působení thalidomidu na plod prostřednictvím jeho vazby na cereblon (CRBN). CRBN je substrátový receptor ubikvitin ligázového komplexu (Belair *et al.*, 2020). Původně se myslelo, že za teratogenní jevy byl zodpovědný samotný CRBN. Až v roce 2010 bylo prokázáno, že CRBN byl cílem účinku thalidomidu (Ito *et al.*, 2010). Po tomto objevu pokračovala zkoumání CRBN *in vivo* na *Danio rerio*. Experimenty potvrdily hypotézu, že za teratogenní účinky thalidomidu je zodpovědný CRBN, thalidomid totiž snížil hladinu Fgf8, který je nezbytný pro normální vývoj a růst končetin (Moon *et al.*, 2000). Vazba thalidomidu na CRBN vyvolává i další degradace CRBN neosubstrátu, například transkripčního faktoru SALL4. Právě polymorfismy SALL4 indukované působením thalidomidu, způsobují u člověka končetinové vady (Ito *et al.*, 2010). Thalidomid díky svým imunomodulačním účinkům inhibuje diferenciaci mezodermu v průběhu vývoje končetin. Rozsah poškození závisí na množství podané látky.

Narušením diferenciaci mesodermu laterální ploténky, CRBN zprostředkované působení thalidomidu neumožní následnou chondrogenní diferenciaci (Belair *et al.*, 2020). Další mechanismus, který byl dokázán v souvislosti s teratogenitou je, že thalidomid působí antiangiogenně. Angiogeneze jako taková, je v procesu tvorby končetin klíčová. Zajišťuje okysličování a dodávání živin do rostoucích tkání, ale je také nezbytná pro transport

odpadních látek z rostoucích tkání. Krevní kapiláry, které vznikají díky angiogenezi jsou nezbytné pro normální embryogenezi. Poškození nebo dokonce ztráta kapiláry, může vést k potratu nebo vrozené vadě (Vargesson, 2009).

V pokusech byl použit CPS49, antiangiogenní analog thalidomidu, který byl fluorovaný, za účelem zvýšení stability a biologické aktivity (Therapontos *et al.*, 2009). CPS49 byl v době kritické periody aplikován do horní poloviny embryí kuřat. Do hodiny od expozice došlo k poškození cévního řečiště, do 24 hodin od expozice bylo viditelné zkrácení končetin a došlo k inhibici FGF a Shh signalizace (Vargesson, 2015). Stejně jako u thalidomidu, důsledky působení CPS49 se liší v závislosti na době, kdy látka na embryo působila. Čím dříve bylo embryo CPS49 vystaveno, tím byly vady závažnější (např. zkrácené končetiny, amelie). Pozdější expozice vedla k méně vážným poškozením (chybějící článek prstu, nebo samotný prst) (Vargesson, 2015). Také bylo zjištěno, že CPS49 nepostihuje všechny krevní cévy stejně. Ukázalo se, že antiangiogenně zasahuje zejména končetinové cévy, protože v době aplikace látky jsou v procesu tvorby, tedy relativně nezralé a na rozdíl od zbytku cév embrya jim chybí vaskulární buňky hladkého svalstva, proto jsou méně odolné (Therapontos *et al.*, 2009).

4.2 Vitamin A

Vitamin A je v tucích rozpustný vitamín. V organismu se vytváří z β -karotenu (provitaminu A) a některých jiných karotenoidů. Pojem vitamin A zahrnuje látky, které ve své sloučenině mají retinoidní část. Neexistuje tedy jedna konkrétní látka, která by byla známá jako vitamin A, je jich několik a jedna z nich, retinol se rozkládá na retinal a kyselina retinovou (RA), která je také známá je tretinoin a její cis izomer isotretinoin (ITR) se používá v lékařství jako lék proti těžkým formám akné. Teratogenní efekt tohoto léku je známý a silně se nedoporučuje jeho užívání v těhotenství ani v kratším časovém úseku před otěhotněním (Rosa *et al.*, 1986). Zdá se, že za škodlivé účinky ITR může zvýšená apoptóza buněk neurální lišty, kterou lék způsobuje (Melnik, 2017).

RA je jedním z faktorů, které se podílí na správném vývoji končetin a který iniciuje růst končetinových pupenů, tím že indukuje expresi Shh (Feneck *et al.*, 2020). Dřívější experimenty tuto skutečnost dokázaly na pokusech s embryi kuřat, kterým byl lokálně aplikován disulfiram, chemická látka, která blokuje syntézu RA (Stratford *et al.*, 1996). U těchto kuřat došlo k narušení formace končetinových pupenů. U dospělých RA ovlivňuje funkci urogenitálního systému, imunitního systému, ale i kůže, kostí a dalších systémů. U

embrya je RA nezbytná pro vedení růstu i vývoje a patterningu v mnoha orgánových systémech. Ovšem expozice RA v abnormálních koncentracích (například již zmíněný ITR) vede k různým malformacím. Stejně tak nedostatek RA může způsobit poškození centrální nervové soustavy (CNS) v samém počátku, kvůli narušení migrace buněk z neurální lišty a zároveň jejich zvýšené apoptóze (McCaffery *et al.*, 2003). To znamená, že aby byla zachována správná funkce RA, musí být lokalizována do správné oblasti ve správný čas a ve správné koncentraci. Narušení regulační funkce ať už vysokými či nízkými hladinami vitamínu A nebo RA může negativně ovlivnit vývoj embrya.

5 Končetinové vady způsobené genetickými onemocněními

5.1 Achondroplázie

Achondroplázie je charakterizována jako disproporcionální trpaslictví (*dwarfismus*) s krátkými končetinami, přičemž nejvíce jsou zasaženy proximální části končetin. Dědí se autozomálně dominantně, nicméně většina případů není zapříčiněna dědičností, ale genovou mutací, přičemž vyšší věk rodičů, zejména otce je rizikovým faktorem (Orioli *et al.*, 1986). Toto onemocnění patří k nejčastějším kostním dysplaziím.

Poškození způsobuje porucha proliferace buněk, díky které dlouhé kosti rostou pomalu, zatímco epifýzy i klouby jsou normální (Dungl, 2014). Klinické projevy zahrnují zkrácení horních i dolních končetin. Loket má omezený rozsah, u prstů pozorujeme brachydaktylii. Typická je malá postava (*dwarfismus*), nicméně novorozenci mohou mít standardní délku (Horton *et al.*, 1978). V dospělosti lidé postižení achondroplázií dosahují v průměru 131 cm u mužů a 124 cm u žen (Dungl, 2014). Hlava je od už od narození větší a rozšířená. Tvář je širší, zploštělá a dominuje jí čelo a dolní čelist, nos má rozšířený kořen a je také zploštělý (obr. 7).



Obrázek 7: Typické zkrácení končetin u dospělého jedince a detail kraniofaciálních rysů u dítěte (adaptováno podle Pauli, 2019).

Molekulární příčina byla objasněna v roce 1994, kdy byla objevena mutace na 4. chromozomu, který kóduje receptor fibroblastového růstového faktoru (FGFR3) (Shiang *et al.*, 1994). Posléze bylo ukázáno, že téměř všechny případy achondroplázie jsou způsobeny

mutací FGFR3 a to dokonce v totožném nukleotidovém páru. Tato stejná mutace způsobila substituci glycinu za arginin (Rousseau *et al.*, 1994). FGFR3 je buněčný receptor, který ovlivňuje buněčnou proliferaci. Za normálních podmínek je FGFR3 neaktivní, ale určité FGFs se mohou zachovat jako ligandy a na FGFR3 se navázat a tím způsobit šíření intracelulárního signálu (Eswarakumar *et al.*, 2005). Tímto signálem potom FGFR3 negativně působí na růst kostí (snižuje diferenciaci chondrocytů v oblasti růstové chrupavky a inhibuje expresi morfogenetického proteinu BMP4) (Dunzl, 2014).

5.2 Apertův syndrom

Apertův syndrom, také označován jako akrocefalosyndaktylie, je poměrně vzácné geneticky podmíněné onemocnění, které se dědí autozomálně dominantně, ale ve většině případů jde o spontánní mutaci (Dunzl, 2014). Syndrom postihuje lebku (předčasné uzavření švů) a na ruku a nohou způsobuje syndaktylii (obr. 8).

Mutace, které způsobují Apertův syndrom jsou výhradně paternálního původu (Moloney *et al.*, 1996) a konkrétně se jedná o 2 mutace aminokyselin v receptoru fibroblastového růstového faktoru (FGFR2) (Oldridge *et al.*, 1999). FGFR2 je jedním ze čtyř transmembránových FGFR, které zprostředkovávají signalizaci FGF, hrají zásadní roli při kosterním vývoji a kontrolují buněčnou migraci, proliferaci a diferenciaci (Ornitz, 2005). První mutace S252W se vyskytuje častěji a je spojována s kraniofaciálními malformacemi, druhá mutace označována jako P253R způsobuje syndaktylii (Slaney *et al.*, 1996). Mezi další onemocnění způsobené mutacemi ve FGFR2 patří *Beare-Stevenson cutis gyrata* syndrom, Crouzonův syndrom nebo Pfeifferův syndrom (Reardon *et al.*, 1994 ; Muenke *et al.* 1994; Przylepa *et al.*, 1996).



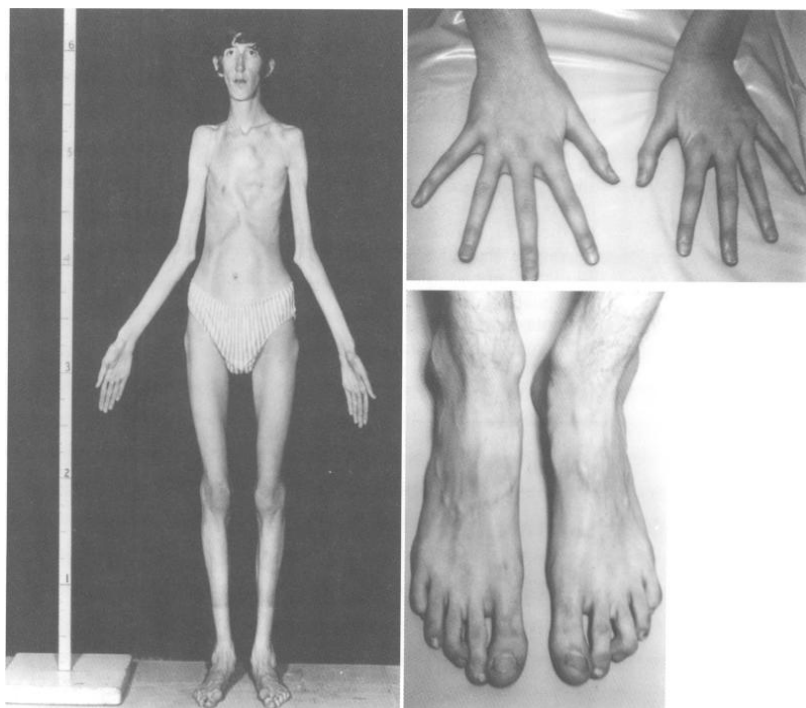
Obrázek 8: Syndaktylie rukou a typický tvar lebky a tváře s širokými očnicemi a exoftalmem (vysunuté bulby dopředu) charakteristický pro Apertův syndrom (adaptováno podle Siminel *et al.*, 2017).

5.3 Marfanův syndrom

Jedná se o onemocnění, které zahrnuje relativně širokou skupinu příznaků, nicméně musí být splněno 5 kritérií, abychom mohli mluvit o Marfanově syndromu: vysoká postava, dlouhé tenké končetiny a prsty (tzv. arachnodaktylie) (obr. 9), dislokace oční čočky a anomálie srdce (Dungl, 2014). Syndrom se dědí autozomálně dominantně, ale asi ve čtvrtině případů je onemocnění způsobeno spontánní mutací (Judge *et al.*, 2005). Vážnost příznaků se velmi liší, u mírnějších forem je tedy obtížné syndrom rozpoznat a pojmenovat, v těchto případech má tedy onemocnění větší pravděpodobnost se v rodinách šířit.

Marfanův syndrom je způsoben poruchou genu *FBNI*, který se nachází na 15. chromozomu a kóduje glykoprotein fibrilin-1 (Kainulainen *et al.*, 1990). Fibrilin-1, je velká strukturální makromolekula, která úzce souvisí s elastinem. Ve *FBNI* se vyskytuje několik typů mutací, ve dvou třetinách případů to jsou bodové *missense* mutace, ve zbytku případů to jsou inserce, delece a duplikace nebo chyby při sestřihu (Robinson *et al.*, 2006).

Široké spektrum příznaků, které se velmi liší v intenzitě je způsobeno tím, že Marfanův syndrom může způsobit mnoho odlišných mutací ve *FBNI*, tím pádem může existovat mnoho různých fenotypů (Sakai, 2016). Mutace ve *FBNI* může dokonce vést k naprosto odlišným příznakům (nízký vzrůst, brachydaktylie), které jsou charakteristické například pro *Weill-Marchesani syndrom* (Chung *et al.*, 2007).



Obrázek 9: Typický fenotyp Marfanova syndromu - vysoká postava, dlouhé horní i dolní končetiny a arachnodaktylie (adaptováno podle Gray *et al.*, 1996).

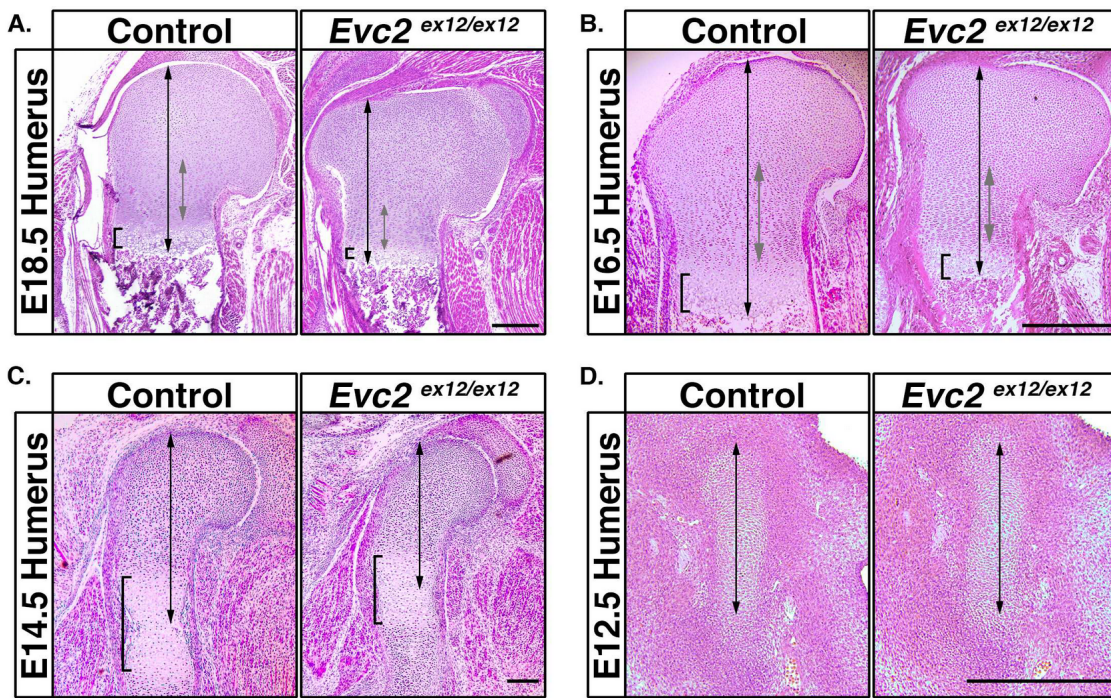
5.4 Ellis-van Creveld syndrom (EvC)

Ellis-van Creveld syndrom (EvC) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genů *EVC* a *EVC2*, které se nachází na chromozomu 4p16 (Polymeropoulos *et al.*, 1996). Toto dědičné onemocnění bylo dříve známo pod pojmy chondroektodermální dysplazie nebo *six-fingered dwarfism* (Singh *et al.*, 2012). Pacienti s touto diagnózou obvykle nesou celou řadu defektů, typické to jsou krátké končetiny, úzký hrudník, polydaktylie, dysplastické nehty i zuby, srdeční vady (Baujat *et al.*, 2007). McKusick popsal větší množství případů v amišské komunitě v Pensylvánii, USA (McKusick, 2000). Vyšší frekvence syndromu se dá vysvětlit nízkou genetickou variabilitou způsobenou uzavřeností amišské komunity a tím pádem příznivým podmínkám pro šíření autozomálně recesivního onemocnění. Později byly popsány případy i z jiných populací (Singh *et al.*, 2012).



Obrázek 10: Pacientka s EvC, u které se projevila ulnární polydaktylie a je patrné zmenšení prstů (zejména palců) společně s dysplastickými nehty (adaptováno dle Sasalawad *et al.*, 2013).

Nedávné studie naznačily, že *EVC* a *EVC2* jsou klíčové pro Shh signalizaci a tím pádem i pro embryonální vývoj (Zhang *et al.*, 2016). Mutace v *EVC* a *EVC2* narušuje Shh signalizaci, ale to samo o sobě není samotná příčina vrozených vad spojených s EvC syndromem. Ukázalo se, že rozhodující je snížení Shh signalizace v kombinaci se zvýšenou FGF signalizací. Tato skutečnost byla dokázána na myších s mutací v *EVC2* (obr. 11), u kterých došlo ke zvýšení FGF signalizace kvůli nadměrné expresi *Fgf18* a *Fgfr3*, přičemž zvýšená *Fgfr3* exprese je důsledek narušené Shh signalizace (Zhang *et al.*, 2016).



Obrázek 11: Srovnání růstových plotének humeru u embryí myši. Je patrné zmenšení růstových plotének u *Evc2* mutantů v porovnání s wild fenotypem, kromě E12.5, kdy se chondrocyty začínaly diferencovat z mezenchymu a není patrný žádný rozdíl v délce. Tento fenomén byl pozorován i u jiných končetinových kostí (např. ulna, radius, femur) (Zhang et al., 2015) a naznačuje to tedy, že *Evc2* mutace cílí na proliferaci nebo zrání chondrocytů růstových plotének, ale neovlivňuje kondenzaci mezenchymálních buněk ani diferenciaci mezenchymu na chondrocyty (adaptováno podle Zhang et al., 2016).

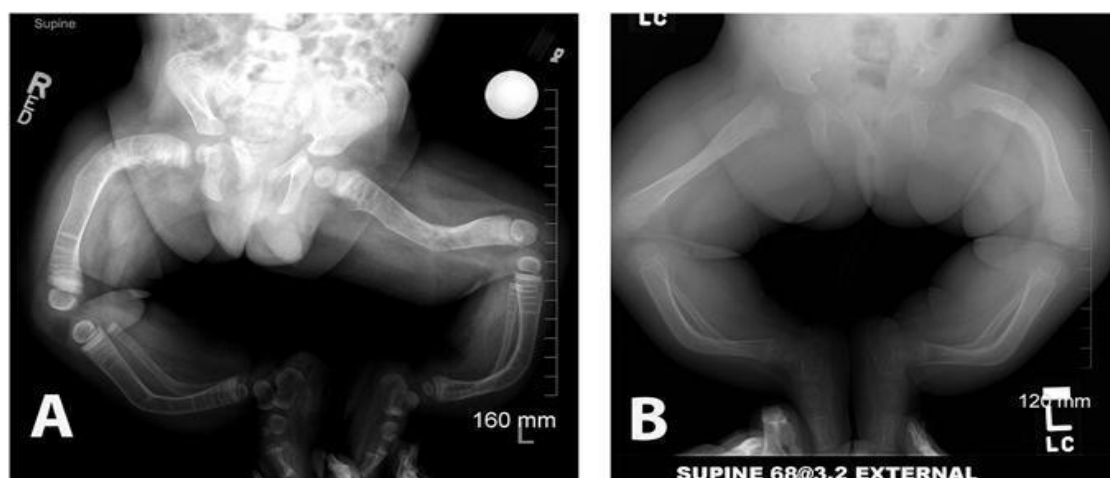
5.5 Osteogenesis imperfecta

Osteogenesis imperfecta (OI) je dědičné onemocnění, které způsobuje deformity kostí a křehkost kostí, což může vést ke zlomeninám dlouhých kostí. Dále se objevuje ztráta sluchu, lámavost zubů, hernie, křehkost měkkých tkání a nadměrné pocení. Symptomy i jejich závažnost se u každého pacienta různí. Onemocnění se většinou dědí autozomálně dominantně, ale může ho způsobit i spontánní mutace. Příčinou všech defektů je nedostatek kolagenu typu I, nebo jeho nahrazení jiným typem kolagenu ale opět v menším množství, díky tomu jsou narušeny všechny typy osifikace (Dungl, 2014).

Poměrně komplikovaná je klasifikace OI, hlavně díky odlišným příznakům onemocnění, a bylo vytvořeno několik klasifikačních systémů, z nichž se nejvíc osvědčilo dělení podle Sillence a dále dělení podle Shapira. Sillencova klasifikace rozděluje případy na základě klinického projevu a dědičnosti. Nejdůležitější jsou typy I-IV, kdy se typ I (mírný) vyznačuje mírnější lomivostí kostí, modrými očními bělmy a presenilní ztrátou sluchu. Typ II (nejtěžší) je klasifikován podle extrémní lomivosti kostí a prenatalním úmrtím, typ III (těžký)

je charakterizován relativně vysokou lomivostí, bílými očními bělmy a sníženým vzrůstem, který je způsobený deformacemi končetin. Typ IV (středně těžký) se vyznačuje středně těžkou lomivostí a bílými očními bělmy (Sillence et al., 1979) (obr. 12). Typy I a IV jsou autozomálně dominantní formy, typy II a III jsou autozomálně recesivní formy (Sillence et al., 1979).

Sillencovo dělení se ale ukázalo jako nedostatečné a muselo být doplněno dělením podle Shapira, který vytvořil klasifikaci na základě období vzniku zlomenin (prenatální nebo postnatální) a jejich závažnosti (Dungl, 2014).



Obrázek 12: Rentgenové snímky dolních končetin pacientů diagnostikovaných s OI. Je zde vidět, že onemocnění má široký rozsah, co se týče závažnosti. Na snímku A je roční dítě s diagnózou závažného OI typu III. Na snímku B je devítiměsíční dítě s mírně závažným OI typu IV (adaptováno podle Morello, 2018).

OI je způsobeno mutací v genech kódujících kolagen typu I (*COL1A1* a *COL1A2*) (Kuivaniemi et al., 1991). Kromě toho je přibližně 10% všech případů OI zapříčiněno mutacemi v genech regulujících posttranslační modifikaci a sekreci kolagenu typu I a také v genech, které zajišťují diferenciaci osteoblastů a mineralizaci kostí (Forlino et al., 2016). Kolagen typu I je trimerní molekula, která se skládá ze dvou řetězců: alfa 1 a alfa 2. Helikální doména je primárně složena z repetice Gly-X-Y, kdy X a Y jsou často obsazovány prolinovými a hydroxyprolinovými zbytky (Eyre et al., 2013). Nejčastější příčinou OI jsou glycinové substituce právě v helikální doméně kolagenu typu I, které mohou ovlivnit sestavení domény. Glycinové substituce v alfa 1 helikálních doménách jsou spojeny s vážnějšími projevy nemoci, zatímco mutace v alfa 2 helikální doméně jsou méně závažné (Lim et al., 2017).

Další mechanismus, který může způsobit OI jsou geny spojené s diferenciací a mineralizací osteoblastů. Osteoblasty jsou primární centra pro ukládání kolagenu v kostech, tudíž abnormality v proliferaci, diferenciaci a funkci osteoblastů významně ovlivňují kvalitu i kvantitu kostí. Jedná se například o WNT signalizační dráhu, která má kritickou funkci pro správnou funkci osteoblastů (Long, 2011). Nedávné studie ukázaly, že homozygotní mutace ve WNT1 může způsobit OI, zatímco heterozygotní *missense* mutace ve WNT1 mohou vést k časnému nástupu osteoporózy (Keupp *et al.*, 2013; Laine *et al.*, 2013). Později byla tato skutečnost dokázána i na modelu myši, která nesla *loss of function* mutaci ve WNT1 a která vykazovala stejný fenotyp jako pacienti s OI (vyšší lomivost kostí, nižší kostní hmotu) (Joeng *et al.*, 2014).

6 Závěr

V několika posledních letech došlo k významnému prohloubení znalostí o tom, jak přesně končetiny v embryu vznikají. Zejména v oblasti faktorů, které ovlivňují determinaci a polaritu končetinového pupenu a tím samozřejmě i výsledné končetiny. Molekulární podstata samotného vývoje je nesmírně složitá a propojená téměř na všech úrovních, takže navzdory všem novým objevům a snahám, stále zůstává několik klíčových otázek nezodpovězených a u jiných, již známých procesů, je třeba objevit a doplnit podrobnosti abychom mohli pochopit proces tvorby končetin. Jeho detailní porozumění je totiž nezbytné pro rozvoj nových a inovativnějších přístupů v léčbě vrozených vývojových vad končetin nebo dokonce jejich předcházení. Například bychom mohli využít transplantaci mezodermálních buněk k opravě poškozených končetin nebo stimulovat tkáň, která obklopuje určitý defekt, k opravě dané vady.

7 Seznam literatury

- Agarwal, P., Wylie, J.N., Galceran, J., Arkhitko, O., Li, C., Deng, C., Grosschedl, R., & Bruneau, B.G. 2003. *Tbx5* is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development*. 130, 624-627.
- Ashe, A., Butterfield, N. C., Town, L., Courtney, A. D., Cooper, A. N., Ferguson, C., Barry, R., Olsson, F., Liem, K. F., Jr, Parton, R. G., Wainwright, B. J., Anderson, K. V., Whitelaw, E., & Wicking, C. 2012. Mutations in mouse *Ift144* model the craniofacial, limb and rib defects in skeletal ciliopathies. *Human molecular genetics*. 21, 1808–1819.
- Baujat, G., & Le Merrer, M. 2007. Ellis-van Creveld syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2, 1-4.
- Belair, D. G., Lu, G., Waller, L. E., Gustin, J. A., Collins, N. D., & Kolaja, K. L. 2020. Thalidomide Inhibits Human iPSC Mesendoderm Differentiation by Modulating CRBN-dependent Degradation of SALL4. *Scientific reports*. 10, 1-15.
- Bermejo-Sánchez, E., Cuevas, L., Amar, E., Bakker, M. K., Bianca, S., Bianchi, F., Canfield, M. A., Castilla, E. E., Clementi, M., Cocchi, G., Feldkamp, M. L., Landau, D., Leoncini, E., Li, Z., Lowry, R. B., Mastroiacovo, P., Mutchinick, O. M., Rissmann, A., Ritvanen, A., Scarano, G., Siffel, C., Szabova, E. & Martínez-Frías, M.L. 2011. Amelia: a multi-center descriptive epidemiologic study in a large dataset from the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, and overview of the literature. *American journal of medical genetics*. 157C, 289–294. *
- Dungl, P. *Ortopedie*. 2., přepřac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014.
- Dy, C. J., Swarup, I., & Daluiski, A. 2014. Embryology, diagnosis, and evaluation of congenital hand anomalies. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 7, 60–65.
- Eswarakumar, V. P., Lax, I., & Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 16, 139–149.
- Eyre, D. R., & Weis, M. A. 2013. Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. *Calcified tissue international*. 93, 338–342.
- Feneck, E., & Logan, M. 2020. The Role of Retinoic Acid in Establishing the Early Limb Bud. *Biomolecules*. 10, 1-8. *
- Forlino, A., & Marini, J. C. 2016. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*. 387, 1657–1671. *
- Frantz, Ch., & O'Rahilly, R. 1961. Congenital Skeletal Limb Deficiencies. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 43, 1202-1224.
- Geduspan, J. S., & Solursh, M. 1992. Cellular contribution of the different regions of the somatopleure to the developing limb. *Developmental dynamics*. 195, 177–182.
- Goetz, R., Ohnishi, M., Ding, X., Kurosu, H., Wang, L., Akiyoshi, J., Ma, J., Gai, W., Sidis, Y., Pitteloud, N., Kuro-O, M., Razzaque, M. S., & Mohammadi, M. 2012. Klotho coreceptors inhibit signaling by paracrine fibroblast growth factor 8 subfamily ligands. *Molecular and cellular biology*. 32, 1944–1951.
- Gold, N. B., Westgate, M. N., & Holmes, L. B. 2011. Anatomic and etiologic classification of congenital limb deficiencies. *American journal of medical genetics*. 155A, 1225–1235.
- Gray, J. R., & Davies, S. J. 1996. Marfan syndrome. *Journal of medical genetics*. 33, 403.
- Green, J. B., New, H. V., & Smith, J. C. 1992. Responses of embryonic *Xenopus* cells to activin and FGF are separated by multiple dose thresholds and correspond to distinct axes of the mesoderm. *Cell*. 71, 731–735.

- Hernández-Martínez, R., & Covarrubias, L. 2011. Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. *Development, growth & differentiation*. 53, 248–253.
- Hernández-Martínez, R., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. 2009. Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development*. 136, 3675–3677.
- Horton, W. A., Rotter, J. I., Rimoin, D. L., Scott, C. I., & Hall, J. G. 1978. Standard growth curves for achondroplasia. *The Journal of pediatrics*. 93, 435–438.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M. P., Simandl, B. K., Li, Y., Beachy, P. A., & Fallon, J. F. 2001. Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Developmental biology*. 236, 421–435.
- Chong A. K. 2010. Common congenital hand conditions. *Singapore medical journal*. 51, 967.
- Chung, J. L., Kim, S. W., Kim, J. H., Kim, T. I., Lee, H. K., & Kim, E. K. 2007. A case of Weill-Marchesani syndrome with inversion of chromosome 15. *Korean journal of ophthalmology*. 21, 259.
- Iimura, T., & Pourquié, O. 2007. Hox genes in time and space during vertebrate body formation. *Development, growth & differentiation*. 49, 265–275.
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., & Handa, H. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 327, 1345–1350.
- James, W. 1965. Teratogenic properties of thalidomide. *British medical journal*. 2, 1064.
- Joeng, K. S., Lee, Y. C., Jiang, M. M., Bertin, T. K., Chen, Y., Abraham, A. M., Ding, H., Bi, X., Ambrose, C. G., & Lee, B. H. 2014. The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations. *Human molecular genetics*. 23, 4035–4040.
- Judge, D. P., & Dietz, H. C. 2005. Marfan's syndrome. *Lancet*. 366, 1965–1976. *
- Kainulainen, K., Pulkkinen, L., Savolainen, A., Kaitila, I., & Peltonen, L. 1990. Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. *The New England journal of medicine*. 323, 937–938.
- Kajii, T., Kida, M., & Takahashi, K. 1973. The effect of thalidomide intake during 113 human pregnancies. *Teratology*. 8, 163–166.
- Keupp, K., Beleggia, F., Kayserili, H., Barnes, A. M., Steiner, M., Semler, O., Fischer, B., Yigit, G., Janda, C. Y., Becker, J., Breer, S., Altunoglu, U., Grünhagen, J., Krawitz, P., Hecht, J., Schinke, T., Makareeva, E., Lausch, E., Cankaya, T., Caparrós-Martín, J. A., Lapunzina, P., Temtamy, S., Aglan, M., Zabel, B., Eysel, P., Koerber, F., Leikin, S., Garcia, K.C., Netzer, C., Schönau, E., Ruiz-Perez, V.L., Mundlos, S., Amling, M., Kornak, U., Marini, J. & Wollnik, B. 2013. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *American journal of human genetics*. 92, 565–567.
- Kim, J. H., & Scialli, A. R. 2011. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicological sciences*. 122, 1–4.
- Koop, D., Holland, N. D., Sémon, M., Alvarez, S., de Lera, A. R., Laudet, V., Holland, L. Z., & Schubert, M. 2010. Retinoic acid signaling targets Hox genes during the amphioxus gastrula stage: insights into early anterior-posterior patterning of the chordate body plan. *Developmental biology*. 338, 98–102.
- Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., & Schlessinger, J. 1997. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*. 89, 693–700.
- Kuivaniemi, H., Tromp, G., & Prockop, D. J. 1991. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB journal:official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 5, 2052–2059. *

- Laine, C. M., Joeng, K. S., Campeau, P. M., Kiviranta, R., Tarkkonen, K., Grover, M., Lu, J. T., Pekkinen, M., Wessman, M., Heino, T. J., Nieminen-Pihala, V., Aronen, M., Laine, T., Kröger, H., Cole, W. G., Lehesjoki, A. E., Nevarez, L., Krakow, D., Curry, C. J., Cohn, D. H., Gibbs, R.A., Lee, B.H., Mäkitie, O. 2013. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *The New England journal of medicine*. 368, 1810–1813.
- Lenz W. 1980. Genetics and limb deficiencies. *Clinical orthopaedics and related research*. 148, 9–17.
- Li, Y., Pawlik, B., Elcioglu, N., Aglan, M., Kayserili, H., Yigit, G., Percin, F., Goodman, F., Nürnberg, G., Cenani, A., Urquhart, J., Chung, B. D., Ismail, S., Amr, K., Aslanger, A. D., Becker, C., Netzer, C., Scambler, P., Eyaid, W., Hamamy, H., Clayton-Smith, J., Hennekam, R., Nürnberg, P., Herz, J., Temtamy, S.A. & Wollnik, B. 2010. LRP4 mutations alter Wnt/beta-catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani-Lenz syndrome. *American journal of human genetics*. 86, 697–703.
- Lim, J., Grafe, I., Alexander, S., & Lee, B. 2017. Genetic causes and mechanisms of Osteogenesis Imperfecta. *Bone*. 102, 40–43.
- Long F. 2011. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 13, 27–35.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P., & Martin, G. R. 2008. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*. 453, 401–405.
- Martin G. R. 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes & development*. 12, 1571–1586.
- Matsubara, H., Saito, D., Abe, G., Yokoyama, H., Suzuki, T., & Tamura, K. 2017. Upstream regulation for initiation of restricted Shh expression in the chick limb bud. *Developmental dynamics*. 246, 417–422.
- McCaffery, P. J., Adams, J., Maden, M., & Rosa-Molinar, E. 2003. Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *The European journal of neuroscience*. 18, 460–468.
- McKusick V. A. 2000. Ellis-van Creveld syndrome and the Amish. *Nature genetics*. 24, 203–204.
- Melnik B. C. 2017. Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity. *Acta dermato-venereologica*. 97, 174–175.
- MKN-10: mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů : desátá revize : obsahová aktualizace k 1.1.2018. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2018.
- Moloney, D. M., Slaney, S. F., Oldridge, M., Wall, S. A., Sahlin, P., Stenman, G., & Wilkie, A. O. 1996. Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nature genetics*. 13, 48–53.
- Moon, A. M., & Capecchi, M. R. 2000. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature genetics*. 26, 455–459.
- Moore, K. L. & Persaud T. V. N. *Zrození člověka: embryologie s klinickým zaměřením*. Praha: ISV, 2002.
- Morello R. 2018. Osteogenesis imperfecta and therapeutics. *Matrix biology*. 71-72, 295–296.
- Mori, T., Ito, T., Liu, S., Ando, H., Sakamoto, S., Yamaguchi, Y., Tokunaga, E., Shibata, N., Handa, H., & Hakoshima, T. 2018. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Scientific reports*. 8, 1-8.
- Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., Robin, N. H., Losken, H. W., Schinzel, A., Pulleyn, L. J., Rutland, P., Reardon, W., & Malcolm, S. 1994. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature genetics*, 8, 269–274.

- Narkis, G., Tzchori, I., Cohen, T., Holtz, A., Wier, E., & Westphal, H. 2012. Isl1 and Ldb co-regulators of transcription are essential early determinants of mouse limb development. *Developmental dynamics*. 241, 787–789.
- Newman C. G. 1985. Teratogen update: clinical aspects of thalidomide embryopathy--a continuing preoccupation. *Teratology*. 32, 133–144.
- Nishimoto, S., Wilde, S. M., Wood, S., & Logan, M. P. 2015. RA Acts in a Coherent Feed-Forward Mechanism with Tbx5 to Control Limb Bud Induction and Initiation. *Cell reports*. 12, 879–891.
- Novotná, B. & Mareš J. *Vývojová biologie pro mediky*. Praha: Karolinum, 2005.
- Oldridge, M., Zackai, E. H., McDonald-McGinn, D. M., Iseki, S., Morriss-Kay, G. M., Twigg, S. R., Johnson, D., Wall, S. A., Jiang, W., Theda, C., Jabs, E. W., & Wilkie, A. O. 1999. De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *American journal of human genetics*. 64, 446–461.
- Ong, S. H., Guy, G. R., Hadari, Y. R., Laks, S., Gotoh, N., Schlessinger, J., & Lax, I. 2000. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Molecular and cellular biology*. 20, 979–985.
- Orioli, I. M., Castilla, E. E., & Barbosa-Neto, J. G. 1986. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *Journal of medical genetics*. 23, 328–332.
- Ornitz D. M. 2005. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine & growth factor reviews*. 16, 205–210.
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. 2015. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes & development*. 29, 1463–1486. *
- Pan, A., Chang, L., Nguyen, A., & James, A. W. 2013. A review of hedgehog signaling in cranial bone development. *Frontiers in physiology*. 4, 1-4. *
- Parr, B. A., & McMahon, A. P. 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374, 350–353.
- Pauli R. M. 2019. Achondroplasia: a comprehensive clinical review. *Orphanet journal of rare diseases*. 14, 1-49.
- Pizette, S., Abate-Shen, C., & Niswander, L. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*. 128, 4463–4474.
- Plotnikov, A. N., Hubbard, S. R., Schlessinger, J., & Mohammadi, M. 2000. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*. 101, 413–422.
- Polymeropoulos, M. H., Ide, S. E., Wright, M., Goodship, J., Weissenbach, J., Pyeritz, R. E., Da Silva, E. O., Ortiz De Luna, R. I., & Francomano, C. A. 1996. The gene for the Ellis-van Creveld syndrome is located on chromosome 4p16. *Genomics*. 35, 1–5.
- Przylepa, K. A., Paznekas, W., Zhang, M., Golabi, M., Bias, W., Bamshad, M. J., Carey, J. C., Hall, B. D., Stevenson, R., Orlow, S., Cohen, M. M., Jr, & Jabs, E. W. 1996. Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nature genetics*. 13, 492–494.
- PubMed [online]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (cit. 22.4.2020)

- Radhakrishna, U., Bornholdt, D., Scott, H. S., Patel, U. C., Rossier, C., Engel, H., Bottani, A., Chandal, D., Blouin, J. L., Solanki, J. V., Grzeschik, K. H., & Antonarakis, S. E. 1999. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *American journal of human genetics*. 65, 645–653.
- Reardon, W., Winter, R. M., Rutland, P., Pulleyn, L. J., Jones, B. M., & Malcolm, S. 1994. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nature genetics*. 8, 98–103.
- Ren, D., Tu, H. C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., & Cheng, E. H. 2010. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science*. 330, 1390–1392.
- Robinson, P. N., Arteaga-Solis, E., Baldock, C., Collod-Bérout, G., Booms, P., De Paepe, A., Dietz, H. C., Guo, G., Handford, P. A., Judge, D. P., Kielty, C. M., Loeys, B., Milewicz, D. M., Ney, A., Ramirez, F., Reinhardt, D. P., Tiedemann, K., Whiteman, P., & Godfrey, M. 2006. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of medical genetics*. 43, 775–776. *
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., & Scott, M. P. 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*. 317, 372–376.
- Rosa, F. W., Wilk, A. L., & Kelsey, F. O. 1986. Teratogen update: vitamin A congeners. *Teratology*. 33, 355–364.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J. M., Maroteaux, P., Le Merrer, M., & Munnich, A. 1994. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 371, 252–254.
- Sadler, T. W. *Langmanova lékařská embryologie*. Praha: Grada, 2011.
- Sasalawad, S. S., Hugar, S. M., Poonacha, K. S., & Mallikarjuna, R. 2013. Ellis-van Creveld syndrome. *BMJ case reports*. 2013, 1-3.
- Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T., & Wasmuth, J. J. 1994. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*. 78, 335–342.
- Scherz, P. J., Harfe, B. D., McMahon, A. P., & Tabin, C. J. 2004. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science*. 305, 396–399.
- Sillence, D. O., Senn, A., & Danks, D. M. 1979. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of medical genetics*, 16, 101–115.
- Siminel, M. A., Neamțu, C. O., DiȚescu, D., ForȚofoiu, M. C., Comănescu, A. C., Novac, M. B., Neamțu, S. D., & Gluhovschi, A. 2017. Apert syndrome - clinical case. *Romanian journal of morphology and embryology*. 58, 277–280.
- Singh, S., Arya, V., Daniel, M. J., & Vasudevan, V. 2012. Ellis-van Creveld Syndrome: A Case Report. *International journal of clinical pediatric dentistry*. 5, 72.
- Slaney, S. F., Oldridge, M., Hurst, J. A., Moriss-Kay, G. M., Hall, C. M., Poole, M. D., & Wilkie, A. O. 1996. Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *American journal of human genetics*. 58, 923–932.
- Slípka, J. & Tonar Z. *Základy embryologie*. 2., upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2019.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., & McMahon, A. P. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development*. 13, 2072–2082.

- Stephens, T. D., Baker, W. C., Cotterell, J. W., Edwards, D. R., Pugmire, D. S., Roberts, S. G., Shaker, M. R., Willis, H. J., & Winger, K. P. 1993. Evaluation of the chick wing territory as an equipotential self-differentiating system. *Developmental dynamics*. 197, 157–168.
- Stratford, T., Horton, C., & Maden, M. 1996. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Current biology*. 6, 1124–1133.
- Tadmor, O. P., Kreisberg, G. A., Achiron, R., Porat, S., & Yagel, S. 1997. Limb amputation in amniotic band syndrome: serial ultrasonographic and Doppler observations. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 10, 312–315.
- Takeuchi, J. K., Koshiha-Takeuchi, K., Suzuki, T., Kamimura, M., Ogura, K., & Ogura, T. 2003. Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development*. 130, 2729–2739.
- Therapontos, C., Erskine, L., Gardner, E. R., Figg, W. D., & Vargesson, N. 2009. Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 8573–8575.
- Tickle, C., Summerbell, D., & Wolpert, L. 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*. 254, 199–202.
- Tukachinsky, H., Lopez, L. V., & Salic, A. 2010. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *The Journal of cell biology*. 191, 415–418.
- Tzchori, I., Day, T. F., Carolan, P. J., Zhao, Y., Wassif, C. A., Li, L., Lewandoski, M., Gorivodsky, M., Love, P. E., Porter, F. D., Westphal, H., & Yang, Y. 2009. LIM homeobox transcription factors integrate signaling events that control three-dimensional limb patterning and growth. *Development*. 136, 1375–1380.
- Umair, M., Ahmad, F., Bilal, M., Ahmad, W., & Alfadhel, M. 2018. Clinical Genetics of Polydactyly: An Updated Review. *Frontiers in genetics*. 9, 1-7. *
- Vargesson N. 2015. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth defects research. Part C, Embryo today:reviews*. 105, 140–156. *
- Vargesson, N. 2009. Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. *Bioessays*. 31, 1327–1336. *
- Verheyden, J. M., & Sun, X. 2008. An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature*. 454, 638–641.
- Villacorte, M., Suzuki, K., Hayashi, K., de Sousa Lopes, S. C., Haraguchi, R., Taketo, M. M., Nakagata, N., & Yamada, G. 2010. Antagonistic crosstalk of Wnt/beta-catenin/Bmp signaling within the Apical Ectodermal Ridge (AER) regulates interdigit formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 391, 1654–1656.
- Xu, B., & Wellik, D. M. 2011. Axial Hox9 activity establishes the posterior field in the developing forelimb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 4888–4890.
- Yang, Y., & Niswander, L. 1995. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell*. 80, 939–946.
- Young, J. J., & Tabin, C. J. 2017. Saunders's framework for understanding limb development as a platform for investigating limb evolution. *Developmental biology*. 429, 401–404. *
- Zhang, H., Kamiya, N., Tsuji, T., Takeda, H., Scott, G., Rajderkar, S., Ray, M. K., Mochida, Y., Allen, B., Lefebvre, V., Hung, I. H., Ornitz, D. M., Kunieda, T., & Mishina, Y. 2016. Elevated Fibroblast Growth

Factor Signaling Is Critical for the Pathogenesis of the Dwarfism in *Evc2/Limbin* Mutant Mice. *PLoS genetics*. 12, 1-19.

Zhang, H., Takeda, H., Tsuji, T., Kamiya, N., Rajderkar, S., Louie, K., Collier, C., Scott, G., Ray, M., Mochida, Y., Kaartinen, V., Kunieda, T., & Mishina, Y. 2015. Generation of *Evc2/Limbin* global and conditional KO mice and its roles during mineralized tissue formation. *Genesis*. 53, 612–619.

Zhao, X., Sirbu, I. O., Mic, F. A., Molotkova, N., Molotkov, A., Kumar, S., & Duester, G. 2009. Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Current biology*. 19, 1050–1056.

* sekundární citace