

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Proteomická analýza choroby pojivové tkáně

Hronková Lucia

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucia Hronková**
Osobní číslo: **C14701**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Proteomická analýza choroby pojivové tkáně**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část bude obsahovat:

- 1) Popis užitečných analytických proteomických metod
- 2) Popis choroby pes equinivorus
- 3) 2D elektroforéza

Experimentální část bude obsahovat dílčí kroky:

- 1) Zpracování vzorků pomocí chromatografických metod
- 2) Analýza reálných vzorků pomocí 2D elektroforézy
- 3) Analýza vzorků pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.**

Fyziologický ústav AV Praha

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Adam Eckhardt, Ph.D.**

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

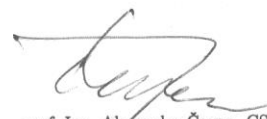
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorsky zákon, zejména se skutečnosti, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 9. 2016

Bc. Lucia Hronková

Poděkování:

Velice děkuji vedoucímu své diplomové práce *prof. Ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc.* za vřelé přijetí, rady a vždy otevřené dveře. Děkuji svému konzultantovi *Mgr. Adamu Eckhardtovi, Ph.D.*, že jsem mohla participovat na tak zajímavém tématu. Děkuji *RNDr. Michalu Jágrovi, Ph.D.* za pravidelné konzultace, obětavost a snahu mi vždy pomoci. Děkuji celému kolektivu oddělení 22 FÚ AV ČR za přátelskou atmosféru a neuvěřitelnou ochotu. Děkuji dámě, díky jejíž vstřícnosti jsem se mohla na AV podívat - *prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D.* Děkuji svým rodičům za podporu a umožnění studia. Děkuji své milované babičce Imeldě.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá proteomickou analýzou choroby pojivové tkáně zvané clubfoot.

Analýza byla provedena na šesti vzorcích patřících osobám mužského pohlaví, které k nám byly doručeny z Nemocnice Na Bulovce v Praze. Analýza byla provedena 1D elektroforézou, 2D elektroforézou a následně hmotnostní spektrometrií.

Zjišťovaly se rozdíly mezi vnitřní (M) a vnější (L) částí chodidla. V M části chodidla se nachází více kolagenu III. a VI., v L části chodidla se nachází více kolagenu XII. a XIV., zato méně kolagenu VI.

KLÍČOVÁ SLOVA

1D elektroforéza, 2D elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, clubfoot

TITLE

Proteomic analysis of connective tissue disease

ANNOTATION

This thesis is about proteomic analysis of connective tissue disease called clubfoot. We analyzed seven samples belonging to persons of the male gender that were delivered to us from hospital Na Bulovce in Prague. Analysis was performed by 1D electrophoresis, 2D electrophoresis and mass spectrometry.

We were searching for the differences between the medial (M) and lateral (L) part of the foot. In the M part of the foot we found more collagen III. and VI., in the L part of the foot we found more collagen XII. and XIV., but less collagen VI.

KEYWORDS

1D electrophoresis, 2D electrophoresis, mass spectrometry, clubfoot

OBSAH

Úvod.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1 Historie onemocnění pes equinovarus.....	13
1.2 Charakteristika onemocnění.....	16
1.2.1 Etiologie.....	19
1.2.2 Diagnostika.....	22
1.3 Metody léčby.....	25
1.3.1 Konzervativní léčba.....	26
1.3.2 Operativní léčba.....	28
1.4 Elektroforéza a hmotnostní spektrometrie.....	30
1.4.1 1D elektroforéza.....	30
1.4.2 2D elektroforéza.....	31
1.5. Hmotnostní spektrometrie.....	32
1.5.1 Ionizační techniky.....	32
1.5.2 Analyzátory.....	37
2 CÍLE PRÁCE.....	39
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
3.1 Příprava vzorku a vývoj extrakční metody.....	41
3.1.1 Chemikálie a reagensy.....	41
3.1.2 Postup.....	41
3.2 1D elektroforéza.....	44
3.2.1 Chemikálie a reagensy.....	44
3.2.2 Postup.....	44
3.3 2D elektroforéza.....	46
3.3.1 Chemikálie a reagensy.....	46
3.3.2 Postup.....	47
3.4 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.....	51
3.4.1 Chemikálie a reagensy.....	51
3.4.2 Příprava vzorku na hmotnostní spektrometrii z čisté tkáně.....	51
3.4.3 LC/MS metoda.....	52
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
4.1 Příprava vzorku a vývoj extrakční metody.....	55
4.2 Elektroforetická analýza.....	56

4.3 Analýza pomocí spojení LC/MS.....	62
5 ZÁVĚR.....	70
6 PŘÍLOHY.....	71
7 LITERÁRNÍ ZDROJE.....	72

SEZNAM ZKRATEK

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
APS	Persíran amonný
BSA	Hovězí sérový albumin
CI	Chemická ionizace
DTT	Dithiotreitol
EI	Elektronová ionizace
ESI	Elektrosprejová ionizace
EtOH	Ethanol
CHAPS	(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonát)
LB	Lysis buffer
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MeOH	Metanol
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	Phosphate buffered saline
SDS	Dodecylsíran sodný
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TOF	Průletový analyzátor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

SLOVNÍK UŽITÝCH TERMÍNŮ

Addukce	Pohyb nohy směrem k ose těla
Amniocentéza	Odběr plodové vody
Atrofie	Zmenšení normálně vyvinutého orgánu
Artrogrypóza	Vrozená kloubní ztuhlost
Bilaterální clubfoot	Clubfoot postihující obě nohy
Cavus	Patní kost
Cuboid	Krychlová kost
Dislokace	Posunutí např. úlomků kostí
Dysplazie	Porucha vývoje
Extensus halloclus longus	Dlouhý natahovač palce
Fibula	Lýtková kost
Hyperextenze	Abnormálně zvýšený rozsah pohybu ve směru natažení
Hypoplazie	Neúplné vyvinutí orgánu
Ipsiterální	Na stejné straně těla
Kalus	Mozol
Myopatie	Progresivní svalová dystrofie
Myotonická dystrofie	Progresivní poruchy kosterních svalů
Olygohydramniová sekvence	Sekvence způsobená dlouhotrvajícím oligohydramnionem, většinou z renálních příčin
Plantární flexe	Omezený pohyb v hlezenním kloubu (30-50°)
Plantigrádní	Noha došlápne na zem celou ploskou
Pronace	Došlap, při kterém se chodidlo vychyluje dovnitř
Restrikce	Omezení
Sagitální rovina	Rovina souběžná s rovinou mediální
Sinus tarsi	Tarzální dutina
Supinace	Otočení plosky nohy směrem dovnitř
Subluxace	Neúplné vykloubení
Talus	Hlezenní kost
Tarzální kosti	Sedm kostí, které tvoří kloub patní kosti
Unilaterální	Jednostranný
Varus	Zalomení končetiny směrem dovnitř

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka č. 1: Výběr vhodných tkání pro experiment.....	40
Tabulka č. 2: Dávkování vzorku a lysis bufferu u všech vzorků.....	58
Tabulka č. 3: Výběr 20 nejvýznamnějších proteinů obsažených v L části chodidla.....	63
Tabulka č. 4: Výběr 20 nejvýznamnějších proteinů obsažených v M části chodidla.....	64
Tabulka č. 5: Proteiny signifikantní pro M stranu	65
Tabulka č. 6: Proteiny signifikantní pro L stranu	65
Obrázek č. 1: Léčba pes equinovarus.....	14
Obrázek č. 2: Porovnání zdravého chodidla a chodidla s clubfootem.....	16
Obrázek č. 3: Anatomie deformity způsobené clubfootem.....	17
Obrázek č. 4: Ultrazvuk plodu s clubfootem.....	22
Obrázek č. 5: Ponsetiho metoda.....	27
Obrázek č. 6: 1D a 2D elektroforéza.....	31
Obrázek č. 7: Schéma hmotnostního spektrometru.....	32
Obrázek č. 8: Schéma elektrosprejové ionizace.....	33
Obrázek č. 9: Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku.....	34
Obrázek č. 10: Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku.....	35
Obrázek č. 11: Schéma ionizace laserem za účasti matrice	35
Obrázek č. 12: Schéma elektronové ionizace	36
Obrázek č. 13: Schéma chemické ionizace.....	37
Obrázek č. 14: Schéma postupu přípravy vzorky a vývoje extrakční metody.....	38
Obrázek č. 15: 1D elektroforéza vzorků získaných od dítěte D.....	46
Obrázek č. 16: Provozní podmínky IPGphoru.....	48
Obrázek č. 17: Mini-Protean [®] Tetra cell systém, Protean IEF Cell.....	48
Obrázek č. 18: 2D elektroforéza u dítěte D.....	51
Obrázek č. 19: Rozdíl v přítomnosti kolagenů různých typů v části chodidla M a L.....	55
Obrázek č. 20: 1D elektroforetický gel dítěte H.....	57
Obrázek č. 21: Vzorky 1-5 dítěte D.....	59
Obrázek č. 22: Program protein Scape, Sekvence Fibromodulinu.....	60

Úvod

Onemocnění *pes equinovarus* neboli *clubfoot* je vrozená deformita jedné či obou dolních končetin. Svůj název *clubfoot* získala tato choroba vzhledem k vizuální spojitosti s onemocněním koní, proto je také známá i pod názvem „koňská noha“. Jedná se o poměrně častou vrozenou vadu, která postihuje jedno ze 700 narozených dětí. Přibližně polovina dětí trpících touto nemocí má postižené obě dolní končetiny, což se označuje jako *bilaterální clubfoot*. U většiny případů je postižena pouze jedna končetina. Co se týče četnosti výskytu onemocnění u pohlaví, u mužů se tato nemoc vyskytuje dvakrát častěji než u žen.

Klinický obraz končetiny nám odhaluje, že postižená končetina je v plantární flexi, přičemž Achillova šlacha je zkrácena. Pokud pacient není léčen, chodí často po kotnících či po hranách chodidel. Pokud je však podroben léčbě, často se plně uzdraví již během raného dětství a je schopen chodit stejně jako zdravý jedinec a i rekreačně sportovat.

Existuje mnoho hypotéz zabývajících se tím, jak *clubfoot* vzniká, přičemž významný vliv má mít genetika, prostředí či kombinace obojího. Ačkoliv dosud nebyla objasněna příčina vzniku choroby, většina studií souhlasí s vlivem více než jedné. Abnormality v pojivové tkáni jsou spojeny s přítomností zvýšené koncentrace vaziva ve svalech, vazech a šlachových pouzdrech. Další náznaky nám říkají, že mutace v genech, které se podílejí na vývoji svalů, zejména těch, které kódují svalový kontrakční komplex, jsou rizikovými faktory pro vznik *clubfootu*.

Clubfoot je obvykle diagnostikován ihned po narození vizuálním zhodnocením chodidla, přičemž diagnóza je potvrzena rentgenovým snímkem. V některých případech je možné zjistit onemocnění ještě před narozením pomocí ultrazvuku. Možnost onemocnění *clubfootem* bývá výraznější, pokud jsou závažně postiženy obě nohy.

Existuje pouze omezené množství léčebných postupů, přičemž by se s léčbou mělo začít nejlépe bezprostředně po stanovení diagnózy. Mezi léčebné postupy patří Francouzská metoda, Ponsetiho metoda a operace.

Cílem této diplomové práce je provést analýzu změn pojivové tkáně u vrozené choroby *pes equinovarus* neboli *clubfoot*, a to prostřednictvím užití 2D elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie onemocnění pes equinovarus

Idiopatická koňská noha, zvaná *clubfoot*, se vyznačuje komplexní trojrozměrnou deformitou nohy a je jedním z nejčastějších problémů v dětské ortopedii. Incidence této vrozené vady je 1 na 700 narozených dětí (Dobbs *et al.*, 2000)

Termín ortopedie poprvé použil roku 1741 lékař Nicholas André z pařížské univerzity, jemuž se dodnes říká „otec ortopedie“. Slovo ortopedie pochází z řeckých slov *orthos* (přímý) a *paidion* (dítě). Profesor medicíny André publikoval knihu nazvanou *L'Orthopédie* v níž stanovil zásady prevence a nápravy deformit a podrobně popsal konzervativní léčbu *clubfootu*. (Ellis, 2000)

Clubfoot byl poprvé vyobrazen již na dávných egyptských kresbách nalezených na stěnách hrobek. První písemná zmínka o *clubfootu* pochází z roku 400 př.n.l. od Hippokrata, který věřil, že příčinou vzniku onemocnění může být mechanický tlak. (Dobbs *et al.*, 2000)

Tak vznikla mechanistická teorie, která spočívala v přesvědčení, že během těhotenství dochází k restrikci chodidla děložou. Ta způsobuje omezení pohybu chodidla plodu, čímž je způsoben *clubfoot*. Zastánci této teorie věřili, že *clubfoot* vzniká kvůli oligohydramniové sekvenci (syndromu Potterové). Věřili, že příčinou vzniku nemoci je snížené množství plodové vody. Nicméně oligohydramniová sekvence je obvykle spojena s dalšími vývojovými anomáliemi a sama o sobě může mít neurologickou příčinu. Při raném odběru plodové vody (amniocentéze) byla unikající plodová voda potvrzena jen v některých případech, což napovídá, že mechanismus stojící za vznikem *clubfootu* může mít jinou etiologii. Zásadním argumentem proti mechanistické hypotéze je skutečnost, že *clubfoot* může být detekován od druhého trimestru, tedy dlouho před tím, než je děložní tlak na embryo vyvíjen. (Miedzybrodzka, 2003)

Hippokrates jako první popsal metody užívané pro korekci chodidla, jež jsou velmi podobné současným konzervativním metodám. Vysvětlil dvě důležité zásady při léčbě *clubfootu*, které byly převzaty dalšími generacemi. Prokázal, že drtivou většinu případů lze úspěšně léčit pomocí mnohonásobné manipulace, a že léčba by měla být zahájena co nejdříve, aby se deformace kostí nestihla etablovat. Pochopil také, že je nemožné zavést nohu do normální polohy bez léčby. Chodidlo musí být napraveno a poté se musí nechat zafixované v přirozené poloze, aby se zabránilo recidivě. (Dobbs *et al.*, 2000)

Hippokrates začínal s léčbou *clubfootu* co nejdříve to bylo možné, nejlépe ihned po porodu. Jeho technika spočívala v opakované manipulaci s postiženou nohou, přičemž po manipulaci následovala aplikace silných obvazů pro udržení korekce. Ačkoliv se nezachoval žádný konkrétní písemný popis skutečně prováděných manipulací, existuje zmínka o významu mírnosti v korekci deformity, jinak by mohlo dojít k hyperkorekci. Po dosažení optimální polohy chodidla se nosila speciální obuv, aby byla korekce zachována, a zabránilo se tak opakované deformaci. (Dobbs *et al.*, 2000)

Od poloviny 18. století až do chvíle, kdy Antonio Scarpa roku 1803 vydal *Memoir on Congenital Clubfoot of Children* se na tuto nemoc neupíralo tolik pozornosti. Scarpova monografie nám poskytuje popis jeho pojetí deformity. Považoval hlezenní kost za normální v poloze i v tvaru. Myslel si, že deformace nastává kvůli dislokaci přední části nohy směrem dovnitř k hlavě hlezenní kosti. Jeho léčba zahrnovala silnou manipulaci, po které následovala aplikace komplikovaného mechanického zařízení, později známého jako Scarpova bota. Jeho metoda ošetření nikdy nebyla úspěšně použita nikým jiným, a proto nebyla přijata širší veřejností. (Dobbs *et al.*, 2000)



Obrázek č. 1: Léčba pes equinovarus (Desai *et al.*, 2010)

V roce 1818 popsal Scarpa jako první patologickou anatomii nemoci a určil kostní deformitu hlezna jakožto primární příčinu vzniku nemoci, zatímco posun dalších tarzálních kostí okolo hlezna označil za příčinu sekundární. (Windisch *et al.*, 2007)

V roce 1806 publikoval jistý Timothy Sheldrake, který byl mimořádně dobrým výrobcem dlah, esej nazvanou **Distortion of children's legs and feet**. Jeho praktické zkušenosti s léčbou kosterních deformit mu získaly respekt mnoha vlivných lékařů a zástupců pacientů. Sheldrake léčil i samotného George Gordona Byrona, jednoho z nejvýznamnějších básníků anglického romantismu. Právě pro něj vyrobil na základě doporučení nejprve ortézu a posléze chirurgické boty. V roce 1798 vydal **A Practical**

Essay on the Clubfoot a později se stal častým přispěvatelem do časopisu Lancet.

(Youngquist, 2003)

Sheldrake používal obvazy stejně jako Hippokrates. Tvrdil, že většina jeho pacientů může být uzdravena během dvou až tří měsíců. Věřil, že polovina postižení je způsobena deformitou vazů a druhá deformitou svalů. Byl zastáncem tvrzení, že pokud se u dětí začne s léčbou ve dvou měsících věku, bude vše v pořádku již ve chvíli, kdy začnou chodit. Čím je dítě starší a čím později se s léčbou začne, tím déle trvá, než se vyléčí (Dobbs *et al.*, 2000).

Jeden z nejvýznamnějších německých chirurgů 19. století, Richard Von Volkman, byl autorem alternativní teorie zastavení vývoje plodu. Teorie, jež vznikla v roce 1863, zastává názor, že časně zastavení vývoje plodu v zárodečném životě je příčinou vzniku *clubfootu*. Podle této teorie je noha equinovarózní a koriguje pronaci nohy při narození. Vývoj plodu nohy je zastaven z důvodu vlastní chyby nebo prostředí, což brzdí opravu polohy chodidla do normální polohy pronace a má za následek vznik *clubfootu*. (Anand *et Sala*, 2008)

Jak je z historie patrné, koňská noha je již dlouhou dobu nevyřešenou ortopedickou výzvou. Problém *clubfootu* je vážnější v rozvojových zemích, kde často dochází k pozdnímu přikročení k léčbě či v některých případech dokonce i k odmítnutí léčby. Svou vinu v tomto případě nese pověrčivost lidí, která je pevně svázána s tímto onemocněním.

Ačkoliv se v odborné literatuře setkáme s množstvím informací o různých způsobech léčby, od bandáží prováděných Hippokratem až po chirurgickou léčbu prováděnou Kitem, stále neexistuje jediná definitivní metoda léčby a nebude existovat až do chvíle, než se dosáhne konečného cíle - funkčního, bezbolestného a plantigrádního chodidla bez kalusů. (Pulak *et Swammy*, 2012)

1.2 Charakteristika onemocnění

Idiopatická koňská noha je nejčastější vrozenou vadou pohybového aparátu, která postihuje v průměru jednoho ze sedmi set padesáti novorozenců. Většina ortopedů souhlasí s tím, že první možnost léčby má být nechirurgická a má začít ihned po narození. V posledních letech výzkumy prokázaly úspěšnost korekce chodidla Ponsetiho metodou u více než devadesáti pěti procent nemocných postižených *clubfootem*. (Terrazas – Lafargue *et Morcuende*, 2007)

Clubfoot je deformitou nohy, která je charakterizována equinózní polohou zadní části chodidla, aduktem, varem střední části chodidla a vyklenutou nohou. Cílem léčby je co nejdříve a ideálně úplně opravit deformitu a udržovat korekci s růstem dokud skelet nedozraje. To by mělo mít za následek pružnou, nebolestivou nohu. (Foster *et Davis*, 2007)

Idiopatická koňská noha je charakterizována chodidlem ve tvaru fazole, která se vyznačuje mediálním plantárním rozštěpem, hlubokým zadním rozštěpem a vyšší úrovní atrofie svalů a lýtek. Třemi hlavními komponentami deformity jsou: equinus, varus a adductus, jež jsou zřejmé již při vyšetření. Postoj kolene je obvykle ohnutý, ale v případě koňské nohy je poloha kolene hyperextenzní. Ostatní části těla by měly být též prozkoumány za účelem vyloučení jiné anomálie. Přítomnost dalších anomálií znamená non-idiopatický typ koňské nohy, který má špatnou prognózu. (Anand *et Sala*, 2008)

Onemocnění pes equinovarus, jinak zvaný *clubfoot*, je vrozenou deformitou dolní končetiny, jež je identifikovaná fixací nohy v plantární flexi, adukcí, varem a supinací. (Ošťádal *et al.*, 2015)

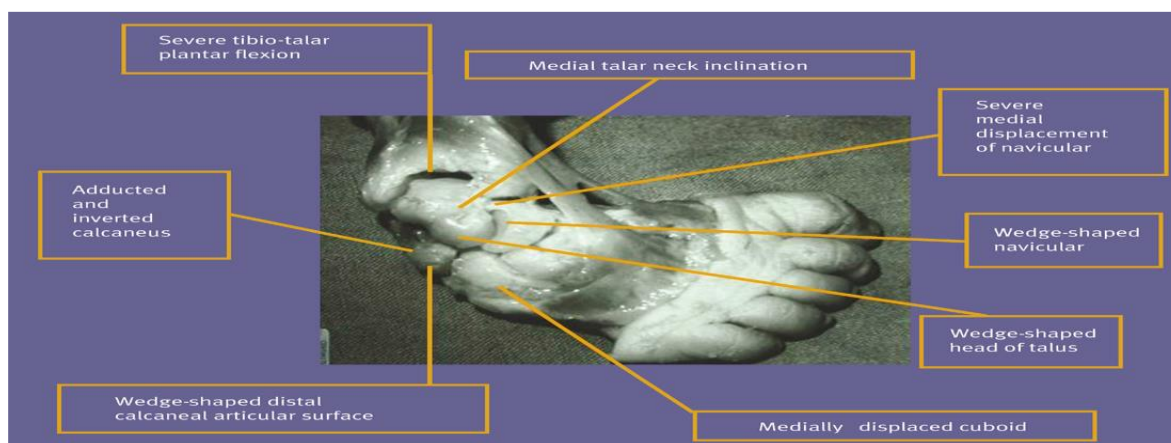


Obrázek č. 2: Porovnání zdravého chodidla a chodidla s *clubfootem*, (Keck medicine, 2015)

Clubfoot se vyskytuje přibližně u jednoho z tisíce narozených dětí ve Spojeném království, přičemž mezi obyvateli Polynésie se vyskytuje až šestkrát častěji. Poměr mužů vůči ženám je tři ku jedné a až padesát procent případů je bilaterální *clubfoot*. Shoda u monozygotních dvojčat je třicet tři procent a pokud jeden sourozenec trpí *clubfootem*, tak možnost, že onemocní druhý sourozenec, stoupá až o třicet procent. (Cooke *et al*, 2008)

Ač je *clubfoot* rozpoznatelný již při narození, závažnost deformity se může lišit od mírné až po extrémní formu. Pokud není nemoc patřičně léčena, děti trpící tímto onemocněním chodí po hranách chodidel, což má za následek tvorbu kalusu, potenciálních kožních a kostních infekcí a značné omezení mobility v pozdějším věku. Nejzávažnější deformity se vyskytují v zadní části nohy. Jak hlezenní kost (talus), tak i patní kost je deformována a je zatočena a člunkovitá kost je mediálně posunuta a může být v kontaktu s vnitřním kotníkem. Nejvýraznější abnormalitou končetiny zasažené *clubfootem* je atrofie nohy a lýtka. (Macnicol *et* Murray, 2008)

Hypoplazie svalů dolních končetin je při narození běžným nálezem, který zůstává i po odpovídající terapii. *Clubfoot* má povětšinou tendenci prezentovat se na pravé straně. Etiologie *clubfootu* nebyla dosud plně objasněna, i když je zřejmé, že existuje celá řada ekologických a genetických přispěvatelů k etiopatogenezi *clubfootu*. Odhaduje se, že 20 až 25% pacientů trpících koňskou nohou je spojeno se syndromovou etiologií, jako je distální artrogrypóza (DA), vrozená myopatie, myotonická dystrofie, a dokonce i několik chromozomálních syndromů. (Bacino *et* Hecht, 2014)



Obrázek č. 3: Anatomie deformity způsobené *clubfootem* (Foster *et* Davies, 2007)

Jak již bylo řečeno, nejvýraznější abnormalitou končetiny zasažené *clubfootem* je atrofie nohy a lýtka. Rozdíl v obvodu lýtka charakterizuje jednostranný (unilaterální) *clubfoot* a bylo prokázáno, že se délka končetiny liší. Neurologická nerovnováha způsobuje primární subluxaci nebo dislokaci talonavikulárního kloubu (spojení) s mediální odchylkou krčku a hlavice talu. Chodidlo je otočeno na patě a přední noha je supinována, což je spojeno s equinózním stavem. Často není zřejmé, že pilíř kostí, který tvoří mediální hranici přední části nohy je otočen, což má za následek deformitu cavu, který je často nedostatečně

řešen operací. U starších dětí jsou v případě jednostranného *clubfootu* patrné rozdíly v délce prstů u nohou. Je to také často spojené se špatným postavením palce, což nastává kvůli hyperaktivitě dlouhého natahovače palce, *extensus hallucis longus*. Další rýhy jsou za patami, což představuje equinózní vytažení polohy patní kosti a hluboké mediální rýhy vzhledem k vytlačení přední části nohy na zadní část nohy. (Macnicol *et* Murray, 2008)

Někteří autoři se domnívají, že až patnáct procent případů *clubfootu* je spojeno s dysplazií, jiné studie uvádějí incidenci pod jedno procento. Dle nejnovějších výzkumů by koňskou nohu mohla primárně vyvolat vnitřní odchylka krčku hlezenní kosti, ale stejně tak i fibróza ligamentu deltoideu ve střední části kotníku. Koňskou nohu je možné rozeznat podle různých poloh chodidla. (Correll *et* Berger, 2004)

Clubfoot je běžná deformace projevující se po porodu a zahrnující komponenty equinózní, varózní, adukční, rotační a kavózní deformity chodidla. V případě *clubfootu* je značná obtíž v rozpoznání equinózní a varózní deformity zadní části chodidla. Hlezenní kost je fixována v plantární pozici v zářezu kotníku. Krček hlezenní kosti směřuje mediálně a hlavice hlezenní kosti je jakoby zaklíněná. Člunkovitá kost je mediálně vytlačena k hlavě hlezenní kosti a může se zřetelně dotýkat středního kotníku. Patní kost je aduktovaná a obrácená, takže přední část leží pod hlavou hlezenní kosti a není k ní pozičně laterální, jako je to u normálního chodidla. Krychlová kost může být mediálně posunuta a být v obrácené pozici oproti patní kosti. Vzhledem k tomu, že chodidla mohou směřovat jedno k druhému, mohou se jevit jako supinovaná. (Hulme, 2005)

1.2.1 Etiologie

Největší výskyt nemoci je v Jižním Pacifiku, což studie o etnických skupinách zdůvodňuje tím, že jedním z možných faktorů může být i genetická složka. Jedná se o jednu z tamních nejčastějších vrozených vad postihujících pohybový aparát. (Foster *et Davis*, 2007)

Dosud nebyla žádná studie schopna vysvětlit příčinu vzniku této nemoci. Na čem se však vědci shodnou je fakt, že se jedná o kombinaci více faktorů.

Ač bylo předloženo mnoho teorií vzniku onemocnění, skutečná etiologie nemoci zůstává neznámá. Nordin rozlišuje šest možností vzniku *clubfootu*:

- **Mechanistická teorie**

Jedna z nejstarších teorií, která byla předložena Hippokratem. Ten věřil, že onemocnění vzniká v důsledku držení chodidla v equinovárovní pozici tlakem dělohy. Až o mnoho let později se přišlo na to, že snížení množství plodové vody (oligohydramnion) brání pohybu plodu a činí tak plod zranitelným vůči vnějšímu tlaku. (Nordin *et al.*, 2002)

Na příčinnou souvislost vztahu mezi *clubfootem* a těhotenstvím ve své studii upozornil Farell (Farell *et al.*, 1999), který popsal možnou korelaci mezi výskytem *clubfootu* a časným odběrem plodové vody. Měl dvě skupiny žen – (2172), kterým byla provedena časná amniocentéza, přičemž v této skupině bylo 29 dětí postiženo *clubfootem* (17 chlapců a 12 dívek) a druhou skupinu žen (2162), kterým byla odebrána plodová voda ve druhém trimestru, přičemž v této skupině měly pouze dvě děti *clubfoot*. Byla zjištěna mírně vyšší frekvence výskytu *clubfootu*, pokud byla amniocentéza provedena v prvním trimestru těhotenství. (Farell *et al.*, 1999)

- **Neuromuskulární vada**

Někteří vědci se stále drží názoru, že equinovárovní chodidlo je výsledkem nervosvalové vady. Na druhou stranu nebyly zjištěny žádné abnormality v histologické ani v elektromyografické studii svalů postižených *clubfootem*. (Nordin *et al.*, 2002)

Některá nervosvalová onemocnění dokonce mohou i imitovat *clubfoot* tím, že způsobí deformitu *cavu*. (Lovell *et Morcuende* 2007)

- **Defekt zárodečné plazmy**

V případě *clubfootu* je krček hlezna vždy krátký, přičemž jeho přední část se otáčí mediálně a plantárně. Tito dva vědci byli zastánci názoru, že deformita je pravděpodobně důsledkem defektu primární zárodečné plazmy.

- **Zastavení vývoje plodu**

V roce 1863 Von Volkman přišel s teorií, že zastavení vývoje plodu v zárodečném životě je příčinou vrozeného *clubfootu*. K této teorii se přiklonili i další vědci. (Nordin *et al.*, 2002)

Během pozdního vývoje lidské končetiny je dokončena chondrifikace chodidla i kavitace kloubů a vazů a distální končetina se otáčí mediálně. Tento proces rotace umožňuje plosce nohy, aby směřovala kolmo k zemi místo toho, aby byla natočena směrem k tělu, jako je tomu u nohy v pozdním embryonálním období. Pronace pokračuje i po narození až do postnatálního vývoje. Von Volkman vytvořil voskový model kostry chodidla plodu v různém gestačním věku. Jeho pozorování ho přivedlo k závěru, že závažný *clubfoot* připomínající embryonální chodidlo na začátku druhého měsíce je deformitou, která je doprovázena nedovyvinutím kostí a svalů. Volkmanova zjištění byla později replikována dalšími studii. Tyto studie podporují názor, že *clubfoot* může vzniknout v důsledku zastavení přirozené mediální rotace chodidla v pozdním vývoji embrya. Ve skutečnosti může *clubfoot* vznikat v důsledku aberantní genetické kontroly tohoto průběhu otáčení nebo jeho přerušení. (Anand *et Sala*, 2008)

Kromě zastavení vývoje plodu se na vzniku *clubfootu* podílí i škodlivý vliv teratogenních látek, jako důsledek onemocnění zarděnkami či působení thalidoimidu na plod v těhotenství. Mnoho autorů věří, že existují různé faktory prostředí zodpovědné za vznik *clubfootu*, protože existují různé látky, které jsou schopny způsobovat dočasné zastavení růstu. (Nordin *et al.*, 2002)

Existují tři hlavní fáze vývoje nohy v děloze. V počáteční fázi (mezi 5. a 6. týdnem) se začíná chodidlo vyvíjet souběžně s nohou. Embryonální fáze (mezi 6. a 7. týdnem) se vyznačuje růstem lýtkové kosti (fibuly). Laterální část se prodlužuje vzhledem k mediální a chodidlo nabývá *clubfootového* postoje. Během závěrečné fetální fáze (8 až 9 týdnů) se holenní část nohy a chodidlo vyvíjí do správné polohy jako je to u zdravého novorozence. Bylo dokázáno, že vliv cizorodých agens v průběhu fetální fáze vede ke *clubfoot* deformitě. Čas počátku působení a trvání expozice tomuto agens ovlivňuje celkovou závažnost. Bylo zaznamenáno několik původců, jako jsou chemické teratogeny, virové

infekce, radiační a hormonální nerovnováha, ale definitivní příčina dosud nebyla identifikována. (Cooke *et al.*, 2008)

- **Dědičnost**

Ve většině případů má *clubfoot* tendenci být dědičný. Tato polygenní dědičnost je náchylná na vliv faktorů prostředí. (Nordin *et al.*, 2002)

Další dvě možnosti vzniku *clubfootu* jsou dle Miedzybrodzké vaskulární a tkáňová hypotéza:

- **Vaskulární hypotéza**

Vědci také studovali cévní zásobení chodidla poznamenaného *clubfootem* u dvanácti plodů. Jsou zdokumentovány cévní abnormality u všech takto zdeformovaných chodidel. Na úrovni *sinus tarsi* (tarzální dutina) bylo patrné zablokování větvení vaskulárního stromu chodidla. Toto zjištění bylo nejvýraznější v raném období života plodu. Jedinci s *clubfootem* mají svalové opotřebení ipsilaterálního lýtka, které může mít souvislost se sníženým prokrvením v přední holenní tepně. Je možné, že spojení *clubfootu* a rané amniocentézy či kouření, může být zprostředkováno, alespoň částečně, cévní nedostatečností. (Miedzybrodzka, 2003)

Některé anatomické studie ukázaly abnormální svaly nebo šlachy, ale tento nález se nevyskytuje ve všech případech. Běžnější nález je chybějící nebo malá anteriorní holenní tepna a *dorsalis pedis*. Tato abnormalita je nalezena v souvislosti s fibulární hemimelií a může představovat zastavení růstu během pozdní fáze embryonálního růstu. Je možné, že tato cévní nedostatečnost je primární příčinou vzniku *clubfootu*. Studie anatomie plodu dokazují, že tyto cévní abnormality jsou výraznější na začátku vývoje plodu, v období vývoje chodidla. (Cooke *et al.*, 2008)

- **Tkáňová hypotéza**

Existuje velký počet studií zaměřujících se na makroskopický, mikroskopický a ultrastrukturální vzhled měkkých tkání spojených s *clubfootem*. Svaly, šlachy, vazy, nervy a krevní cévy – to vše ukazuje abnormality ve srovnání s normální tkání. (Cooke *et al.*, 2008)

Hypotéza pojivové tkáně naznačuje, že za *clubfoot* je primárně odpovědná abnormalita pojivové tkáně. Pomocí studie byla zdokumentována přítomnost zvýšeného množství

vazivové tkáně ve svalech, vazivových tkáních, vazech a šlachách. Díky této studii, která zahrnovala pět dětí s *clubfootem* a tři děti bez *clubfootu*, došli autoři k závěru, že retraktilní fibróza může být hlavním etiologickým faktorem. (Miedzybrodzka, 2003)

1.2.2 Diagnostika

Pro posouzení závažnosti onemocnění kojenců trpících *clubfootem* je vhodné využít těchto čtyř kategorií: (Cooke *et al.*, 2008)

a) Předporodní diagnostika

Ačkoliv je *clubfoot* zpravidla diagnostikován až postnatálně, díky prenatalní ultrazvukové diagnostice může být léčba zahájena bezprostředně po narození. Pozitivní prediktivní hodnota prenatalního ultrazvuku je více než osmdesát procent. Díky ní lze odhadnout i stupeň závažnosti *clubfootu*, ačkoliv je hodnota méně přesná. Studie dokázaly, že u mnoha pacientů se onemocnění nevyskytuje izolovaně, ale v součinnosti s jinou chorobou. (Cooke *et al.*, 2008)



Obrázek č. 4: Ultrazvuk plodu s p. equinovarus (Clubfoot chronicles, 2014)

Při podezření na *clubfoot* je nutno zohlednit i rodinou historii a zda se u někoho nevyskytuje artrogrypóza či snížené množství plodové vody u těhotných žen. Diagnóza se provádí již od dvacátého týdne plodu ultrazvukem. Je však nutno vzít v potaz to, že ultrazvuk může poskytovat falešně pozitivní výsledky, a to až ve třiceti procentech. Nevýhodou je to, že prenatalní diagnostika pomocí ultrazvuku není prognostická z hlediska závažnosti a neurčuje budoucí léčbu. (Foster *et Davis*, 2007)

Až u dvou třetin pacientů se nachází alespoň jedna další abnormalita, která může souviset s *clubfootem*. U bilaterálních případů *clubfootu* existuje vyšší výskyt přidružených

anomálií. Většinu abnormalit představují urogenitální anomálie, defekty neurální trubice či srdeční vady. S pomocí prenatální ultrazvukové diagnostiky může být *clubfoot* odhalen již ve dvanáctém týdnu těhotenství. (Cooke *et al.*, 2008)

b) Vyšetření

Vyšetření dítěte s *clubfootem* by mělo být důkladné, se systematickým hledáním přidružených anomálií. Dítě by mělo být podrobena neurologickému vyšetření a případnému vyšetření na artrogrypózu. Zároveň by měla být vyšetřena i páteř. Důležitým faktorem je jasné rozlišení opravitelné deformity s pravým *clubfootem*. (Cooke *et al.*, 2008)

Zadní část nohy je v případě *clubfootu* v aduktu a cavu. Hluboké posteriorní a mediální rýhy mohou být poznamenány v závislosti na závažnosti deformity. Lýtková atrofie na ipsiterální straně společně se zkrácením a vnitřní rotací holeně nemusí být znát hned po narození, ale může se zvýraznit s růstem jedince. Vyšetření by mělo zahrnovat vyšetření páteře a úplné neurologické vyšetření. Ostatní klouby by měly být prošetřeny na úroveň tuhosti a deformity včetně kyčlí, které by měly být také hodnoceny pomocí ultrazvuku kvůli dysplazii. (Foster *et Davis*, 2007)

c) Posouzení závažnosti

Dle některých vědců existuje vztah mezi stupněm závažnosti *clubfootu* a počtem souvisejících poruch. Pokud dítě trpí závažnou formou *clubfootu*, tak je pravděpodobné, že bude vyžadovat operaci, a zároveň bude více náchylné k recidivě po skončení léčby. Z těchto důvodů je důležité, aby existovala metoda posouzení závažnosti *clubfootu* a příslušná dokumentace. (Cooke *et al.*, 2008)

Plně opravitelný poziční *clubfoot* by měl být řádně odlišen od pevné deformity. Ideální systém pro klasifikaci by měl být jednoduchý, spolehlivý a reprodukovatelný. Měl by pomoci určit prognózu a také následnou léčbu. Existuje celá řada klasifikačních systémů, avšak žádná klasifikace není zcela ideální. Mezi dvě základní patří:

• **Dimegliův bodovací systém**

Jedním ze současně užívaných systémů klasifikace je Dimegliův bodovací systém. Ten je považován za evropský, jelikož ho vytvořil Francouz Allan Dimeglio se svými kolegy. (Dunl *et al.*, 2014)

Dle tohoto systému by měl být *clubfoot* klasifikován na základě obtížnosti získání referenčních bodů, zhodnocení účinnosti ortopedické léčby a objektivní analýzy operativních výsledků. Stupnice 0-20 byla stanovena na základě čtyř základních parametrů - ekvinus v sagitální rovině, odchylka varu ve frontální rovině, blok derotace kolem talu části patní kosti a adukce přední části chodidla na patní část chodidla v horizontální rovině. (Dimeglio *et al.*, 1995)

Dimegliův bodovací systém je rozdělen do čtyř stupňů od nejnižšího po nejvyšší, přičemž čím ohebnější je končetina, tím nižší je skóre. Existují čtyři možné stavy: zadní rýha, mediální rýha, cavus a špatná funkce svalů. Maximální skóre je 20 a minimální 0, přičemž čím nižší je skóre, tím méně je noha poškozena. Skóre 0 reprezentuje zdravou nohu. Podle počtu bodů mohou být pacienti rozděleni do čtyř skupin, od benigního až po velmi závažný *clubfoot*. (Derzsi *et al.*, 2013)

• **Piraniho skóre**

Piraniho skóre je klasifikace, jenž byla poprvé představena veřejnosti roku 1995 S. Piranim v Miami. Jedná se tedy o americký systém klasifikace závažnosti *clubfootu*. (Dungl *et al.*, 2014)

Piraniho skóre je důležité pro svou prediktivní hodnotu. Ačkoliv neexistuje žádný dohodnutý způsob klasifikace závažnosti deformity, je třeba najít členění, které by bylo spolehlivé a reprodukovatelné. Pirani vymyslel jednoduchý systém kategorizace založený na šesti klinických příznacích kontraktury. Každá z nich se zaznamenává podle následujícího principu:

- 0 *žádná abnormalita*
- 0,5 *mírná abnormalita*
- 1 *těžká abnormalita*

Šest příznaků je rozděleno do tří skupin souvisejících se stavem zadní části chodidla (závažnost posteriorní rýhy, prázdná pata a rigidita ekvina) a tří souvisejících se střední částí chodidla (zakřivení laterálního okraje nohy, závažnost mediální rýhy a palpace laterálního okraje talu). Každé chodidlo může dostat skóre zadní části nohy mezi 0-3 a celkové skóre mezi 0-6. Tento bodovací systém je jednoduchý a spolehlivý. Noha může být zhodnocena za méně než minutu a nejsou zapotřebí žádná technická zařízení. (Dyer *et Davis*, 2006)

d) Výchozí diagnostika

Výchozí diagnóza *clubfootu* je klinická. I když je možno využít mnoha radiologických postupů, v rutinní praxi jich není třeba, jelikož mají rentgenové snímky omezenou hodnotu. U dětí je jen velmi malá osifikace kostí chodidla. Kostí novorozence jsou většinou chrupavčité jen s malými osifikačními centry, jenž jsou přítomné v patní kosti a talu.

Vzhledem k postavení nohy dítěte a rentgenové desky není možné zrentgenovat nohu přesně. Rozhodnutí o zahájení léčby tedy vychází z hodnot získaných využitím ultrazvuku a magnetické rezonance. (Cooke *et al.*, 2008)

Hlavním cílem léčby by mělo být opravení deformity co nejdříve a nejlépe zcela. Zároveň je nutné udržovat korekci s růstem dítěte až do vyzrání kostry. Léčba by měla vést k flexibilnímu, nebolestivému a normálnímu postavení chodidla. (Foster *et Davis*, 2007)

1.3 Metody léčby

Pro léčbu nemoci, kterou trpěl i ministr říšské propagandy Joseph Goebbels, se v současné době používají dvě základní metody – konzervativní a operativní léčba. (Macnicol *et Murray*, 2008)

V minulosti byla užívána zejména léčba konzervativní, a to pomocí pásek a odlévání sádry. S léčbou se začínalo ihned po porodu, aby byla deformita co nejdříve zkorigována. I přes snahy lékařů se bohužel nikdy zcela nedařilo deformitu opravit, a to kvůli neúplnému porozumění funkční anatomii chodidla.

Konzervativní léčba byla součástí léčby po více než čtyřicet let. Zásluhou zkvalitnění anestetik a chirurgických technik podstupovala většina dětí chirurgickou léčbu, což však vedlo k relapsu, a to zpravidla po jednom roce. Tendence v operační léčbě se v posledním desetiletí změnila. S pomocí podrobnějšího studia a lepšího porozumění funkční anatomii *clubfootu* se do popředí dostaly neoperační techniky. (Foster *et Davis*, 2007)

Cílem léčby je funkční a nebolestivé chodidlo. Noha by měla být vizuálně přijatelná, mít dobrou mobilitu a nevyžadovat žádnou speciální obuv ani ortézy, jakmile je léčba kompletní. V drtivé většině je takovýto výsledek dosažitelný, avšak noha nikdy nebude úplně normální. (Cooke *et al.*, 2008)

1.3.1 Konzervativní léčba

Možnost první volby by měla být vždy metoda neinvazivní. Máme dvě metody – fyzioterapii, kontinuální pohyb bez imobilizace, a Ponsetiho metodu, která byla popsána již před téměř padesáti lety. (Macnicol *et* Murray, 2008)

Francouzskou metodu neboli metodu funkční, je nejlepší aplikovat, dokud jsou kosti ještě mladé. Chodidlo dítěte je postupně protahováno pro dosažení správné polohy. Dítě je připojeno k přístroji, který s chodidlem neustále pohybuje, zatímco dítě spí. Tato metoda nepatří mezi nejpoužívanější, jelikož je velmi časově náročná. (Cooke *et al.*, 2008)

- **Ponsetiho metoda**

V roce 1995 Cooper a Deitz publikovali výsledky studie skupiny pacientů, jejichž nemoc byla léčena metodou popsanou Ignaciem Ponsetim. Mezi dva klíčové faktory jeho metody patří to, že spoléhal hlavně na manipulaci s končetinou a minimální využití chirurgie. Studie Coopera a Deitze uvádí, že sedmdesát osm procent pacientů mělo dobrý dlouhodobý výsledek definovaný nepřítomností bolesti nohy a normální funkcí končetiny. Cooper a Dietz zkoumali pacienty léčené Ponsetiho metodou po více než dvacet pět let, oproti tomu dlouhodobé výsledky u chirurgicky léčených pacientů jsou značně omezené. Z údajů, které máme k dispozici, vyplývá, že bolest je u nich častější.

Ponsetiho metoda je také založena na protahování. Jedná se o manipulaci s nohou za účelem získání její správné pozice a následném zasádrování končetiny pro udržení nohy v požadované poloze. (Cooke *et al.*, 2008)

Ponsetiho metoda manipulace a odlévání sádry je velmi účinná při korekci deformace koňské nohy. Neoperativní přístup obecně vede k nedostatečné korekci, přičemž u dětí s idiopatickou koňskou nohou, které podstoupily chirurgický zákrok, často vznikají rozsáhlá zjizvení měkkých tkání a reziduální bolesti. Ponseti tvrdí, že díky jeho technice manipulace nedojde k operaci v osmdesáti devíti procentech případů. (Pulak *et* Swammy, 2012)

Ačkoliv doktor Ponseti zveřejnil své dřívější výsledky již v roce 1963, zůstaly nepovšimnuty, dokud je Cooper a Dietz nezveřejnili ve své studii: „*Ponsetiho metoda se stala upřednostňovanou metodou díky přesvědčivým dlouhodobým výsledkům a reprodukovatelnosti.*“ Ponsetiho metoda spoléhá na intenzivní práci pacienta a dozor rodičů. Léčbu je nejlepší zahájit během několika dnů po narození a spočívá v postupné

korekci deformity strečinkem a zasádrováním končetiny. Použití sádry není novinkou, zmiňuje se o ní již Hippokrates v roce 400 př.n.l. (Cooke *et al.*, 2008)



Obr. 3. Manipulace nohy v supinaci z bočního pohledu; pata se distálně nestahuje



Obr. 4. Naložený korekční sádrový obvaz s tlakem palce jedné ruky nad laterální částí hlavičky talu a korekci nohy do abdukce v supinaci nohy druhou rukou (šipka)



Obr. 5. Na sádrovém obvazu je patrná modelace nad patičkou (silná šipka) a tlak nad laterální stranou hlavičky talu (tenká šipka)



Obr. 6. Postupná korekce postavení nohou do abdukce v supinaci; 3. korekční sádrový obvaz

Obrázek č. 5: Ponsetiho metoda (Chomiak *et al.*, 2009)

Profesor Ignacio Ponseti vypracoval pokyny pro svou metodu neoperativní léčby v roce 1940, a tato účinná metoda zůstává v podstatě beze změny až do dnešního dne. Tento způsob zahrnuje každotýdenní jemné protahování a manipulaci se zakřivenými kostmi s následným použitím dobře tvarované sádry. Korekce deformity je obvykle dosaženo během 6 až 8 týdnů. (Faulks *et Richards*, 2009)

- **Francouzská metoda**

Francouzská funkční metoda pro neoperativní léčbu *clubfootu* byla vytvořena v roce 1970 Massem, přičemž byla zdokonalována s rozvojem techniky v různých francouzských léčebných centrech v průběhu několika desetiletí. Tato metoda ošetření byla přinesena do Spojených států v roce 1996 Alainem Dimègliem. Tento způsob zahrnuje jemnou denní mobilizaci a protahování tkáně, stimulaci a posílení oslabených svalů, zpevnění svalů páskou a dlahování pro udržení stávající opravy. To vše je prováděno fyzioterapeuty se zkušenostmi v této metodě. Většiny korekce je dosaženo během prvních tří měsíců léčby, přičemž plná korekce se očekává během pěti měsíců. Rodiče se také učí

techniku, aby mohli s domácí terapií pokračovat až do věku, kdy dítě začíná chodit.

(Faulks *et Richards*, 2009)

1.3.2. Operativní léčba

Operace bývá v těžkých případech jedinou možností nápravy nohy po vyčerpání všech neinvazivních eventualit. Chirurgický zásah nezajistí plné zotavení končetiny, ale u většiny dětí, jež podstoupily operaci, je zachována správná poloha chodidla.

Pokud je u pacienta shledána potřeba chirurgického zákroku, většina chirurgů doporučuje operaci ve věku tři až šest měsíců. Chirurgické zákroky u novorozenců byly obhajovány zejména Ryöppym a Sairanenem. Lékař je však omezen velikostí chodidla a prostor pro chyby je v tomto případě velice malý. S malým chodidlem se špatně manipuluje, a to dokonce i přes použití zvětšovací prostředků. Pojem bezpečná anestezie je v tomto útlém věku věc také rozporuplná. Z důvodu anestezie se operace krátce po porodu dnes nedoporučuje. Pokud selhala konzervativní léčba je možno provést operaci, která by měla být provedena do prvního roku života dítěte. Pokud se bude u pacienta příliš dlouho otálet s chirurgickým zákrokem, stanou se tarzální kosti malformními a pacient už nebude schopen koordinovaného pohybu.

Jiní vědci tvrdí, že včasná operace je adekvátní volbou. Nicméně u velmi malé a silně deformované nohy by měl být zákrok odložen.

Ač se chirurgická léčba jeví mnohdy jako nejlepší volba, musíme počítat i s případnými komplikacemi. Mezi ně patří například nedostatečná nebo nadměrná korekce chodidla a chirurgická chyba při zákroku. (Macnicol *et Murray*, 2008)

- **Hypokorekce**

Tato situace může nastat v důsledku selhání konkrétní techniky. Hypokorekce je více pravděpodobná u těžšího *clubfootu*. Použitím konzervativních metod, které mají za následek pronaci přední části nohy, ztížíme odhalení subtalárního kloubu, a neumožníme tak patní kosti otáčet se pod hlezenní kostí. Z tohoto důvodu je korekce ohybu hlezenního kloubu ztížena a doba rekonvalescence prodloužena. Operace jsou obvykle prováděny v případě, že deformace není opravena pomocí konzervativních metod. Použitím Ponsetiho metody je deformita téměř vždy odstraněna. (Hulme, 2005)

K selhání při opravě deformity může dojít, pokud byly technické problémy, jako je podkluzování sádry. U neohebných artrogryptických chodidel je méně pravděpodobné, že bude možná náprava konzervativními metodami. (Macnicol *et Murray*, 2008)

- **Hyperkorekce**

K hyperkorekci může dojít při použití Ponsetiho metody. Ta se obvykle vyskytuje u dítěte s asignifikantním stupněm mobility, která se projevuje plochýma nohama. V této situaci by dítě mělo přestat nosit tyč na nohy určenou ke korekci *clubfootu* během noci.

Dítě by mělo být sledováno, aby byly včas odhaleny známky recidivy deformity, které někdy nastávají po sundání sádrových bot. Konzervativními metodami léčby může dojít k deformitě plosek chodidel. Deformita vzniká tím, že je vyvíjen tlak na přední část chodidla v přítomnosti Achilovy šlachy. Opět se jedná o obtížný problém k léčení a musí se dbát na to, aby k této deformitě nedošlo. (Macnicol *et* Murray, 2008)

1.4 Elektroforéza a hmotnostní spektrometrie

Dle slovníkové definice je elektroforéza technika, jenž je aplikována na třídění proteinů dle jejich reakce na působení elektrického pole.

Gelová elektroforéza je technika užívaná pro separaci vysokomolekulárních látek různé velikosti ve směsi prostřednictvím jejich mobility na gelu, jakým je agaróza nebo polyakrylamid. Děje se tak prostřednictvím elektrického pole, přičemž menší molekuly se pohybují rychleji než ty větší.

Hmotnostní spektrometrie se zabývá identifikací různých druhů částic přítomných v dané látce, přičemž dané částice jsou ionizovány a odděleny dle poměru hmotnost vůči náboji prostřednictvím působení elektromagnetického pole. (Dictionary, 2016)

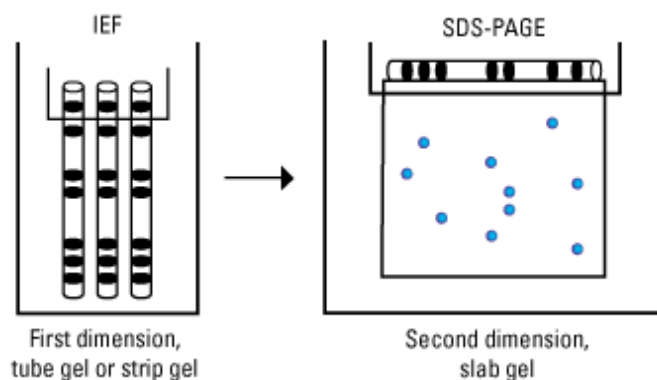
Přínosem hmotnostní spektrometrie je, že převede jednotlivé molekuly na ionty, a pak změří odezvu jejich dráhy na elektrické nebo magnetické pole.

Význam hmotnostní spektrometrie v průběhu let stoupal a dnes patří díky své citlivosti, detekčním limitům, rychlosti a různorodosti své aplikace k předním analytickým metodám. Hmotnostní spektrometrie byla mezi lety 1995 a 2005 významně zdokonalována. To vedlo k vývoji zcela nových přístrojů. Byly vyvinuty nové iontové zdroje za atmosférického tlaku, přičemž existující analyzátoři byly zdokonaleny (Hoffman *et Stroobant*, 2007)

1.4.1 1D elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) je vhodná pro separaci molekul dle velikosti a náboje, přičemž existuje mnoho různých systémů v závislosti na zpracování vzorku. SDS-PAGE je velmi užitečný nástroj pro dělení proteinových molekul podle velikosti. SDS je detergent, který denaturuje sekundární a terciární struktury. Mobilita proteinu na gelu může být ovlivněna jeho stavem. Systém SDS gelu je složen z diskontinuálního gelu s horním krycím gelem a dolním rozlišovacím gelem, které mají různé hodnoty pH. Řídký polyakrylamidový gel umožňuje proteinům pohybovat se rychle a hromadit se v těsném pásu před vstupem do více procentního polyakrylamidového rozlišovacího gelu pro separaci. Procentní podíly polyakrylamidu mohou být optimalizovány dle rozmezí velikostí molekul přítomných ve vzorku. Někdy se využívají gradientové gely, které umožňují větší rozsah separace v jediném gelu, kde jsou rozděleny jak velké, tak i malé proteiny současně. Malé proteiny se pohybují v rozlišovacím gelu

rychleji než velké proteiny. Experimentální náročnost metody může být značně zjednodušena použitím komerčně dostupných již připravených gelů. (Brunelle, 2014)



Obrázek č. 6: 1D a 2D elektroforéza (Thermo fisher scientific, 2002)

1.4.2 2D elektroforéza

V současné době je dvojrozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2-D PAGE) způsob, který je schopen rozdělit tisíce proteinů v jednom kroku, a je tak výborným nástrojem proteomického výzkumu. (Biorad, 2017)

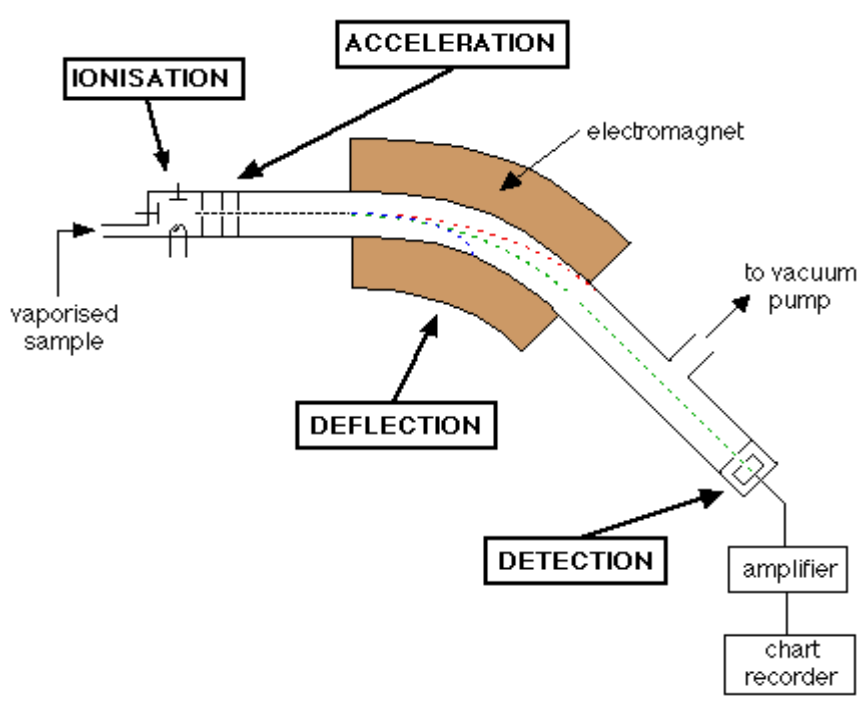
2D elektroforéza byla poprvé představena veřejnosti na počátku 70.let a od té doby je využívána v mnoha oblastech vědy. Tato technika se spoléhá na dvě hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti proteinů, a to na izoelektrický bod a molekulovou hmotnost. (Magdeldin *et al.*, 2012)

2D elektroforéza se používá k rozdělení složité směsi stovek až tisíců proteinů. V prvním rozměru se od sebe proteiny oddělí na základě rozdílů v isoelektrickém bodu. Ve druhém rozměru jsou od sebe odděleny podle molekulové hmotnosti. Po rozdělení jsou gely obarveny pro vizualizaci proteinů a následnou analýzu. V kombinaci s počítačovým programem, který vyhodnocuje naskenované obarvené gely pro komplexní kvalitativní a kvantitativní vyšetření proteomu, umožňuje tato elektroforetická technika katalogizaci bílkovin a následné porovnávání údajů. (Biorad, 2017)

1.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je nepostradatelným analytickým nástrojem v oblasti chemie, biochemie, farmacie a lékařství. Hmotnostní spektrometrie se používá k analýze kombinatorických knihoven, sekvence biomolekul a pomáhá zkoumat jednotlivé buňky.

Od roku 1950 se přístup k hmotnostní spektrometrii výrazně změnil. Průkopníci v hmotnostní spektrometrii používali v laboratoři vyrobené přístroje, neboť komerční neexistovaly. Tyto přístroje, typicky magnetické sektory s elektronovou ionizací, produkovaly několik hmotnostních spekter za den. V současnosti vysoce automatizované systémy jsou schopné produkovat tisíce spekter za analýzu. (Gross, 2004)



Obrázek č. 7: Schéma hmotnostního spektrometru (Chemguide, 2015)

1.5.1 Ionizační techniky

Vzhledem k tomu, že neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, existuje více typů ionizačních technik, které se používají v hmotnostní spektrometrii. Mezi staré klasické metody, které se však dnes již v moderní hmotnostní spektrometrii nepoužívají, patří ionizace nárazem rychlými atomy nebo ionty (FAB), ale i elektronová ionizace (EI), která se stále používá při GC/MS.

Ionizační techniky lze rozdělit na měkké a tvrdé v závislosti na množství vnitřní energie po ionizaci. Způsob ionizace volíme na základě těkavosti, molekulové hmotnosti a tepelné stability látky. Techniky mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku.

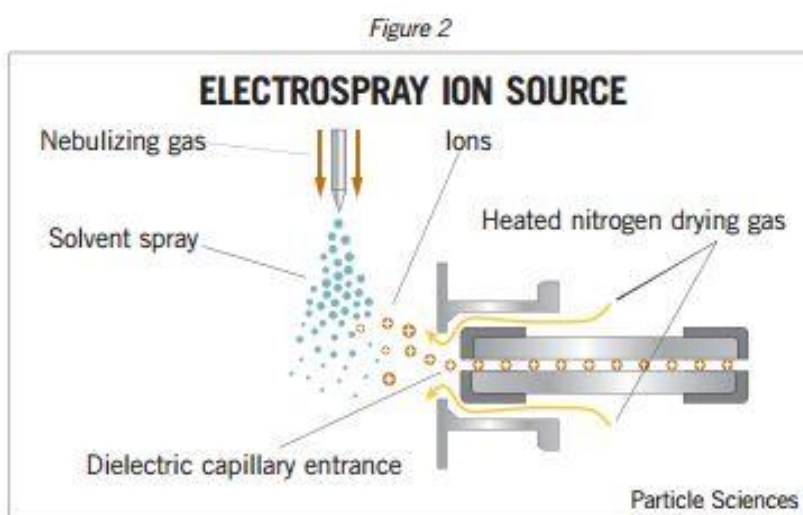
V dnešní době mají největší praktický význam tyto techniky – fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a elektronová ionizace (EI).

a) Měkké ionizační techniky

Mezi měkké ionizační techniky patří techniky pracující za atmosférického tlaku, jako je ESI, APCI a APPI. Vzniklé ionty mají většinou sudý počet elektronů.

- **Elektrosprejová ionizace (ESI)**

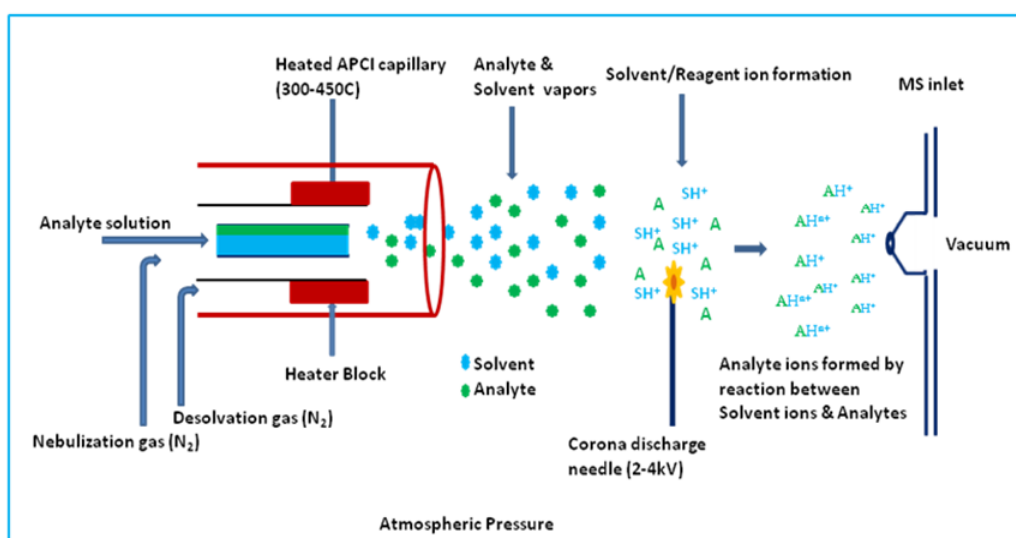
ESI je ionizační technika, která je nejčastěji používána pro spojení HPLC/MS a pro látky středně polární až iontové. ESI se nedá využít pro nepolární sloučeniny. Jedná se o měkkou a velmi šetrnou ionizační techniku. Používá se pro ionizaci peptidů, nukleových kyselin či sacharidů. Při ionizaci se tvoří vícenásobně nabitě ionty, proto je tato ionizační technika vhodná pro proteomickou analýzu. Principem ESI je přivedení rozpuštěného analytu kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Vzniklé kapky po rozprášení za pomoci zmlžujícího plynu nesou na povrchu velké množství nábojů. Odpařováním rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje a dochází k Coulombické explozi. Opakování tohoto procesu vede k uvolnění iontů. (Holčapek, 2016)



Obrázek č. 8: Schéma elektrosprejové ionizace (Particle sciences, 2009)

- **Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)**

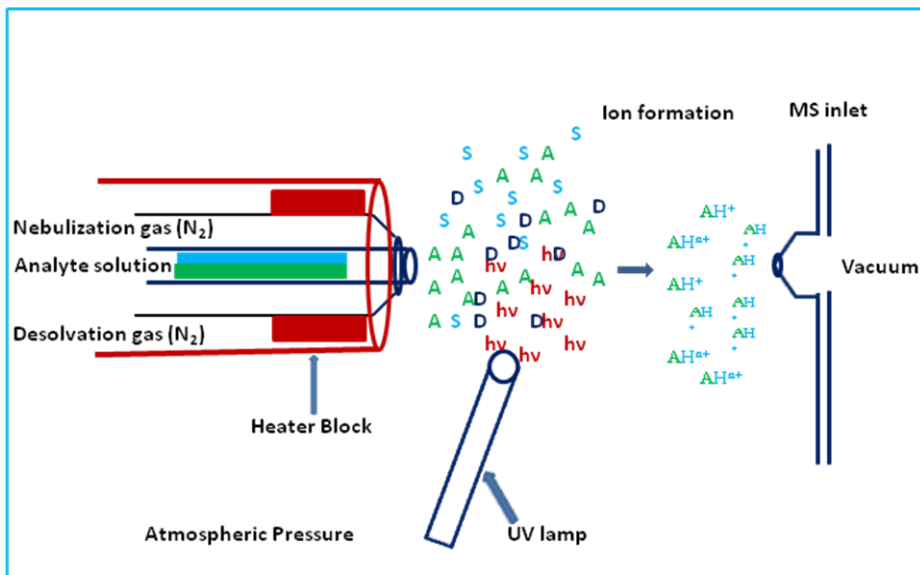
Chemická ionizace za atmosférického tlaku je často používaná ionizační technika pro spojení HPLC/MS. Jedná se o měkkou ionizační techniku, dokonce šetrnější než ESI. Užívá se pro látky nepolární až středně polární. Princip APCI je podobný jako u CI - nejprve jsou ionizovány molekuly reakčního plynu, které následně pomocí ion-molekulárních reakcí ionizují molekuly analytu, jen s tím rozdílem, že probíhá za atmosférického tlaku. Eluát je na konci kapiláry zmlžen do vyhřívané zóny. Na výbojovou elektrodu je vloženo vysoké napětí, čímž vzniká koronový výboj. Výbojem jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze a následně jsou ionizovány molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru. (Holčapek, 2016)



Obrázek č. 9: Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku (University of Pittsburgh, 2016)

- **Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)**

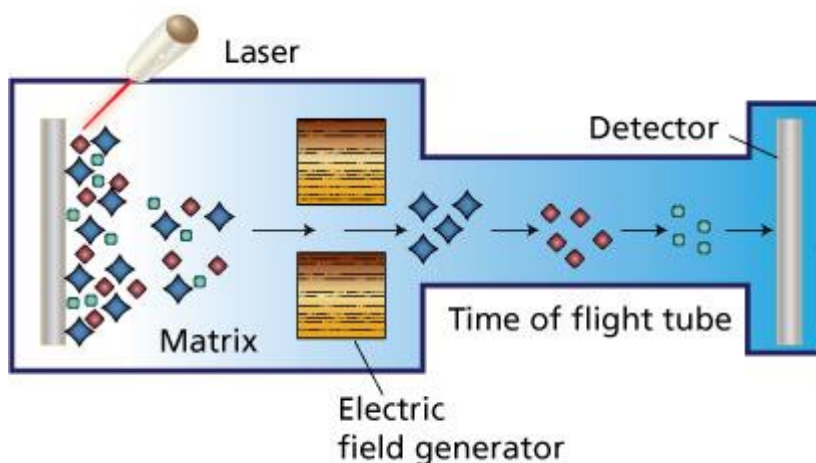
APPI využívá stejného uspořádání zdroje jako APCI, jen s tím rozdílem, že se pro ionizaci molekul využívá zdroj UV záření. APPI je vhodná pro ionizaci látek s velmi nízkou polaritou, tedy pro látky nepolární až středně polární. Jedná se o měkkou ionizační techniku, u které vznikají ionty s lichým počtem elektronů. Jako zdroj UV záření se používá kryptonová výbojka. Tato energie je větší než ionizační energie nepolárních organických molekul, ale menší než ionizační energie mobilní fáze, a tak dochází k selektivní ionizaci analytu a nikoliv mobilní fáze. (Holčapek, 2016)



Obrázek č. 10: Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku, (University of Pittsburgh, 2016)

- **Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)**

MALDI se využívá pro ionizaci molekul s velkou molekulovou hmotností, například pro biopolymery, proteiny, oligonukleotidy či lipidy. Jedná se o měkkou ionizační techniku, která se využívá pro látky nepolární až polární. Výhodou MALDI je možnost archivace vzorku a jeho opětovné přeměření. Princip MALDI spočívá v tom, že je vzorek společně s matricí nanesen na MALDI terčík. Energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí a následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu. Excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt a ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru. (Holčapek, 2016)

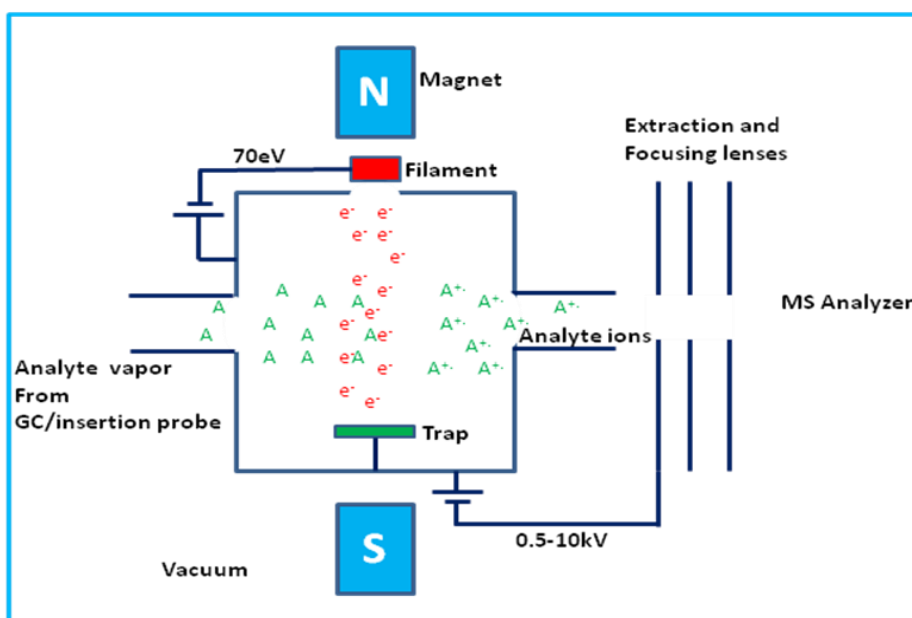


Obrázek č. 11: Schéma ionizace laserem za účasti matrice (Sigma-Aldrich, 2017)

b) Tvrdé ionizační techniky

- **Elektronová ionizace (EI)**

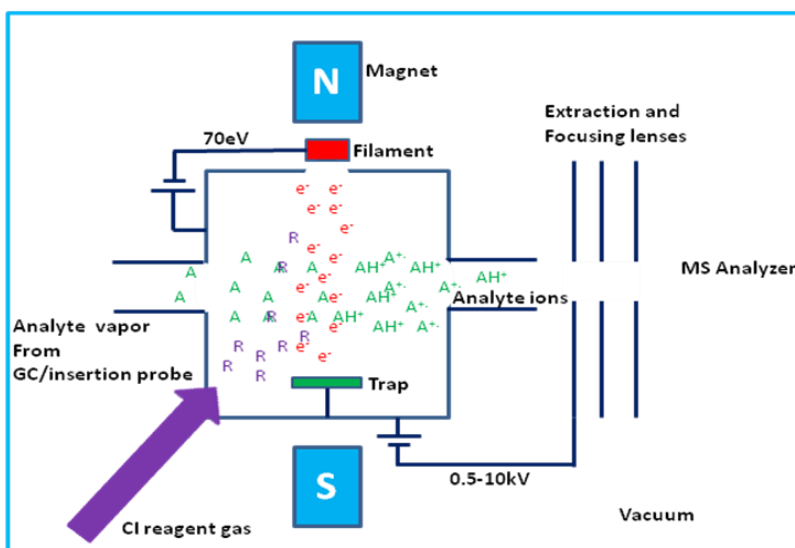
EI je nejstarší a nejtvrdější ionizační technikou, při které molekula získá největší přebytek vnitřní energie, což má za následek fragmentaci molekulárního iontu. Při elektronové ionizaci vznikají ionty s lichým počtem elektronů. EI je technika určena pro těkavé a termostabilní látky. Existují rozsáhlé knihovny EI spekter. Principem EI je to, že žhavená katoda emituje elektrony, které jsou po průchodu iontovým zdrojem zachyceny na anodě, přičemž potenciál mezi katodou a anodou určuje energii elektronů. Vzniklé ionty jsou vypuzeny z iontového zdroje, svazek iontů je fokusován směrem do hmotnostního analyzátoru. (Holčapek, 2016)



Obrázek č. 12: Schéma elektronové ionizace (University of Pittsburgh, 2016)

- **Chemická ionizace (CI)**

Chemická ionizace patří mezi tvrdé ionizační techniky a vzniklé ionty mají na rozdíl od elektronové ionizace sudý počet elektronů. Princip chemické ionizace je analogický principu elektronové ionizace, ve zdroji je navíc přítomen reakční plyn. Nejprve jsou ionizovány molekuly reakčního plynu, které následně pomocí ion-molekulárních reakcí ionizují molekuly analytu. (Holčapek, 2016)



Obrázek č. 13: Schéma chemické ionizace (Univerzity of Pittsburgh, 2016)

1.5.2 Analyzátoři

Existuje několik typů analyzátorů používaných pro analýzu poměru hmoty k náboji (m/z) iontů vytvořených ve zdroji. Tyto analyzátoři mohou být kombinovány pro vytvoření tandemové hmotnostní spektrometrie. Pokud jsou kombinovány různé typy analyzátorů, nazývají se hybridní zařízení. (Emori college, 2016)

- **Magnetický sektorový analyzátor**

Magnetický sektorový analyzátor byl dříve nejpopulárnějším analyzátořem pro analýzu s vysokým rozlišením, někdy se od nich upouští kvůli složitosti jejich spouštění. Přesto je to však kvůli své citlivosti nejlepší prostředek na analýzu dioxinů.

- **Kvadrupólový analyzátor**

Kvadrupól je jedním z nejčastěji využívaných analyzátorů z důvodu jednoduchosti užití, citlivosti a rychlosti skenování. Tyto vlastnosti ho činí ideálním pro takové aplikace jako GC/MS a LC/MS. Jsou to v podstatě čtyři tyče, na které je aplikované kombinovaně radiofrekvenční napětí (RF) a stejnosměrný proud (DC). Kombinace se volí tak, aby pouze ionty s určitým m/z nebo rozmezím m/z byly přeneseny analyzátořem. Napětí je řízeno počítačem.

- **Iontová past**

Iontová past je v podstatě trojrozměrný kvadrupól. Tento typ hmotnostního spektrometru může uchovávat ionty a manipulovat s nimi. Schopnost ukládat a manipulovat s ionty se používá pro získání tandemového hmotnostního spektra.

- **Průletový analyzátor**

Time of flight hmotnostní spektrometr (TOF) je relativně jednoduchý spektrometr, který v podstatě měří pouze čas, který iont potřebuje, aby urazil potřebnou vzdálenost se specifickou kinetickou energií. Iont s větším poměrem hmotnosti vůči náboji (m/z) cestuje déle než iont s menším poměrem m/z . Tento analyzátor je velmi citlivý a rychlý.

- **Iontová cyklotronová rezonance**

Tyto přístroje měří frekvenci cyklotronového pohybu způsobeného ionty v magnetickém poli. Frekvence tohoto pohybu je závislá na m/z iontů. Tyto nástroje mohou mít extrémně vysoké rozlišení a hmotnostní přesnost v závislosti na době pozorování a magnetickém poli. Nevýhodou iontové cyklotronové rezonance je relativně pomalá rychlost skenování a nutná údržba supravodivých magnetů.

- **Orbitrap**

Orbitrap je nejnovější hmotnostní analyzátor, který byl uveden na trh v roce 2005. Orbitrap je velmi podobný iontové cyklotronové rezonanci, ale nevyžaduje přítomnost supravodivých magnetů. Analyzátor měří četnost iontů vstříkovaných současně do elektrostatické pasti. (Emory college, 2016)

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce byla analýza změn pojivové tkáně u vrozené choroby *pes equinovarus* neboli *clubfoot*.

Dílčí kroky byly následující:

1. Příprava vzorku a vývoj extrakční metody
2. Elektroforetická analýza
3. Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Biologický materiál

Vzorky jsme získali od MUDr. Martina Ošťáda, Ph.D. z Nemocnice Na Bulovce v Praze z oddělení pediatrie od pacientů, jenž museli podstoupit chirurgickou léčbu. Odstranění patřičných částí tkáně tudíž bylo součástí standardního chirurgického zákroku. Extrahované vzorky tkáně byly ihned uloženy do růstového buněčného média, aby byla zachována životaschopnost buněk. K dispozici jsme měli 6 vzorků. Pacientům, kterým byla při operačním zákroku odebrána část tkáně bylo mezi jedním rokem až třemi lety.

Další zpracování vzorků se odehrávalo během několika hodin po chirurgickém zákroku. Vzorky byly zamrazeny v kapalném dusíku a následně použity pro analýzu proteinů.

Tkáň z mediální strany byla rozdělena do tří částí s definovanými rozměry. Jedna část byla vystavena proteázové léčbě v dynamickém systému, druhá část byla uložena jako kontrola. Třetí část byla použita pro izolaci buněk.

Tabulka č. 1: Výběr vhodných tkání pro experiment. (Vnitřní část chodidla M, vnější část chodidla L)

Označení	Část	Část	Pohlaví
H	M	L	muž
D	M	L	muž
J	M	L	muž
V	M	L	muž
R	M	L	muž
M	M	L	muž

Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Třepačka Mini Shaker PSU-2T (bioSan, Riga, Lotyšsko)
- Analytické váhy ABJ 0715 (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- Vortex Fisherbrand CLASSIC AGIT. VORTEX 100-240V (IKA, Německo)
- Předvažky PCB (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- Elektroforetická vana Owl™ EasyCast™ B1A (Thermo scientific, USA)
- Centrifuga (Eppendorf 5424, Německo)
- Vortex IKAR MS3 basic (IKA, Německo)
- Laminární box FV001 (ESCO, Singapur)
- Plastové špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)

- Pipety o objemu 10 - 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Lyofilizátor (Fisher Scientific, ČR)
- Skleněné odměrné baňky a válce (Fisherbrand, ČR)
- Izofokusační stripy (BioRad, ČR)
- Skenner (BioRad, ČR)
- Ultrazvuková lázeň (BioRad, ČR)
- Plastové zkumavky 0,2-2 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Metody a postupy

3.1 Příprava vzorku a vývoj extrakční metody

3.1.1 Chemikálie a reagenty

- Acetonitril (Sigma, ČR)
- Hovězí sérový albumin/BSA (Sigma, ČR)
- Chloroform (Fisher scientific, UK)
- Milli-Q voda (Milipore, ČR)
- Lysis buffer [7 M močovina (Biorad, ČR), 2 M thiomočovina, (Biorad, ČR), 4 % CHAPS (Sigma, ČR)], 0,6 % BioLyte, (Biorad, ČR), 1 % DTT (Sigma, ČR) do 25 ml]
- MeOH (Fisher scientific, UK)
- PBS [80g NaCl, (Penta, ČR) 2g KCl, (Penta, ČR) 14.4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, (Penta, ČR) 2.4g KH_2PO_4 (Penta, ČR) do 1 litru vody]
- Tekutý dusík (Linde, ČR)

3.1.2 Postup

Všechny vzorky byly vždy drženy mezi zpracováním na ledu, aby se minimalizovala možná degradace vzorku proteázami. Označený kousek šlachy (cca 0,5-1 cm) byl zamražen, lyofilizován a zvážen. Šlacha byla nasekána žiletkou na čisté skleněné podložce na malé kousky šlach o velikosti cca 1 mm. Kousky byly vloženy do velké eppendorfy (5 ml). Vzorek byl opláchnut v 1,5 ml PBS pufru třepáním ve vortexu po dobu 1 min. Následně byl vzorek sonikován po dobu 15 min, přičemž teplota sonikační lázně nesměla přesáhnout 37°C , takže se do ultrazvuku přidával v pravidelných intervalech led. Poté byl vzorek vložen do centrifugy a supernatant odstraněn. Toto opláchnutí PBS

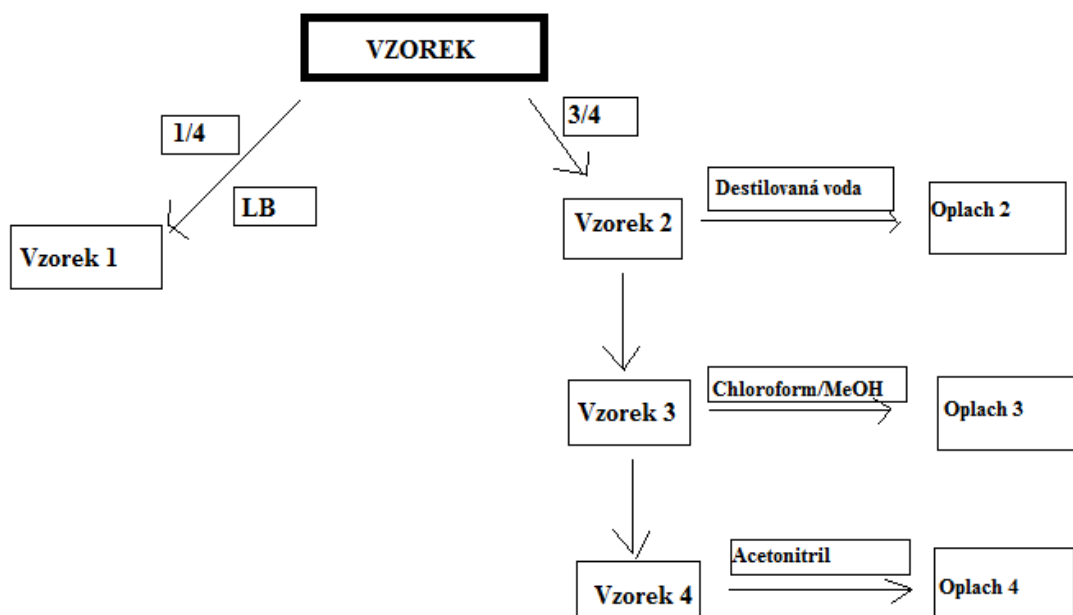
pufrem bylo opakováno ještě dvakrát. Takto opláchnutý vzorek byl zamražen v -80°C a poté homogenizován „nasucho“ drcením kleštěmi a kladivem po namočení do tekutého dusíku. Po homogenizaci se vzorek promíchal a byla odebrána $\frac{1}{4}$, která byla použita na zpracování jako **vzorek č. 1**. Zbytek byl použit na zpracování jakožto **vzorek č. 2**. Vzorky byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek (eppendorfek) s parabolickým dnem vzhledem k následnému užití paličky.

Vzorek č. 1: Vzorek byl lyofilizován. K vzorku bylo přidáno 300 μl LB. K rozpouštění vzorků jsme si připravili lysis buffer o složení: 7 M močovina (urea), 2 M thiomočovina (thiourea), 4 % CHAPS, 0,6 % BioLyte, 1 % DTT. Vzorek byl třen ručně paličkou v LB po dobu 10 minut. Kousky tkáně se přitom rozpadaly na menší části. Extrakci proteinů jsme dokončili sonikací vzorku po dobu 30 min ve vodní lázni. (teplota lázně nepřekročila 37°C kvůli přítomnosti urey v LB. Lázeň byla chlazená ledem, jelikož se zahřívala během sonikace. Roztok byl poté centrifugován (12 500 g, 2 min) a svrchu byl opatrně odebrán alikvót roztoku vzorku (2 x 5 μl). Dále bylo 5 μl alikvótu vzorku analyzováno pomocí SDS-PAGE a poté 125 μl vzorku pomocí 2-DE.

Vzorek č. 2: Vzorek byl 3x opláchnut v 0,5 ml redestilované vody třepáním ve vortexu po dobu 1 min a následně sonikován po dobu 5 min. Poté byl vzorek zcentrifugován a oplach uschován. Všechny tři oplachy byly spojeny do jednoho (1,5 ml), zlyofilizovány a analyzovány SDS-PAGE. Vzorek byl zlyofilizován. Ze vzorku byla odebrána $\frac{1}{3}$, ke které bylo přidáno 300 μl LB. Následně byl vzorek třen paličkou, a postup byl stejný jako u vzorku č. 1. Zbytek zlyofilizovaného ($\frac{2}{3}$) vzorku byl zpracován jako **vzorek č. 3**.

Vzorek č. 3: Vzorek byl opláchnut 3x v 0,5 ml směsi chloroform/MeOH (2:1; v/v). Následně byl třepán ve vortexu po dobu 1 minuty a sonikován po dobu 5 minut. Po celou dobu byl kladen nárok na teplotu sonikační lázně, která nesměla přesáhnout 37°C . Poté byl vzorek zcentrifugován a oplachy byly spojeny, uschovány, zlyofilizovány a analyzovány na SDS-PAGE. Vzorek byl zlyofilizován a byla z něj odebrána $\frac{1}{2}$, která šla k dalšímu zpracování jako **vzorek č. 4**. Ke zbylé druhé polovině vzorku bylo přidáno 300 μl lysis bufferu a byl třen paličkou, a dále bylo postupováno stejně jako u vzorku č. 1.

Vzorek č. 4: Vzorek byl opláchnut 3x v 0,5 ml acetonitrilu a následně byl dán do vortexu na 1 minutu. Následně byl vzorek sonikován, zcentrifugován a organická část byla odsáta a uschována. Dále byl postup stejný jako v případě vzorku č. 1.



Obrázek č. 14: Schéma postupu přípravy vzorky a vývoje extrakční metody

Postup přípravy PBS pufru

K přípravě 1 litru PBS pufru jsem rozpustila v 900 ml redestilované vody 8g NaCl; 0,2g KCl; 0,2g KH_2PO_4 ; 2,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Následně jsem změřila pH roztoku, a jelikož se pH nacházelo v rozmezí 7,0-7,4, již jsem nemusela upravovat pH pomocí HCl. Následně jsem doplnila vodou na 1 litr roztoku.

Postup přípravy lysis bufferu

K přípravě 25 ml roztoku jsem rozpustila 3,8g thimočoviny; 10,5 g močoviny; 1g CHAPS a 250 mg DTT v 1,5 ml redestilované vody. Když se chemikálie po 1 hodině rozpustily, přidala jsem 750 μl roztoku Biolyte a doplnila vodou do objemu 25 ml.

3.2 1D elektroforéza

3.2.1 Chemikálie a reagensie

- TEMED (Biorad, ČR)
- 10 % Persíranu amonného/APS (Sigma, ČR)
- 1,5 M pufr Tris/HCl o pH 8,8 [27,23 g Tris báze (Sigma, ČR) a 80 ml destilované vody (Sigma, ČR)]
- 0,5 M pufr Tris/HCl o pH 6,8 [6g Tris báze (Sigma, ČR) a 60 ml destilované vody (Sigma, ČR)]
- Milli-Q voda (Milipore, ČR)
- 30% Bis-akrylamid (Biorad, ČR)
- Lysis buffer [7 M močovina (Biorad, ČR), 2 M thiomčovina, (Biorad, ČR), 4 % CHAPS (Sigma, ČR)], 0,6 % BioLyte, (Biorad, ČR), 1 % DTT (Sigma, ČR) do 25 ml]
- Dodecylsírán sodný/SDS (Sigma, ČR)
- Ethanol (Sigma, ČR)
- Protein standard (Biorad, ČR)
- 0,25 % roztok Coomassie brilliant blue (Biorad, ČR)
- 10x zředěný elektrodový pufr o pH 8,3 [30,3g Tris báze (Sigma, ČR), 144 g glycin (Sigma, ČR), 10g SDS (Sigma, ČR) do 1 litru]

3.2.2 Postup

a) Příprava dolního polyakrylamidového gelu

Nejprve bylo nutné si připravit a očistit skla potřebná k vytvoření polyakrylamidového gelu. Připravila jsem si roztok na dolní gely, na jejichž přípravu bylo potřeba 11,1 ml redestilované vody, 11,1 ml 30% bis-akrylamidu, 7,5 ml Tris/ HCl pufru o pH 8,8, 0,3 ml 10% SDS, 50 μ l 10% APS a 5 μ l TEMED.

Vzniklý roztok se nechal odvdušnit v přístroji Concentrator, v módu DHV po dobu 5 minut. Následně byl přepipetován mezi skla, ve kterých byl ihned převrstven 800 μ l roztoku etanolu a vody v poměru 1:1 a nechal se hodinu tuhnout.

Postup přípravy 10% (w/v) APS

K přípravě 10% (w/v) APS bylo potřeba navážit 100 mg persíranu amonného, který byl rozpuštěn v 1 ml redestilované vody.

b) Příprava horního polyakrylamidového gelu

Po ztuhnutí dolního gelu byl připraven horní, krycí, gel. Na ten jsem si připravila 18,3 ml redestilované vody, 3,9 ml 30% Bis-Akrylamidu, 7,5 ml pufru Tris/HCl o pH 6,8, 0,3 ml 10% SDS, 50 μ l 10% APS a 10 μ l TEMEDu. Roztok byl odzdušněn v přístroji Concentrator, v módu DHV po dobu 5 minut a následně nalit mezi skla. Do všech gelů byl zabodnut hřebínek určený na vytvoření jamek na 1D elektroforézu a gely se nechaly 30 minut tuhnout.

c) Elektroforéza

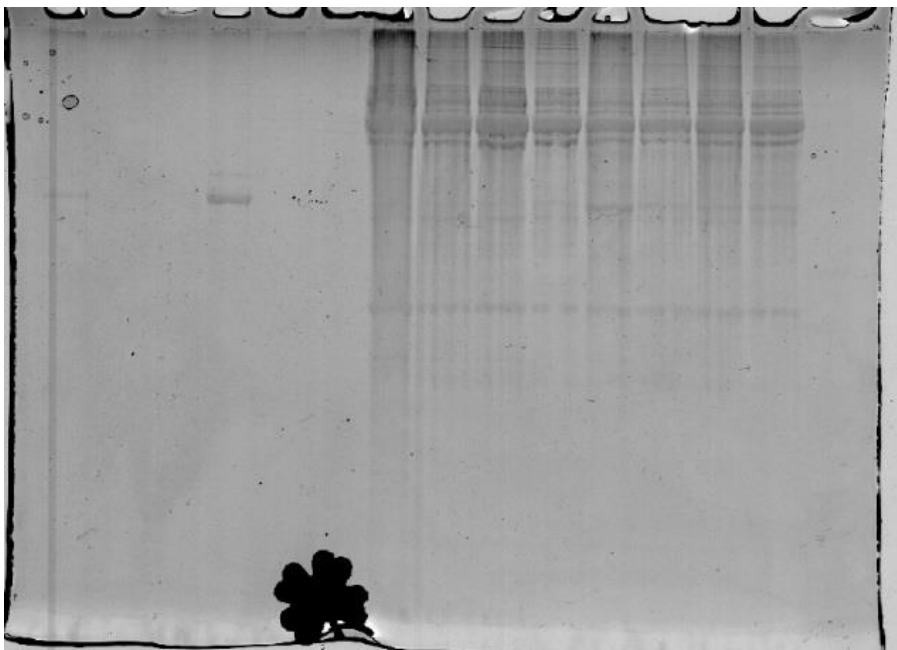
Po zatuhnutí gelů byly hřebínky vyndány a gely společně se skly vloženy do držáků, které byly umístěny do elektroforetické vany. Mezi skla byl přidán vnitřní 10x zředěný elektrodový pufr a do zbytku vany byl přidán vnější elektroforetický pufr. Do jamek vniklých po ztuhnutí horního krycího gelu bylo nadávkováno pipetou nejprve po 2 μ l a posléze po 6 μ l vzorku. Jedna jamka z každého gelu byla určena pro napipetování standardu.

Postup přípravy 10x zředěného elektrodového pufru o pH 8,3

K přípravě 10x zředěného elektrodového pufru bylo potřeba smíchat 30,3g Tris báze, 144 g glycinu a 10g SDS v 600 ml destilované vody. Po rozpuštění chemikálií byla směs doplněna destilovanou vodou do 1 litru.

Průběh elektroforézy

Připravený polyakrylamidový gel byl vložen do připraveného systému „Mini-Protean[®] Tetra cell system”, který separoval bílkoviny v gelu při napětí 200V dokud modrá linka (bromfenolová modř) nedosáhla konce gelu (cca 45 min). Standard obsahoval bromfenolovou modř, jenž je záporně nabitá, a slouží tak jako kontrola pohybu fragmentů gelem. Působením napětí se molekuly začaly pohybovat. Čím větší molekula, tím je tento proces komplikovanější, a proto za určitou dobu překoná mnohem kratší vzdálenost než molekula s malou velikostí. Tímto se jednotlivé molekuly od sebe oddělily podle velikosti.



Obrázek č. 15: 1D elektroforéza vzorků získaných od dítěte D

d) Vizualizace proteinů

Ve chvíli, kdy bromfenolová modř opustila SDS gel, byla elektroforéza ukončena a polypeptidy byly zafixovány v 0,25 % roztoku Comassie brilliant blue, kde byly po dobu 30 minut a následně byla barva vylita a vyměněna za redestilovanou vodu, ve které se gely odbarvovaly po dobu 1 hodiny.

Následně se gely oskenovaly pomocí skeneru: GS-800 Calibrated Densitometer se softwarem Quantity One[®], Bio-Rad. Výstupem 1D gelové elektroforézy jsou obrázky obsahující několik drah, po kterých putovaly jednotlivé segmenty zkoumaného vzorku.

3.3 2D elektroforéza

3.3.1 Chemikálie a reagensie

- TEMED/tetramethylendiamin (Biorad, ČR)
- 1,5 M pufr Tris/HCl o pH 8,8 [27,23 g Tris báze (Sigma, ČR) a 80 ml destilované vody (Sigma, ČR)]
- Milli-Q voda (Milipore, ČR)
- 30% Bis-Akrylamid (Biorad, ČR)
- LB [7 M močovina (Biorad, ČR), 2 M thiomčovina, (Biorad, ČR), 4 % CHAPS (Sigma, ČR)], 0,6 % BioLyte, (Biorad, ČR), 1 % DTT (Sigma, ČR) do 25 ml]
- Persíran amonný/APS (Sigma, ČR)

- Coomassie blue G-250 (Biorad, ČR)
- SDS (Sigma, ČR)
- Ready IPG Strips (Biorad, ČR)
- Minerální olej (Biorad, ČR)
- Ethanol (Sigma, ČR)
- Ekvilibrační pufr I [50 ml zásobního roztoku Tris/HCl o pH 8,8, 72g močoviny, 40 ml glycerolu, 4g SDS a 100 µl 0,5% bromové modři, 2g DTT]
- Ekvilibrační pufr II [50 ml zásobního roztoku Tris/HCl o pH 8,8, 72g močoviny, 40 ml glycerolu, 4g SDS a 100 µl 0,5% bromové modři, 4g iodacetamidu]
- Agaróza (Biorad, ČR)

3.3.2 Postup

a) Příprava vzorků

Na rozpouštění vzorků si připravíme lysis buffer: 7 M močovina (urea), 2 M thiomčovina (thiourea), 4 % CHAPS, 0,6 % BioLyte, 1 % DTT.

b) Hydratace IPG stripů a isoelektrická fokusace

Den před plánovanou elektroforézou bylo třeba na jednotlivé IPG stripy o příslušné délce a rozsahu pH, v našem případě 7 cm, 3-10 pH nanést 150 µl vzorku a nechat ho 1 hodinu hydratovat. Po hodině byl strip překryt 1 ml minerálního oleje, aby nevysychal a byl spuštěn program IEF na přístroji Protean IEF Cell.

Table 1. Running conditions using the Multiphor

Gel length	180 mm	
Temperature	20°C	
Current max.	0.05 mA per IPG strip	
Power max.	0.2 W per IPG strip	
Voltage max.	3500 V	
I Analytical IEF		
Initial IEF:		
Cup loading (20–50 µL)	In-gel rehydration (350 µL)	
150 V, 1 h	150 V, 1 h	
300 V, 1–3 h	300 V, 1–3 h	
600 V, 1 h		
IEF to the steady state at 3500 V:		
1–1.5 pH units	4 pH units	7 pH units
e.g. IPG 5–6 24 h	IPG 4–8 10 h	IPG 3–10 L 6 h
e.g. IPG 4–5.5.. 20 h	IPG 6–10 10 h	IPG 3–10 NL .. 6 h
3 pH units	5–6 pH units	8–9 pH units
IPG 4–7 12 h	IPG 4–9 8 h	IPG 3–12 6 h
IPG 6–9 12 h	IPG 6–12 8 h	IPG 4–12 8 h
II Extended separation distances (240 mm)		
IEF to the steady state at 3500 V:		
IPG 3–12 8 h		
IPG 4–12 12 h		
IPG 5–6 40 h		
III Micropreparative IEF		
Initial IEF:		
Cup loading (100 µL)	In-gel rehydration (350 µL)	
50 V, 12–16 h	50 V, 12–16 h	
300 V, 1 h	300 V, 1 h	
IEF to the steady state at 3500 V:		
Focusing time of analytical IEF plus approximately 50%		

Obrázek č. 16: Provozní podmínky IPGphoru, (Görg et al., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, 2000)



Obrázek č. 17: Zleva Mini-Protein® Tetra cell system určený na elektroforézu, vpravo přístroj Protean IEF Cell určený na izoelektrickou fokusaci (obojí Biorad, ČR)

c) Ekvilibrace IPG stripů

Po skončení IEF jsem ekvilibrovala IPG stripy po dobu 10 minut nejprve v 1 ml ekvilibračního roztoku číslo 1 (obsahujícím Tris-HCl pufr, 6M močoviny, 30% glycerolu, 2% SDS, 1% DTT a 100 µl bromfenolové modři. Následně jsem stripy ekvilibrovala v 1 ml ekvilibračního roztoku číslo 2 (obsahujícím Tris-HCl pufr, 6M močoviny, 30% glycerolu, 2% SDS, 4% iodoacetoamid a 100 µl bromfenolové modři). Po ekvilibraci byly IPG stripy 10 krát opláchnuty v 10x zředěném elektrodoovém pufru.

Postup přípravy základního roztoku pro přípravu ekvilibračních pufrů

Na přípravu 200 ml ekvilibračních pufrů bylo potřeba 50 ml zásobního roztoku Tris/HCl o pH 8,8, 72g urey, 40 ml glycerolu, 4g SDS a 100 µl 0,5% bromové modři. Po smíchání všech potřebných složek se objem doplnil na 180ml destilovanou vodou.

Ekvilibrační pufr I.

Na přípravu EP I. bylo odebráno 90 ml základního roztoku a přidáno 2g DTT. Následný roztok byl zahříván a míchán pomocí míchadla 60 minut při 80°C.

Ekvilibrační pufr II.

Na přípravu EP II. bylo odebráno 90 ml základního roztoku a přidáno 4g jodacetamidu. Následný roztok byl zahříván a míchán pomocí míchadla 60 minut při 80°C.

d) SDS-PAGE

Nejprve bylo nutné si připravit a očistit skla potřebná k vytvoření polyakrylamidového gelu. Připravila jsem si roztok na dolní gely, na jejichž přípravu bylo potřeba 11,1 ml redestilované vody, 11,1 ml 30% Bis-akrylamidu, 7,5 ml Tris/ Hcl pufru o pH 8,8, 0,3 ml 10% SDS, 50 µl 10% APS a 5 µl TEMED.

Vzniklý roztok se nechal odvzdušnit v přístroji Concentrator, v módu DHV po dobu 5 minut. Následně byl přepipetován mezi skla, ve kterých byl okamžitě převrstven 800 µl roztoku etanolu a vody v poměru 1:1 a nechal se hodinu tuhnout. Po ztuhnutí dolního gelu byly IEF stripy opláchnuty v ekvilibračním pufru I po dobu 10 minut a následně v ekvilibračním pufru II taktéž po dobu 10 minut. Následně byla v mikrovlnce rozehřáta agaróza.

Připravila jsem si cca 30 ml 10x zředěného elektrodoového pufru, ve kterém jsem patnáctkrát opláchnula každý strip. Ztuhlé gely jsem převrstvila 1 ml agarózy a vložila do ní opláchnuté stripy. Po vložení všech stripů jsem vložila gely do držáků, které byly umístěny

do elektroforetické vany. Mezi skla byl přidán vnitřní 10x zředěný elektrodotový pufr a do zbytku vany byl přidán vnější elektroforetický pufr.

Postup přípravy agarózového pufru

K přípravě agarózového pufru bylo zapotřebí smíchat 0,5g agarózy, 10 ml 10x koncentrovaného elektrodotového pufru, 90 ml redestilované vody a 15 μ l 0,5 % roztoku bromfenolové modři.

Průběh elektroforézy

Polyakrylamidové gely se umístily do připraveného systému „Mini-Protean® Tetra cell system”, kde se separovaly bílkoviny v gelu při napětí 200V dokud modrá linka (bromfenolová modř) nedosáhla konce gelu (cca 45 min). Standard obsahoval bromfenolovou modř, jenž je záporně nabitá, a slouží tak jako kontrola pohybu fragmentů gelem. Působením napětí se molekuly začaly pohybovat. Čím větší molekula, tím je tento proces komplikovanější, a proto za určitou dobu překoná mnohem kratší vzdálenost než molekula s malou velikostí. Tímto se jednotlivé molekuly od sebe oddělily podle velikosti.

e) Vizualizace proteinů

Ve chvíli, kdy bromfenolová modř opustila SDS gel, průběh elektroforézy byl zastaven a zafixován v 0,25 % roztoku Coomassie Blue G250 Stain (Biorad, ČR), kde byly po dobu 30 minut a následně byla barva vylita a vyměněna za redestilovanou vodu, ve které se gely odbarvovaly po dobu 1 hodiny.

Následně byly gely oskenovány pomocí skeneru: GS-800 Calibrated Densitometer se softwarem Quantity One® (Bio-Rad, ČR). Výstupem 2D gelové elektroforézy jsou dvourozměrné mapy, které se následně užívají jako identifikační nástroj.



Obrázek č. 18: 2D elektroforéza u dítěte D

3.4 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

3.4.1 Chemikálie a reagensy

- Milli-Q voda (Milipore, ČR)
- 0,2 mg/mL trypsin (Sigma, ČR)
- 0,05 mol/L NH_4HCO_3 (Sigma, ČR)
- 0,3 mL aceton (Sigma, ČR)
- 1% kyselina mravenčí (Sigma, ČR)

3.4.2 Příprava vzorků na hmotnostní spektrometrii z čisté tkáně

Vzorky tkáně byly nařezány žiletkou na skleněné podložce na co nejmenší kousky a 3x opláchnuty v redestilované vodě, poté rozděleny na 2 části a lyofilizovány a zamraženy. Dále byla práce jen s 1/2, která byla zvážena a následně bylo přidáno 0,2 mg/mL trypsinu v 0,05 mol/L NH_4HCO_3 ve 200 ml. Vzorek byl homogenizován zelenou paličkou a inkubován při 37°C přes noc. Druhý den bylo přidáno 0,3 mL acetonu a vzorek bylo uloženo do -20°C přes noc. Druhý den byl centrifugován (10 000g, 2 minuty). Posléze byl supernatant inkubován v 0,2 mL roztoku 0,05 mol/L NH_4HCO_3 a 0,04 mg/mL trypsinu při 37°C přes noc. Vzorky byly filtrovány přes stage tipy a extrahovaný roztok byl lyofilizován a rozpuštěn ve 24 μl 1% kyseliny mravenčí.

Příprava stage tipů

Připravila jsem si 2 ml plastové zkumavky (eppendorfký) a do víček udělala díru natolik velkou, aby se tam vešla 200 μl špička, přičemž na jeden vzorek budeme potřebovat eppendorfký dvě. Vyrobita jsem si terčík z hmoty C18 (Metadecyl extraction disk, Supelco, USA) pomocí jehly pomalým kroužením. Vsunula jsem jehlu do 200 μl

špičky a pomocí pístu dala terčik do konce špičky. Špičku jsem dala do připravené eppendorfky a přidala 20 µl čistého metanolu. Eppendorfku jsem vložila do centrifugy na 15 vteřin při 6 000g. Když je po stočení metanol nad terčikem, tak je špička dobře připravená. Opět jsem centrifugovala eppendorfku na 30 vteřin při 6000 g. Přidala jsem 20 µl 50% metanolu a dala stočit na 60 vteřin při 6000 g. Poté jsem přidala 20 µl 2% ACN + 0,1% HCOOH a opět stočila na 60 vteřin při 6 000 g. Přidala jsem 20 µl vzorku a stočila na 60 vteřin při 6000 g. Přidala jsem 20 µl 2% ACN + 0,1% HCOOH a stočila na 60 vteřin při 6000 g. Špičku jsem přendala do čisté eppendorfky. Přidala jsem 20 µl 80% ACN + 0,5% HCOOH a stočila na 60 vteřin při 6 000g a tento krok opakovala 2x. Špičku jsem vyndala, zahodila a vzorek v této druhé eppendorfce zmrazila na -20 °C. Vzorek jsem dala lyofilizovat a po lyofilizaci přidala 20 µl 2% HCOOH a stočila na dobu 3 minut při 10 000 g. Odebrala jsem 18 µl a dala do plastového inzertu.

3.4.3 LC/MS metoda

Následně byly vzorky analyzovány pomocí LC/MS metody na nano HPLC. LC/MS nabízí kombinaci výhod obou technik, přičemž nám dovolí v rámci jedné analýzy separovat a identifikovat komplexní směs, kterou vzorky tkáně postižené *clubfootem* bezesporu jsou.

Analýza tryptického štěpení s LC-MS / MS

Vysušené proteiny byly rozpuštěny v 20µl 0,1% kyseliny mravenčí, zcentrifugovány a supernatant byl přenesen do insertů umístěných v lahvičkách. Nano-HPLC přístrojem, který byl použitý pro proteinovou analýzu byl Proxeon Easy-nLC (Proxeon, Odense, Dánsko), spojený s maxis Q-TOF (kvadrupól-doba letu) hmotnostním spektrometrem s ultra vysokým rozlišením (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) díky nanoelektrospreji.

Nástroje nLC-MS / MS byly řízeny pomocí softwarových programů HyStar 3.2. a microTOF-control 3.0. Údaje byly shromážděny pomocí programů ProteinScape 2.0 a DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics).

Vzorek (5 µl směsi peptidů) byl vstříknut do kolony NS-AC-11-C 18 Biospheric C18 (velikost částic: 5µm, velikosti pórů: 12nm, délka: 150 mm, vnitřní průměr: 75µm), s NS-MP-10 Biosphere C18 předkolonou (velikost částic: 5µm, velikosti pórů: 12nm, délka: 20 mm, vnitřní průměr: 100µm), obě vyráběné firmou NanoSeparations (Nieuwkoop, Nizozemsko).

Separace peptidů bylo dosaženo pomocí lineárního gradientu mezi mobilní fáze A (voda) a B (acetonitril), oba obsahující 0,1% mobilní fáze B. Separace byla zahájena 5 % mobilní fáze B, následovala ji gradientová eluce do 30 % B za 70 minut. Dalším krokem byla gradientová eluce do 50 % B po 10 minutách, pak gradient do 100 % B po 8 minutách. Na závěr byla kolona eluována 100 % B po dobu 2 minut. Kolona byla před dalším měřením ekvilibrována 5 % mobilní fáze B po 10 minut. Průtok byl $0,25 \mu\text{l min}^{-1}$ a teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bylo užito online nanoelektrosprejové ionizace (easy nano-ESI) v pozitivním módu. ESI napětí bylo nastaveno na $+4,5\text{kV}$, doba cyklu $1,3 \text{ Hz}$. Provozní podmínky: sušící plyn (N_2), 1 lmin^{-1} teplota plynu, $160 \text{ }^\circ\text{C}$; tlak, $0,4 \text{ barů}$. Experimenty byly prováděny skenováním od 100 do 2200 m/z. Použitý referenční iont byl iont $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_{36}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}_3$ (m/z 1221.9906).

Vyhledávání v databázi

Data byla zpracována pomocí softwaru ProteinScape (verze 3.0.0.446). Proteiny byly identifikovány porovnáním tandemových hmotnostních spekter s databázemi IPI a Swissprot, přičemž byl použit Mascot vyhledávač (<http://www.matrixscience.com>). Taxonomie bylo omezena na *Homo sapiens*, aby byla odstraněna identifikace nadbytečných proteinů. Jako enzymový parametr byl vybrán trypsin. Pro MS analýzu byla použita počáteční peptidová hmotnostní tolerance $\pm 10 \text{ ppm}$ a pro MS/MS analýzu $\pm 0,05 \text{ Da}$. Byly zadány variabilní modifikace: prolin a lysin hydroxylovány, serin, threonin a tyrosin fosforylovány a methionin oxidován. Proteiny byly uznány jako validní, pokud bylo MASCOT skóre ≥ 80 , peptidy byl uznány jako validní, pokud bylo MASCOT skóre ≥ 20 . Byly uvažovány jedno-až trojnásobně nabitě monoisotopické ionty. Pro odstranění falešně-pozitivních výsledků byl použit peptide Decoy.

Label free kvantifikace

Pro vyhodnocení rozdílů v proteinovém složení L a M strany pomocí label free kvantifikace byl použit program Profile Analysis (verze 2.1, Build 268). Uvažované peptidy musely být nalezeny minimálně v 50% všech vzorků bez ohledu na skupinu a zároveň musely být nalezeny minimálně v jedné z obou skupin (L a M) a rovněž alespoň v 50% případů v rámci skupiny. Pro správné vyhodnocení iontů s podobnými hodnotami m/z a retenčními časy byla zapnuta volba Time Alignment.

Studentův t-test

Pracovali jsme s malým souborem $N = 26$

- Závěry byly provedeny na základě analýzy daného souboru:

$$\bar{x} = 0,6915; \quad s^2 = \frac{1}{n-1} * \sum_{k=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = 0,02426; \quad s = 0,15576$$

- Vzhledem k malému N bylo použito Studentovo rozdělení s $N-1 = 25$ stupni volnosti

Počítám na úrovni $\alpha = 0,05 = 5\%$ „significance level“, $0 < \alpha < 1$

Při zadaném α definuji t^2

$$1 - \int_{-t_2}^{t_2} h_{n-1}(t) dt = \alpha \rightarrow \text{odtud získám } t_\alpha = 2,06$$

- Jestliže jsme spočítali \bar{x} a s na základě našich dat, potom přijmeme hypotézu H_0 jestliže:

$$\left| \frac{\bar{x} - \mu}{s} \right| * \sqrt{N} \geq t_2$$

$$\text{V našem případě: } \left| \frac{0,6915 - \mu}{0,15576} \right| * \sqrt{26} < 2,06$$

- Odtud jsme získali hranice oblasti, ve které platí naše hypotéza:

$$\mu_0 \in (\mu_{\min}, \mu_{\max})$$

kde:

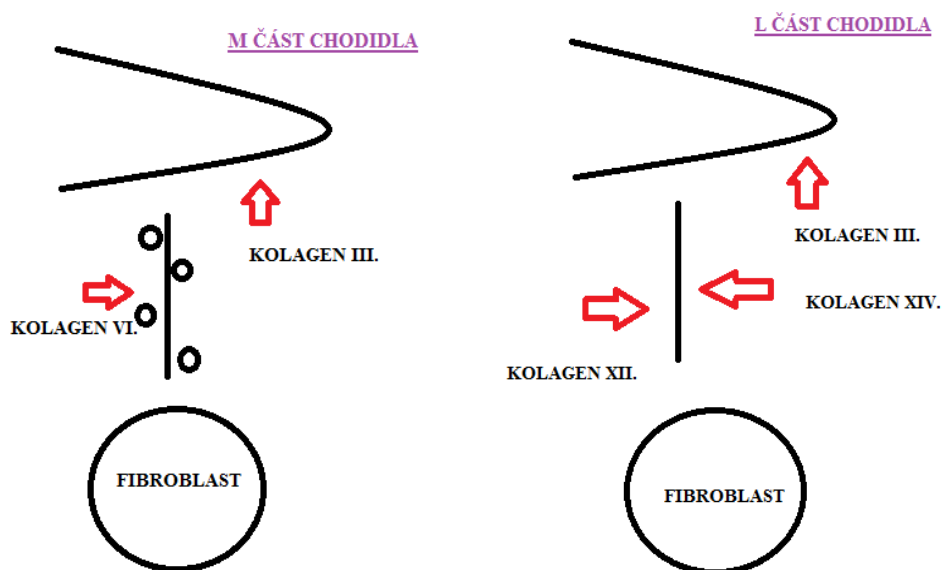
$$\mu_{\min} = \bar{x} - \frac{s}{\sqrt{N}} * t_2 = 0,6915 - \frac{0,1557}{\sqrt{26}} * 2,06 = 0,6286$$

$$\mu_{\max} = \bar{x} + \frac{s}{\sqrt{N}} * t_2 = 0,7545$$

Jestliže platí H_0 (nulová hypotéza), pak poměr $\frac{L}{M} < 1$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Úkolem diplomové práce bylo zjistit, jaké proteiny a v jakém množství se nachází v chodidle dítěte mužského pohlaví postiženém *clubfootem* neboli koňskou nohou. Práce navazuje na článek od Catherine Li et al. (2001), kde bylo zjištěno, že se v postižené M části chodidla nachází více kolagenu III., v porovnání s L částí. Také bylo zjištěno, že tkáň postižená *clubfootem* koreluje s vyšší expresí proteinů TGF-B a PDGF.



Obrázek č. 19: Rozdíl v přítomnosti kolagenů různých typů v části chodidla M a L

4.1. Příprava vzorku a vývoj extrakční metody

Nejprve bylo nutné vyvinout vhodnou metodiku pro přípravu vzorku, vyextrahování bílkovin z tkáně. Prvním krokem bylo opláchnutí vzorku od krevních bílkovin a rozmělnění ho na co nejmenší kusy. Vzorek byl po celou dobu přípravy uchováván v nádobce s ledem, aby byla potlačena degradace proteázami. Vzorek byl následně zlyofilizován, zamražen a byl opláchnut PBS pufrem, aby se odseparovaly bílkoviny krevní plazmy. Následně byl vzorek homogenizován pomocí kleští, které byly použity po zabalení vzorku do alobalu a vložení do tekutého dusíku. Více než kleště se nakonec osvědčilo kladivo, které vzorek lépe rozdrtilo na menší kusy.

Vzorek byl poté podroben metodám, které usnadnily převedení proteinů do roztoku, a následně byl analyzován. K rozrušení proteinových vláken byl použit vortex (1 min), sonikace (15 min) a centrifuga (3 min), přičemž každá metoda měla přesně vyměřený čas.

Po homogenizaci byl vzorek promíchán a rozdělen na vzorek 1 a 2, přičemž na vzorek 1 byla odebrána $\frac{1}{4}$ původního vzorku, zatímco na vzorek 2 byly odebrány $\frac{3}{4}$, to znamená, že následně bylo použito větší množství vzorku 2.

Vzorek 1 byl zlyofilizován a byl k němu přidán lysis buffer. Další příprava vzorku probíhala v eppendorfci s kónickým dnem, a vzorek byl v lysis bufferu třen ručně pomocí paličky po dobu 10 minut, a následně byl zpracován vortexem, sonikací a centrifugací, aby došlo k ještě většímu rozmělnění tkáně.

Bylo zjištěno, že nejlepší výsledky bylo dosaženo u vzorku 1 a 2 (Lysis buffer, oplach redestilovanou vodou), takže následující postupy nebyly u dalších vzorků tkání provedeny. Vzorek 3 (oplach chloroform/MeOH) a vzorek 4 (oplach acetonitrilem) byl původně zamýšlen jako vhodný postup pro odstranění lipidů, ty se ale odstranily již v prvních dvou krocích. Vzhledem k tomu, že je určitá možnost, že by se v krocích 3 a 4 v rámci snahy o odstranění lipidů nechtěně odstranily i proteiny, zvolili se pouze první dva postupy.

4.2. Elektroforetická analýza

a) 1D elektroforéza

Na 1D elektroforézu byly pro každý vzorek použity tyto části:

- L1 (vzorek 1, část L)
- L2 (vzorek 2, část L)
- M1 (vzorek 1, část M)
- M2 (vzorek 2, část M)
- Mopl (vzorek M, oplach)
- Lopl (vzorek L, oplach)

Na každý 1D elektroforetický gel bylo nadávkováno 2 μ l a 6 μ l vzorku. Z výsledného gelu bylo určeno, kolik μ l vzorku bude použito na 2D elektroforézu. V některých případech byla provedena 2D elektroforéza i u oplachů (L i M), když na 1D gelech bylo prokazatelné, že jsou v oplachu přítomny proteiny.

b) 2D elektroforéza

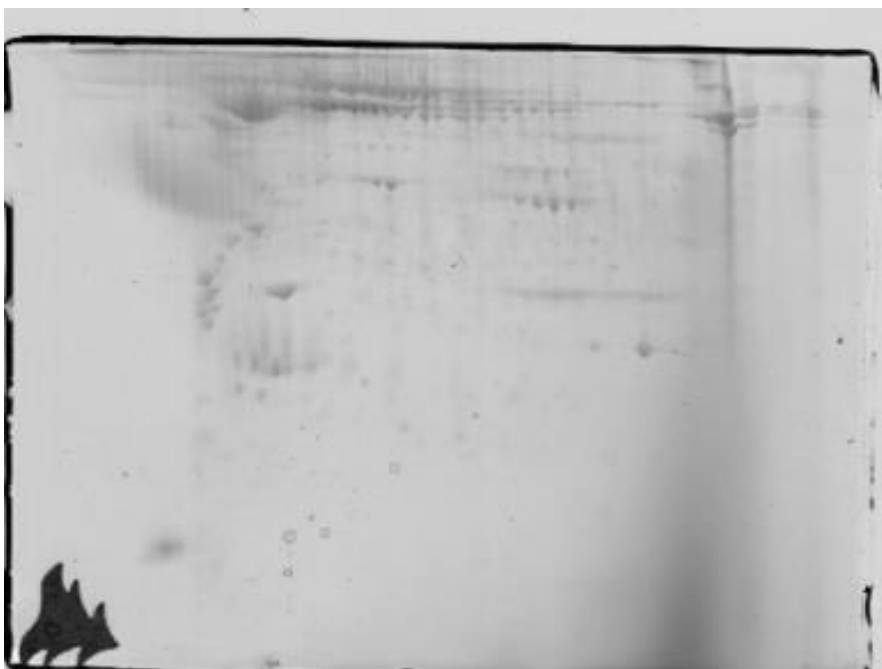
Dávkování vzorku na 2D elektroforézu bylo voleno podle výsledků 1D elektroforézy.

Dávkování všech vzorků bylo následující:

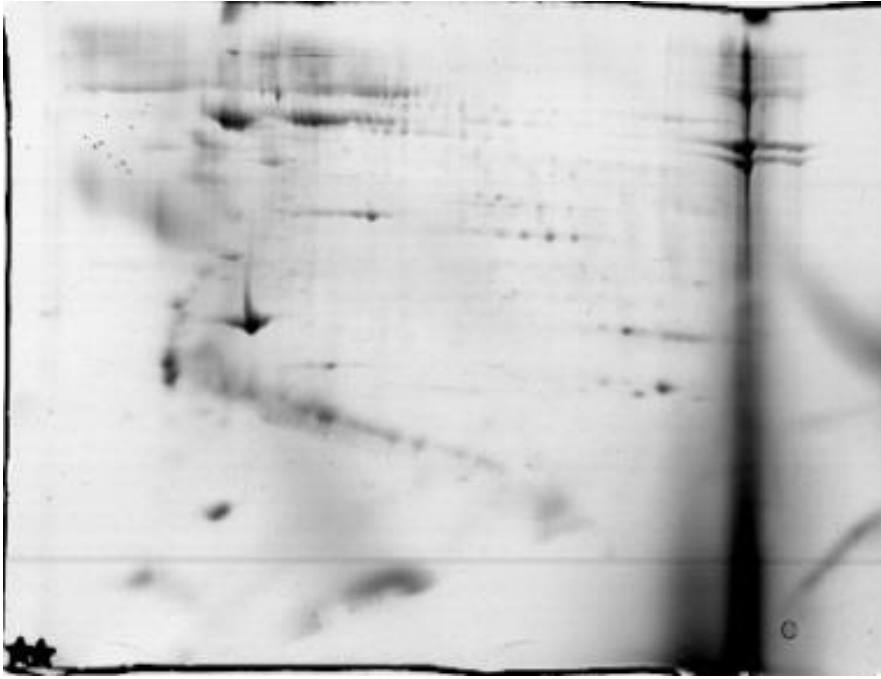
Tabulka číslo 2: Dávkování vzorku a lysis bufferu u všech vzorků

Vzorek	Část vzorku	Dávkování
M	M1	70 µl vzorku + 80 µl LB
	M2	50 µl vzorku + 100 µl LB
	L1	70 µl vzorku + 80 µl LB
	L2	70 µl vzorku + 80 µl LB
R	M1 mt	200 µl vzorku + 0 µl LB
	M2 mt	150 µl vzorku + 0 µl LB
	M1 t	60 µl vzorku + 90 µl LB
	M2 t	80 µl vzorku + 70 µl LB
	L1	120 µl vzorku + 30 µl LB
	L2	200 µl vzorku + 0 µl LB
V	M1	200 µl vzorku + 0 µl LB
	M2	200 µl vzorku + 0 µl LB
	M oplach	200 µl vzorku + 0 µl LB
	L1	200 µl vzorku + 0 µl LB
	L2	200 µl vzorku + 0 µl LB
H	M1	120 µl vzorku + 30 µl LB
	M2	150 µl vzorku + 0 µl LB
	M oplach	150 µl vzorku + 0 µl LB
	L1	60 µl vzorku + 90 µl LB
	L2	125 µl vzorku + 25 µl LB
J	M1	80 µl vzorku + 70 µl LB
	M2	70 µl vzorku + 80 µl LB
	M oplach	150 µl vzorku + 0 µl LB
	L1	60 µl vzorku + 90 µl LB
	L2	90 µl vzorku + 60 µl LB
D	M1	70 µl vzorku + 80 µl LB
	M2	60 µl vzorku + 90 µl LB
	M oplach	200 µl vzorku + 0 µl LB
	L1	100 µl vzorku + 50 µl LB
	L2	80 µl vzorku + 70 µl LB
	L oplach	200 µl vzorku + 0 µl LB

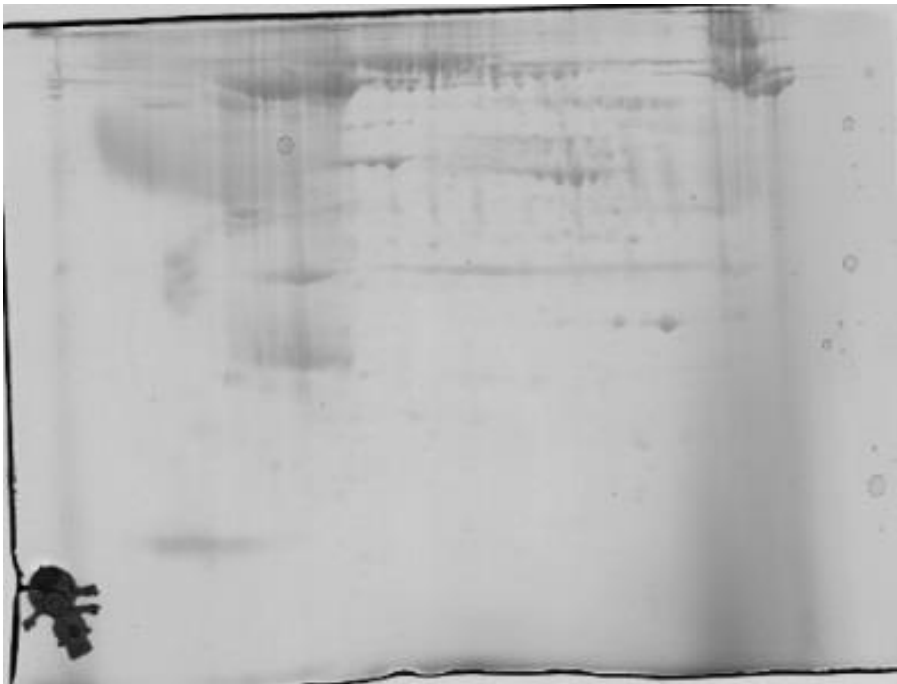
Po kompletaci všech 2D gelů byly hledány programem PDQuest signifikantní změny mezi jednotlivými pokusnými skupinami, které ale nebyly nalezeny, a z tohoto důvodu nemělo smysl identifikovat jednotlivé skvrny (proteiny) pomocí hmotnostní spektrometrie. Je pravděpodobné, že důvodem toho, že nebyly zjištěny signifikantní rozdíly je nevhodnost vzorků tkání postižených *clubfootem* pro tuto analýzu, a to zejména kvůli nedostatečnému rozvolnění kolagenových vláken, jehož se nedosáhlo ani během původně pěti kroků extrakce, ani při snaze rozmělnit tkáň hrubou silou pomocí tyčinky ani při automatizovaných krocích, jako byla sonikace, vortexování či centrifugace.



1



2



3



4



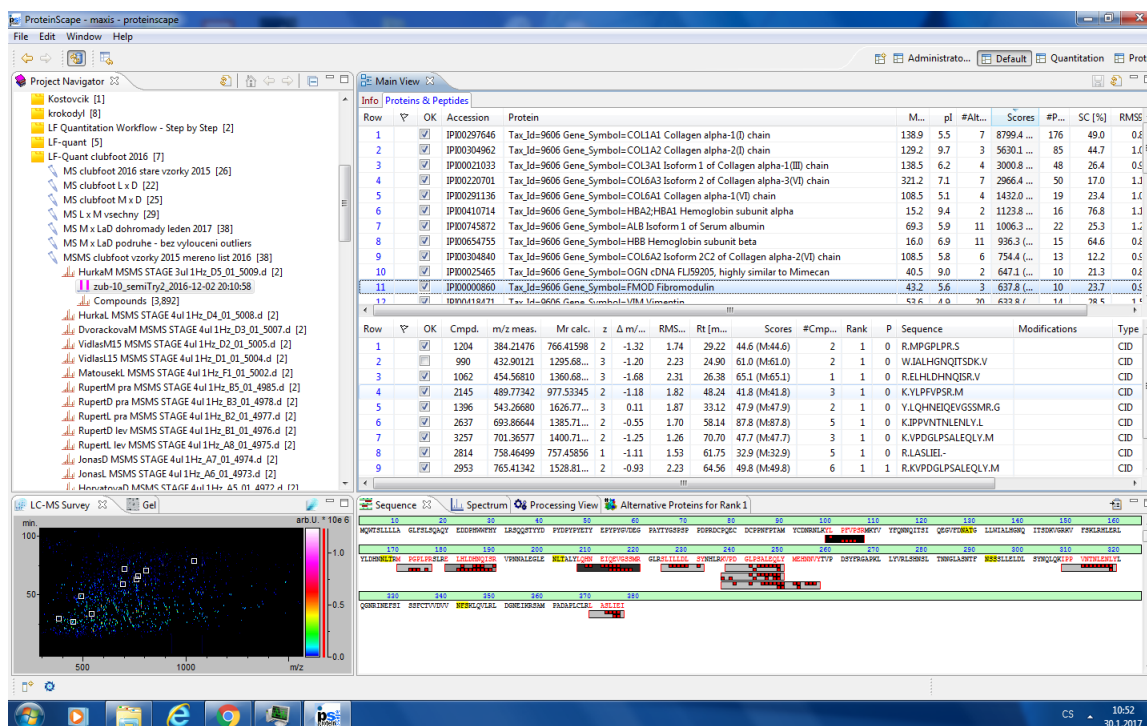
5

Obrázek číslo 21. 1- vzorek 1 z dítěte D, přidáno 300 μ l lysis bufferu, 2- vzorek 2 z dítěte D, oplach v 1,5 ml redestilované vody, 3- vzorek 3 z dítěte D, oplach v 1,5 ml chloroform/MeOH (2:1, v/v), 4- vzorek 4 z dítěte D, oplach v 1,5 ml acetonitrilu, 5- oplach dítěte D redestilovanou vodou.

4.3 Analýza pomocí spojení kapalinové chromatografie hmotnostní a spektrometrie

V dalším postupu byly analyzovány tryptické štěpy tkání pomocí nanokapalinové chromatografie (nLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu Q-TOF. Proteiny byly identifikovány za pomoci softwaru Data Analysis a ProteinScape 2.0. Proteiny byly rozpoznány na základě shody MS/MS spekter s databázemi proteinů za pomoci serveru MASCOT. Program ProteinScape nás informuje o názvu proteinu, relativní molekulové hmotnosti, hodnotě isoelektrického bodu, a také takzvané Mascot skóre daného proteinu na základě srovnání s proteiny obsaženými v databázi. Čím je vyšší Mascot skóre proteinu, tím vyšší je pravděpodobnost shody s identifikovaným proteinem. Zjednodušeně řečeno, aby byl protein uznán jako validní, musí mít skóre alespoň 80.

Bylo analyzováno proteomické složení 6 vzorků, u kterých byla určena signifikance stanovením peptidové pokrytí proteinů nalezených v analyzovaných tkáních. Nalezli jsme desítky proteinů v M i v L části chodidla, z nichž je v tabulkách 3 a 4 uvedeno dvacet nejvýznamnějších.



Obrázek číslo 22: Program protein Scape, Sekvence Fibromodulinu

Tabulka číslo 3: Výběr 20 nejvýznamnějších proteinů obsažených v L části chodidla

Accession	Protein	MW [kDa]	pI	Scores	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	20151.9 (M:20151.9)	55.8
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	9.7	11157.9 (M:11157.9)	55.9
IPI00220701	COL6A3 Isoform 2 of Collagen alpha-3(VI) chain	321.2	7.1	6206.5 (M:6206.5)	33.2
IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	6112.5 (M:6112.5)	34.5
IPI00748487	COL2A1 Isoform 3 of Collagen alpha-1(II) chain	134.2	9.5	5654.8 (M:5654.8)	51.6
IPI00176193	COL14A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIV) chain	193.4	5.0	2931.1 (M:2931.1)	31.2
IPI00291136	COL6A1 Collagen alpha-1(VI) chain	108.5	5.1	1963.3 (M:1963.3)	33.4
IPI00304840	COL6A2 Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain	108.5	5.8	1611.2 (M:1611.2)	26.1
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	5.9	1545.5 (M:1545.5)	34.3
IPI00418471	VIM Vimentin	53.6	4.9	1325.5 (M:1325.5)	45.5
IPI00302944	COL12A1 Isoform 4 of Collagen alpha-1(XII) chain	324.4	5.2	1250.0 (M:1250.0)	11.8
IPI00025465	OGN cDNA FLJ59205, highly similar to Mimecan	40.5	9.0	1039.2 (M:1039.2)	23.3
IPI00000860	FMOD Fibromodulin	43.2	5.6	1023.2 (M:1023.2)	34.3
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	900.0 (M:900.0)	73.2
IPI00844090	COL5A1 Collagen alpha-1(V) chain	183.4	4.8	866.2 (M:866.2)	13.8
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	825.8 (M:825.8)	67.3
IPI00020986	LUM Lumican	38.4	6.2	807.4 (M:807.4)	36.1
IPI00965868	TGFBI Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa variant (Fragment)	74.6	8.6	791.5 (M:791.5)	29.7
IPI00980755	PRELP PRELP protein (Fragment)	43.8	10.2	711.5 (M:711.5)	29.3
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	707.9 (M:707.9)	36.5

Tabulka číslo 4: Výběr 20 nejvýznamnějších proteinů obsažených v M části chodidla

Accession	Protein	MW [kDa]	pI	Scores	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	18016.5 (M:18016.5)	55.4
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	9.7	10704.8 (M:10704.8)	52.6
IPI00220701	COL6A3 Isoform 2 of Collagen alpha-3(VI) chain	321.2	7.1	5753.8 (M:5753.8)	31.2
IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	5476.9 (M:5476.9)	32.9
IPI00291136	COL6A1 Collagen alpha-1(VI) chain	108.5	5.1	2178.5 (M:2178.5)	33.0
IPI00304840	COL6A2 Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain	108.5	5.8	1631.0 (M:1631.0)	23.8
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	5.9	1548.2 (M:1548.2)	28.6
IPI00176193	COL14A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(XIV) chain	193.4	5.0	1459.9 (M:1459.9)	18.3
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	1280.8 (M:1280.8)	76.8
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	1042.5 (M:1042.5)	67.3
IPI00844090	COL5A1 Collagen alpha-1(V) chain	183.4	4.8	963.9 (M:963.9)	15.3
IPI00418471	VIM Vimentin	53.6	4.9	938.7 (M:938.7)	35.8
IPI00000860	FMOD Fibromodulin	43.2	5.6	931.0 (M:931.0)	38.3
IPI00980755	PRELP PRELP protein (Fragment)	43.8	10.2	927.3 (M:927.3)	35.1
IPI00025465	OGN cDNA FLJ59205, highly similar to Mimecan	40.5	9.0	862.4 (M:862.4)	23.3
IPI00965868	TGFBI Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa variant (Fragment)	74.6	8.6	791.9 (M:791.9)	20.6
IPI00020986	LUM Lumican	38.4	6.2	689.7 (M:689.7)	33.1
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	687.4 (M:687.4)	38.4
IPI00339224	FN1 Isoform 4 of Fibronectin	222.8	5.4	675.4 (M:675.4)	9.8
IPI00012119	DCN Isoform A of Decorin	39.7	9.5	629.7 (M:629.7)	26.7

Label free kvantifikace

Pro vyhodnocení rozdílů v proteinovém složení L a M strany pomocí label free kvantifikace byl použit program Profile Analysis. Uvažované peptidy musely být nalezeny minimálně v 50% všech vzorků bez ohledu na skupinu a zároveň musely být nalezeny minimálně v jedné z obou skupin (L a M) rovněž alespoň v 50% případů v rámci skupiny.

Dále byly stanoveny signifikantní proteiny pro L a M stranu pomocí label free kvantifikace. Statistická významnost byla stanovena pomocí Studentova T-testu, z jehož matematického vyjádření jsme vycházeli. Kvantitativní rozdíly mezi analyzovanými skupinami byly považovány za statisticky významné, pokud platilo, že $p < 0,05$.

Tabulka číslo 5: Proteiny signifikantní pro M stranu

Protein	Signifikance
Asporin	0,003
Colagen III.	0,0005
Colagen VI	0,0001
Colagen V.	0,002
Decorin	0,002
Hemoglobin alfa	0,0001
Hemoglobin beta	0,00015
Tenascin	0,003
TGFB	0,0021
Apolipoprotein A	0,011
IGHV4-31	0,017
Prolagrin	0,049

Tabulka číslo 6: Proteiny signifikantní pro L stranu

Protein	Signifikance
Cartilage intermediate layer protein 2 precursor	0,0051
Colagen XIV.	0,0017
Colagen XII.	0,0001
Fibromodulin	0,0001
Fibronectin	0,06
Cartilage o. matrix protein	0,08

K vyhledání jednotlivých proteinů a popisu jejich funkcí bylo užito databáze Uniprot. Do vyhledávače byla zadána zkratka daného proteinu, a jako organismus byl vybrán *Homo sapiens (human)*.

Při analýze skupiny vzorků tkání postižených *clubfootem* bylo zjištěno, že se v méně namáhané L části chodidla nachází kolagen II a XII, který se nenachází ve více namáhané M části chodidla. Kolagen II se vyskytuje v buněčné hmotě chrupavky. Defekt tohoto kolagenu může vést až k poruše zvané kolagenopatie, která má vliv na pojivové

tkáně. Kolagen XII se vyskytuje společně s kolageny I a II. Je lokalizován v oblastech, kde osteoblasty aktivně vylučují kostní matrix, tudíž v místech, kde dochází k tvorbě kostí. Kromě těchto dvou proteinů, které se v M části nevyskytují, byl také nalezen kolagen I, kterého je v L části více a kolagen III, kterého je více v M části chodidla.

Kolagen I je nejhojněji zastoupený kolagen v lidském těle. Je přítomen ve šlachách, kůži, stěnách tepen a ve zjizvené tkáni. Jeho přítomnost v poškozené tkáni je tedy zcela relevantní. Kolagen III je produkován mladými fibroblasty předtím, než se kolagen I, který je tvrdší, syntetizuje. Také bylo v L části chodidla nalezeno více fibromodulinu, lumicanu a mimecanu (OGN).

Fibromodulin se podílí na hromadění kolagenových vláken v extracelulární matrix a reguluje aktivitu TGF β . Lumican se podílí na organizaci kolageních fibril a reparaci tkání. Mimecan indukuje tvorbu kosti ve spojení s TGF β 1 nebo TGF β 2.

V M části chodidla se nachází vimentin a fibronectin, který se v laterální části nenachází. Vimentin je protein nacházející se ve filamentech fibroblastů. Fibronectin hraje roli v reparaci tkání a někdy slouží jako adhezní molekula pro ukotvení buňky na kolagen. V M části bylo také nalezeno více hemoglobinu, což může být způsobeno nejen nedostatečným oplachem, ale i tím, že se v této části nachází přirozeně více cév, a je tedy více prokrvená než laterální část.

Oproti L části chodidla bylo v M části nalezeno více kolagenu typu VI, který je hlavní strukturální složkou mikrovláken.

Proteiny signifikantní pro M stranu:

Proteiny uvedené v tabulce číslo 5.

- **Asporin (ASPN)**

Reguluje mineralizaci a diferenciaci periodontálního ligamentu (PDL) a TGF β v kloubní chrupavce. Hraje zásadní roli v chrupavkové homeostáze a patogenezi osteoartrózy. Negativně reguluje chondrogenezi v kloubní chrupavce tím, že blokuje interakci TGF β a receptoru na povrchu buněk. Váže vápník a podílí se na aktivitě kolagenové biomineralizace.

- **Kolagen III (COL III)**

Kolagen typu III se vyskytuje ve většině měkkých pojivových tkáních spolu s kolagenem typu I. Podílí se na regulaci vývoje cortexu. Je hlavním ligandem ADGRG1 ve vývoji mozku a inhibuje neuronální migraci.

- **Kolagen VI (COL VI)**

Kolagen VI působí jako protein buněčné vazby.

- **Kolagen V (COL V)**

Kolagen typu V je minoritní složkou pojivové tkáně. Váže se na DNA, heparansulfát, trombospondin, heparin a inzulin.

- **Decorin (DCN)**

Má vliv na rychlost tvorby fibril.

- **Hemoglobin α (HBA)**

Podílí se na transportu kyslíku z plic do periferních tkání.

- **Hemoglobin β (HBB)**

Podílí se na transportu kyslíku z plic do periferních tkání. LVV-hemorfin-7 potencuje aktivitu bradykininu, což způsobuje pokles krevního tlaku.

- **Tenascin (TNC)**

EC protein podílející se na vedení migrujících neuronů, stejně tak jako axonů, v průběhu vývoje. Podílí se na synaptické plasticitě a neurální regeneraci. Podporuje růst neuritů z kortikálních neuronů. Je ligandem pro integrin alfa-8 / beta-1.

- **Transforming growth factor β (TGF β)**

Multifunkční protein, který řídí proliferaci, diferenciaci a další funkce v mnoha typech buněk. Mnoho buněk syntetizuje TGF β 1 a mají pro něj specifické receptory. To pozitivně i negativně reguluje mnoho dalších růstových faktorů. Hraje důležitou roli v remodelaci kosti, protože je silným stimulatorem tvorby osteoblastické kosti, což způsobuje chemotaxi, proliferaci a diferenciaci v osteoblastech. Stimuluje produkci kolagenu prostřednictvím aktivace CREB3L1.

- **Apolipoprotein A (APO A)**

Podílí se na reverzním transportu cholesterolu z tkání do jater. Působí jako kofaktor pro lecitincholesterolacyltransferázu (LCAT) a uvolňuje cholesterol z tkání.

- **Imunoglobulinový těžký proměnlivý faktor (IGHV4)**

Oblast variabilní domény imunoglobulinu těžkého řetězce, která se podílí na rozpoznání antigenu. Imunoglobuliny, známé také jako protilátky, jsou vázané na membránu nebo sekretované glykoproteiny, které produkují B lymfocyty.

- **Prolargin (PRELP)**

Kotví bazální membrány k základní pojivové tkáni.

Proteiny signifikantní pro L stranu:

Proteiny uvedené v tabulce číslo 6.

- **Cartilage intermediate layer protein (CILP)**

Hraje roli ve výstavbě chrupavky. Může působit antagonizací funkcí TGF-Beta1 (TGFB1) a IGF1. Má schopnost potlačit IGF1-indukovanou proliferaci a inhibuje ligandem indukovanou autofosforylaci IGF1R. Může inhibovat TGFB1 zprostředkovanou indukci genů matrix chrupavky prostřednictvím interakce s TGFB1. Zvýšená exprese může vést ke zhoršení růstu chondrocytů a reparace matrix.

- **Kolagen XIV (COL XIV)**

Hraje adhezivní roli při integraci kolagenových svazků.

- **Kolagen XII (COL XII)**

Kolagen XII interaguje s kolagenem I, obsahujícím vlákna. Doména COL1 je spojena s povrchem vláken a COL2 a NC3 domény jsou lokalizovány v perifibrilární matrix.

- **Fibromodulin (FMOD)**

Ovlivňuje rychlost tvorby fibril. Má hlavní roli ve fibrilogenezi kolagenu.

- **Fibronectin (FN)**

Fibronectin váže buněčné povrchy a různé sloučeniny, včetně kolagenu, fibrinu, heparinu, DNA a aktinu. Fibronectin je zapojen do buněčné adheze, pohyblivosti buněk, opsonizace, hojení ran, a udržování tvaru buňky. Podílí se na zhutnění osteoblastů prostřednictvím buňkami zprostředkované fibronektinové fibrilogeneze.

- **Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)**

Hraje roli ve strukturální integritě chrupavky přes její interakce s jinými EC proteiny, jako jsou kolageny nebo fibronectin. Může zprostředkovat interakci chondrocytů s EC chrupavkou. Má vliv na patogenezi osteoartrózy.

5 ZÁVĚR

Pes equinovarus neboli *clubfoot* je jednou z nejznámějších a nejčastějších deformit dolních končetin, vyskytujících se v ortopedii. Ačkoliv byly v průběhu let vyvinuty způsoby, jak deformitu korigovat až skoro do úplného uzdravení, neřeší to podstatu nemoci. Vzhledem k velmi častému výskytu této choroby se na ní v současnosti upíná čím dál více pozornosti. Ačkoliv se nejedná o fatální onemocnění, ale pouze o vrozenou deformitu, která se dá do určité míry napravit pomocí chirurgického zákroku nebo sádrování, není léčba *clubfootu* snadnou a nebolestivou záležitostí.

V této práci nepohlížíme na nemoc z genetického hlediska, nýbrž z toho proteomického a hledáme spojitost mezi mírou zastoupení určitých proteinů a závažností deformity.

Po poměrně hladkém začátku, během kterého jsme vybírali nejlepší možnost, jak vyextrahovat proteiny, přišly problémy až během vyhodnocování gelů 2D elektroforézy. Vzhledem k velkému množství kolagenu jsme nebyli schopni tkáň dostatečně rozmělnit, a v programu ProteinScape jsme nebyli schopni určit signifikantní body. Standartním postupem po 2D elektroforéze je vyřezávání spotů z gelů, který jsme však nemohli použít. Museli jsme si tedy vystačit s informacemi, které jsme získali během analýzy tkáně v hmotnostním spektrometru.

Při další analýze by bylo vhodné soustředit se na metody, které umožní ještě lepší rozmělnění tkáně a uvolnění proteinů. V budoucnu by se výzkum mohl zaměřit na sběr dat z mnohem většího počtu vzorků a na srovnání nejen jednoho pohlaví, nýbrž i na rozdíly mezi dívkami a chlapci. Také by bylo ku prospěchu získat vzorek zdravé tkáně dětského chodidla, tzv. „blanku“, ke kterému by se výzkum mohl vztahovat. Patrně však nebude možné získat tkáň od zdravého jedince, takže jedinou možností by bylo chirurgické odejmutí tkáně během pitvy. Nasnadě by bylo spojit proteomický výzkum i s výzkumem zabývajícím se genetickou podstatou vzniku této choroby.

6 PŘÍLOHY

Informovaný souhlas

Pacient:

Rodné číslo:

Vážená paní, vážený pane,

jste léčen na Ortopedické klinice v Nemocnici Na Bulovce s onemocněním *pes equinovarus*. Nabízíme Vám možnost účastnit se vědecké studie „Korelativní přístup k poruchám mezibuněčné hmoty: od proteinů k tkáňovým strukturám u idiopatického onemocnění *pes equinovarus*“, jejímž cílem je sledovat a hlouběji analyzovat průběh onemocnění *pes equinovarus*, což by mělo v budoucnu sloužit k správnému pochopení jejich vzniku. Ze zdravotnické dokumentace vedené na tomto pracovišti budou rovněž získány některé základní údaje týkající se Vaší léčby, vyšetření a případných onemocnění v souvislosti s Vaším onemocněním. Vaše účast projektu, pokud se pro ni rozhodnete, je zcela dobrovolná. Ze studie rovněž můžete kdykoliv vystoupit a toto rozhodnutí nebude mít vliv na Vám poskytovanou péči. Výhodou účasti ve studii je, že některé laboratorní výsledky budou okamžitě dostupné Vašemu ošetřujícímu lékaři, což slouží k lepšímu sledování vývoje nemoci, pro kterou jste hospitalizován(a). Projekt byl schválen Etickou komisí Nemocnice Na Bulovce.

Prosíme Vás o souhlas s vyšetřením fibrotické tkáně která bude odebrána v rámci Vašeho operačního výkonu ošetření na klinice. Vzorky nebudou použity k jinému výzkumu a po vyšetření sledovaných laboratorních ukazatelů budou zlikvidovány. V žádném případě nebude testován Váš genetický materiál (DNA či RNA).

Vzorky budou zcela anonymizovány; zkumavka s krví bude označena pouze kódem, nikoliv jménem či jiným identifikátorem.

Pokud výsledky studie budou publikovány, Vaše údaje budou zcela anonymizovány a konkrétní osobu nebude možné na základě zveřejněných výsledků dohledat.

Datum, jméno a podpis lékaře

Potvrzuji tímto, že jsem byl(a) informován(a) o podmínkách výzkumné studie a že jsem se dobrovolně rozhodl(a) pro účast na tomto projektu. Informace mi byly vysvětleny a rozumím podstatě i účelu projektu. Měl jsem možnost klást dotazy a tyto mi byly přiměřeně zodpovězeny.

Datum, jméno a podpis pacienta

Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopisech, které mají platnost originálu. Jeden bude uchován v pacientově dokumentaci, a to po dobu upravenou právním předpisem pro uchovávání zdravotnické dokumentace a druhý obdrží pacient.

7 LITERÁRNÍ ZDROJE

- ANAND, A. SALA, D. [online] Clubfoot: Etiology and treatment, NCBI, 2008.
[cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759597/>
- BACINO, CA., HECHT TJ., Etiopathogenesis of equinovarus foot malformations, Elsevier, str. 473-475, 2014
- BIORAD.COM. [online]. 2D electrophoresis, 2017 [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/2-d-electrophoresis>
- BRUNELLE J., GREEN R. [online]. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE), Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 2014. [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24674069>
- CLUBFOOT CHRONICLES, [online]. The saga begins, 2014. [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <http://clubfootchronicles.blogspot.cz/2013/08/the-saga-begins.html>
- COOKE S. J., BALAIN B., KERIN C. C., KIELY T. N., Clubfoot, Current Orthopaedics 22, str 139 – 149, 2008
- CORRELL J., BERGER N., Kindliche Fußfehlformen Grenzen des Normalen – Behandlung des Pathologischen, Orthopädische Kinderklinik, Aschau im Chiemgau, str. 1523, 2004
- DERZSI Z., GOZAR H., GURZU S., PRISCA R., NAGY O., Congenital Clubfoot in Children After Walking Age: Management and Evaluation of 41 feet with the Dimeglio Score, 2013
- DICTIONARY, [online]. Electrophoresis, 2016. [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <http://www.dictionary.com/browse/electrophoresis?s=t>
- DESAI L., OPRESCU F., DIMEO A., MORCUENDE J., Bracing in the treatment of children with clubfoot: past, present and future, Journal list, Iowa orthopaedic journal, 2010
- DIMEGLIO A., BENSACHEL H., SOUCHET P., MAZEAU P, BONNET F., Classification of clubfoot., *Pediatr orthopaedic journal*, 1995
- DOBBS M., MORCUENDE J., GURNETT C. Treatment of Idiopathic Clubfoot - An Historical Review. *University of Iowa*, 2000

DUNGL P., et kol., Ortopedie, ISBN: 978-80-247-4357-8, 1192 stran, Nakladatelství Grada, str 325, 2014

DYER P.J., Davis N. The role of the Pirani scoring system in the management of club foot by the Ponseti method, 2006

ELLIS H. A history of surgery, ISBN 1841100234, Greenwich Medical Media, 282 stran, strana 153, 2000

EMORY COLLEGE, Mass spektrometry centre, 2016, dostupné z:
<http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>

FARELL, S., SUMMERS AM., DALLAIRE L., SINGER J, JOHNSON JA, WILSON RD., Clubfoot, an adverse outcome of early amniocentesis: disruption or deformation, Journal of Medical genetics, 1999

FAULKS, S. RICHARDS S., Clubfoot Treatment: Ponseti and French Functional Methods are Equally Effective, Clinical Orthopaedics and related research, 2009

FOSTER, A., DAVIS N. Congenital talipes equinovarus (clubfoot), Surgery journal, str.171-172, 2007

GÖRG, A., OBERMAIER, CH., BOGUTH G, HARDER A, SCHEIBE B, WILDGRUBER R, WEISS W., The current state of two –dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, Electrophoresis, 2000

GROSS, H., J. Mass spektrometry, A textbook, Springer Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-642-07388-5, 2004, str. 331

HOFFMAN E., STROOBANT V., Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition, ISBN : 978-0-470-03310-4, str. 2, 2007

HOLČAPEK M, [online]. Hmotnostní spektrometrie, 2016, [cit. 2016-03-10]. Dostupné z:
http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf

HULME A., [online]. The management of congenital talipes equinovarus, 2005, [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263225>

CHEM GUIDE, [online]. Mass spektrometer, 2015, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z:
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html>

CHOMIAK J., FRYDRYCHOVÁ M., OŠŤÁDAL, MATĚJÍČEK M., [online]. The Ponseti method of treatment of congenital clubfoot – first experiences, 2009, [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <http://www.achot.cz/detail.php?stat=278>

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY LIBRARY, Chapter 6 Photoionization detector, 2009, Elsevier Science Publishers, str. 73

KECK MEDICINE, [online]. Clubfoot, University of Southern California, 2015, [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: <http://keckmedicine.adam.com/content.aspx?productId=117&pid=1&gid=001228>

LI C, NGUYEN Q., COLE W., ALMAN B., Potential treatment for clubfoot based on growth factor blockade, str 375-376, 2001

LOVELL M., MORCUENDE A. J. Neuromuscular Disease as the Cause of Late Clubfoot Relapses, Iowa Orthopaedic journal, str. 123, 2007

MACNICOL F., MURRAY A., Changing concepts in the management of congenital talipes equinovarus, Symposium: surgery & orthopaedics, str. 273, 2008

MAGDELDIN S., ZHANG Y., XU B., YOSHIDA Y., YAMAMOTO T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis—a practical perspective, Intech, str. 7-8, 2012

MASS SPECTROMETRY, [online]. © 2016, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry.html>

MIEDZYBRODZKA Z., [online]. Congenital talipes equinovarus (clubfoot): a disorder of the foot but not the hand, University of Aberdeen, 2003, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1571059/>

NORDIN S., AIDURA M., RAZAK S., [online]. Controversies in Congenital Clubfoot : Literature Review, The Malaysian journal of Medical Sciences, 2002, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436098/>

OŠŤÁDAL M., ECKHARDT A., HERGET J., MIKŠÍK I., DUNGL P., CHOMIAK J., FRYDRYCHOVÁ M., BURIAN M. Proteomic analysis of the extracellular matrix in idiopathic pes equinovarus, str. 134-135, 2015

PARTICLE SCIENCES, [online]. Mass spektrometry in Bioanalysis, 2009, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/mass-spectrometry-bioanalysis.html>

PITT J JAMES, [online]. Principles and applications of liquid chromatography –mass spektrometry in clinical biochemistry, The clinical biochemist review, 2009, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>

PULAK, S, SWAMMY MKS, [online]. Treatment of Idiopathic Clubfoot by Ponseti Technique of Manipulation And Serial Plaster Casting and Its Critical Evaluation, NCBI,

2012, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407829/>

SIGMA-ALDRICH, [online]. Custom DNA oligos – QC analysis by mass spektrometry, 2017, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/custom-dna-oligos-qc-analysis-by-mass-spectrometry.html>

TERRAZAS – LAFARGUE G., MORCUENDE J. Effect of Cast Removal Timing in the Correction of Idiopathic Clubfoot by the Ponseti Method, Iowa orthopaedic journal, srov. 24, 2007

THERMOFISHER SCIENTIFIC, [online]. Overview of protein electrophoresis, 2002, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html>

UNIVERSITY OF PITTSBURGH, [online]. Mass spektrometry introduction, 2016, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/mass-spectrometry-introduction>

WINDISCH, G., ANDERHUBER F., EXNER G. [online]. Anatomical study for an update comprehension of clubfoot. Part I: Bones and joints, Basic science, 2007, [cit. 2017-01-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656697/>

YOUNGQUIST, P. Monstrosities: Bodies and British Romanticism, Minnesota press, ISBN: 978-0816639793, str. 152, 2003