

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině
Studijní obor: Experimentální chirurgie



PES EQUINOVARUS:

NOVÉ LÉČEBNÉ POSTUPY A PATOGENETICKÉ MECHANIZMY

MUDr. Martin Ošťádal
Ortopedická klinika Nemocnice Na Bulovce

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Jan Herget, DrSc
Školitel konzultant: Doc.MUDr. Jiří Chomiak, CSc

Praha, 2015

Prohlášení:

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

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

V Praze dne 31.3. 2015

Identifikační záznam:

OŠTÁDAL Martin. Pes equinovarus: nové léčebné postupy a patogenetické mechanizmy (Pes equinovarus: new treatment strategies and pathogenetic mechanisms).
Disertační práce (PhD). Praha, 2015, 70 stran, 3 přílohy. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta. Ortopedická klinika 1. LF UK. Školitel Prof. MUDr. Jan Herget, DrSc, školitel konsultant Doc.MUDr.Jiří Chomiak, CSc.

Klíčová slova:

pes equinovarus, konzervativní léčba, chirurgická léčba, patogenetické mechanizmy, recidivy, vazivová tkáň, kolagenní bílkoviny, růstové faktory, proteomická analýza

Key words:

Clubfoot, conservative treatment, surgical treatment, pathogenetic mechanisms, relapses, connective tissue, collagenous proteins, growth factors, proteomic analysis

Poděkování:

Rád bych poděkoval především svému školiteli, prof. MUDr. Janu Hergetovi, DrSc za odborné vedení a mnoho cenných rad v průběhu studia a při sepisování disertační práce. Můj dík patří rovněž prof. MUDr. Pavlu Dunglovi, DrSc, přednostovi Ortopedické kliniky nemocnice Na Bulovce, který mne odborně vedl od mých medicínských začátků a po celou dobu práce mne všemožně podporoval.

Vřelý dík patří rovněž mým klinickým i experimentálním spolupracovníkům, bez jejichž rad a pomoci by práce nespátřila světlo světa. Jsou to především Dr. Adam Eckhardt PhD z Fyziologického ústavu AV ČR, můj konsultant doc. MUDr. Jiří Chomiak CSc a další lékaři z Ortopedické kliniky a Doc. Dr. Jana Novotná, PhD, z Ústavu biochemie 2. lékařské fakulty UK.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své manželce za trvalou podporu a převzetí řady rodičovských povinností.

SOUHRN

Pes equinovarus congenitus (PEC) je složitá deformita nohy, složená z pěti hlavních komponent, které mohou v různé míře převažovat. Jsou to equinozita v hlezenním kloubu, inverze přednoží, varozita paty, exkavace (vyklenutí střední části nohy) a addukce přednoží. Pro léčbu PEC jsou užívány v podstatě dvě metody: fyzioterapie a postupné cvičení bez imobilizace a Ponsetiho metoda (sádrování, tenotomie Achillovy šlachy, transposice m. tibialis ant.). V literatuře se uvádí, že tato metoda má krátkodobý úspěch v impozantních 100%, podobně vysoce úspěšné mají být i výsledky dlouhodobé. Sami se však domníváme, že údaje o úspěšnosti mohou být významně ovlivněny dobou, která uplyne od ukončení léčby. Naším prvním cílem bylo proto srovnat krátkodobé (do 3 let) a dlouhodobé (3-7 let) výsledky léčby PEC Ponsetiho metodou a určit faktory, které se podílejí na vzniku recidiv. Testovali jsme tak hypotézu, zda lze léčit všechny recidivy PEC u starších dětí výlučně Ponsetiho metodou. Zjistili jsme významný rozdíl mezi hodnocením krátkodobých a dlouhodobých výsledků: počet recidiv v průběhu prvních tří let léčby, indikovaných pro chirurgický zásah, byl významně nižší (5%) ve srovnání s pacienty, u nichž léčba začala před 6 – 8 lety (65%). K vysvětlení tohoto nálezu je zapotřebí – zvláště pro nejstarší skupinu – vzít v úvahu „learning curve“. Na druhé straně výsledky z r. 2007 a pozdější byly významně lepší: počet recidiv dosáhl pouze 44%. Primární korekce PEC je tedy možná u téměř 100% pacientů, avšak pro korekci recidiv je třeba v některých případech použít chirurgický přístup. Na základě vlastních zkušeností jsme dospěli k závěru, že kromě nedostatečné compliance ze strany rodičů je hlavním rizikovým faktorem čas: u dětí starších 3 let není možno recidivy léčit pouze Ponsetiho metodou ale je nutno přistoupit k operační léčbě; potvrdili jsme tak naši vstupní hypotézu. Při operačním zákroku jsme pozorovali, že struktura vazivové tkáně kloubního pouzdra a příslušných ligament se již makroskopicky výrazně liší: na mediální straně je kloubní pouzdro rigidnější než na laterální straně tarsu. Tento nález podporuje hypotézu, že patogenetické mechanismy, odpovědné za vznik PEC, zahrnují vazivovou tkáň, především fibroblasty a růstové faktory. Pro pochopení bílkovinného složení extracelulární matrix jsme v druhé části práce použili proteomickou analýzu vazivové tkáně u pacientů s PEC. Hlavním výsledkem naší studie je originální pozorování, že extracelulární matrix u PEC je složena – kromě již popsaných kolagenů I a III a TGF β – z dalších 16 proteinů, včetně kolagenů V, VI a XII. Proteomická analýza vzorků z mediální a laterální části kloubního pouzdra naznačila rozdíly v proteinovém složení obou vzorků: obsah kolagenu VI, asporinu, mimecanu, prolaminu a TGF β byla větší v mediální, tužší části kloubního pouzdra. Potvrdili

jsme tak hypotézu, že bílkovinné složení extracelulární matrix může hrát významnou roli v patogeneze vzniku PEC. Analýza mechanismů, které regulují remodelaci extracelulární matrix a vznik kontraktur mohou mít značný význam pro pochopení biologie těchto patologických procesů a zavedení nových preventivních a terapeutických postupů.

SUMMARY

Idiopathic pes equinovarus (also referred to as clubfoot) is a congenital deformity of the foot and lower leg; it has five components: equinus, varus, adductus, cavus and supination of the foot. At present two principle methods are mostly used for the treatment of clubfoot: physiotherapy and continuous motion without immobilization and the Ponseti method (serial manipulation, cast application, Achilles tenotomy and transposition of m. tibialis ant.). This method has been reported to have short-term success rates approaching 100%, and the long-term results have been equally impressive. We believe, however, that the data on the success rate may be significantly influenced by the duration of the period after termination of the treatment. The purpose of the first part of our study was, therefore, to compare the short-term (up to three years) and long-term (three to seven years) results of treatment of idiopathic clubfeet with the Ponseti method and to determine the factors for recurrence. We have tested the hypothesis whether it is possible to cure all clubfeet with the Ponseti method only. We have found significant difference between the evaluation of the short-term and long-term results: the number of relapses during the first three years of treatment, indicated for surgical intervention, was markedly less (5%) as compared with patients where the treatment started six to eight years ago (65%). For an explanation of this finding it is necessary to take into consideration – particularly for the oldest group - the learning curve. On the other hand, the results from the year 2007 and onwards were significantly better: the number of relapses reached only 44%. Primary correction of pes equinovarus is possible in almost 100% of patients, but for the subsequent solution of relapses it is necessary to use surgical intervention. It follows from our results that – besides insufficient parent's compliance - the main risk factor is time: in patients older than three years it is impossible to use the Ponseti method only but it is necessary to use the surgical intervention. We have thus confirmed our hypothesis that to cure all relapses with the Ponseti method is impossible. We have observed during the surgery that the macroscopic structure of the connective tissue is different on the medial and lateral parts of the tarsus: the medial part is more rigid. This observation supports the hypothesis that connective tissue, particularly fibroblasts and growth factors are involved in the pathogenetic mechanisms responsible for the development of clubfoot. To obtain a more global understanding of the protein composition of the extracellular matrix, we performed in the second part of our study the proteomic analysis of the connective tissue in patients with clubfoot. We have observed for the first time that the extracellular matrix in clubfoot is – besides the collagens I, III and TGF β – composed from another 16 proteins, including

collagens V, VI and XII. Proteomic analysis of samples from the medial and lateral part of tarsus revealed differences in the protein composition: content of collagen VI, asporin, mimecan, prolamin and TGF β was higher in the medial, more rigid part of the joint. We have thus confirmed the hypothesis that protein composition of the extracellular matrix might play an important role in the pathogenesis of clubfoot. The analysis of the mechanisms that regulate extracellular matrix remodeling and formation of contracture will be important for understanding the biology of this pathological process and the implementation of preventive and therapeutic strategies.

OBSAH

1. Úvod	10 - 11
2. Pes equinovarus	
2.1 Definice	12
2.2 Klasifikace	12 - 13
2.3 Klinický obraz	14 - 18
2.4 Patologická anatomie	18 - 19
2.5 Patogeneze	19 - 20
2.6 Léčba konzervativní	20 - 22
2.7 Léčba operační	23 - 30
2.8 Rehabilitace	30
3. Cíle práce a pracovní hypotézy	31
4. Srovnání krátkodobých a dlouhodobých výsledků léčby pes equinovarus Ponsetiho metodou (klinická část)	
4.1 Metoda	
4.1.1 Výběr pacientů	32
4.1.2 Léčba	32 - 36
4.2 Výsledky	36 - 38
4.3 Diskuze	38 - 39
4.4 Závěry	40
5. Proteomická analýza extracelulární matrix u pes equinovarus congenitus (experimentální část)	
5.1 Metoda	
5.1.1 Pacienti a vzorky tkáně	41
5.1.2 Jednodimezionální a dvoudimezionální gelová elektroforéza	41 - 42
5.1.3 Příprava vzorků pro LC-MS/MS	42
5.1.4 Analýza kolagenní frakce	42 - 43
5.1.5 Analýza tryptického extrakcu pomocí LC-MS/MS	43 - 44
5.1.6 Aminokyselinová analýza	44
5.1.7 Vyhledávací v databázi	44
5.2 Výsledky	
5.2.1 Gelová elektroforéza	44 - 49
5.2.2 Aminokyselinová analýza	50
5.2.3 Bílkoviny extracelulární matrix	50 - 53
5.3 Diskuze	53 - 58
5.4 Závěry	58 - 60
Literatura	61 - 67
Seznam publikací doktoranda	68 - 70
Přílohy	

1. ÚVOD

Lidská noha má složitou strukturu: musí být schopná přenášet hmotnost těla na podložku, přenášet jeho zrychlení při běhu, měnit postavení v závislosti na terénních nerovnostech nebo dokonce nahradit chápavou funkci u dětí s nevyvinutými horními končetinami. Noha slouží jako spojení těla s okolním prostředím a zpětnou propriocepcí pomáhá udržovat vzpřímený postoj. Noha bývá často používána ve verbálních spojeních v hovorové řeči. Tak např. ten, kdo není v zaměstnaneckém poměru, „je na volné noze“, kdo se oddává luxusu, „žije na vysoké noze“, jinému „hoří půda pod nohama“, při špatné náladě říkáme, že „vstával levou nohou“, je-li někdo samostatný, „stojí na vlastních nohou“. Kollár zvolal: „...stůj noho, posvátná místa jsou!“ (Dungl a spol. 2014).

Lidská chůze je v celé živočišné říši zcela jedinečná a pro druh *Homo sapiens sapiens* přísně specifická. Vzpřímená bipední chůze se děje optimální rychlostí s minimálním energetickým výdajem u každého jedince individuálně, s jemnými variacemi podle věku a pohlaví. Chůze je individuálně typická a tak osobní, že podle zvuku a rytmu můžeme rozeznat jejího „majitele“. Každý krok začíná s flexibilní nohou, která se po kontaktu s podložkou přizpůsobí jejímu tvaru a rychle se mění v rigidní strukturu, přenášející hmotnost a udržující tělesnou rovnováhu. Patologické změny nohy vyšetřujeme jak při noze nezatížené, tak pozorováním funkčních změn v zátěži, a to ve stoji i při chůzi (Dungl 1989).

Ideální tvar nohy je obtížně definovatelný, často i nápadné deformity nepůsobí svým nositelům po celý život obtíže. Normální noha je pružná, s plantigrádním došlapem, vytvořenou podélnou a příčnou klenbou, současně i dostatečně rigidní, udržující svůj tvar v zatížení, s fyziologickým rozsahem pohybu v jednotlivých kloubech. Frejka (1970) rozlišoval nohu selskou, městskou a šlechtickou, tyto mnohdy umělé rozdíly však s migrací obyvatelstva a změnou životního stylu do značné míry vymizely. Existuje spojitá řada individuálních tvarů nohou od gracilní, drobné nohy s vysokou klenbou, po masivní, rozměrnou nohu s oploštělou klenbou. Dokonce jsme svědky různě intenzivního a různě nákladného léčení lehkých tvarových odchylek bez funkčního omezení.

U nohy platí, více než u jiných částí pohybového ústrojí, základní funkční princip – přenos hmotnosti těla na podložku a vzpřímená bipední chůze. Z tohoto pohledu jsou rozsah pohybu v jednotlivých kloubech, tvar a elasticita nohou druhotné. Klasické rozdělení vad a deformit

nohou je stejné jako v jiných orgánech a orgánových systémech: rozlišujeme vady vrozené, které dále dělíme na polohové a strukturální, a vady získané, kde rozlišujeme statické deformity a deformity sekundární po chorobách a úrazech. Čeština nemá pro mnoho deformit souhrnné české názvy, jako je tomu v angličtině či němčině, a pomáháme si často latinským přepisem. Rozlišujeme tedy:

- pes equinovarus, noha kososvislá (talipes equinovarus, clubfoot, Klumpfuss),
- pes equinus, noha koňská (Spitzfuss),
- pes calcaneus, noha hákovitá (calcaneal foot, Hackenfuss),
- pes cavus, noha vyklenutá (cavus foot, Hohlfuss, Ballenhohlfuss),
- pes planus, plochá noha (flatfoot, Plattfuss),
- metatarsus adductus (Sichelfuss),
- metatarsus varus (skewfoot),
- pes (plano) valgus, plochovbočená noha (valgus foot, Knickfuss, Senkfuss),
- pes transversoplanus, příčně plochá noha (flatfoot, Spreizfuss),
- talus verticalis (rocker-bottom foot, Tintenloscherfuss).

Kostní vývoj nohy začíná již intrauterinně. Při narození jsou talus, calcaneus a os cuboideum osifikovány, kdežto os naviculare a kosti klínovité zůstávají chrupavčité. Metatarzy a falangy jsou osifikovány již při narození. Os cuneiforme laterale osifikuje mezi 4. a 20. měsícem věku, os cuneiforme mediale ve 2 letech, intermedium ve 3 letech. Os naviculare osifikuje s poměrně velkou variační šíří mezi 2. až 5. rokem života. Noha má vlastní růstový vzorec, odlišný od zbytku těla. Noha roste rychle do 5. roku života, poté se růst zpomaluje na zhruba 9 mm ročně mezi 5.–12. rokem u děvčat a 5.–14. rokem u chlapců, kdy zpravidla růst nohy ustává. Délka chodidla u rok starého děvčátka a 18měsíčního chlapce dosahuje polovinu dospělé délky. Průměrná délka chodidla u děvčat je 24 cm, u chlapců 26 cm. Kombinací odchylek zejména při neurologických postiženích vznikají složené deformity, jako pes calcaneovalgus, pes equinocavovalgus, equinocavovarus či pes serpens (zig-zag fuss). V naší dizertační práci jsme se zabývali patogenezí a léčbou nejkomplicovanější a nejčastější vrozené deformity nohy – pes equinovarus congenitus (Dungl a spol. 2014).

2. PES EQUINOVARUS CONGENITUS

2.1 Definice

Pes equinovarus congenitus (PEC) je složitá deformita nohy, složená z pěti hlavních komponent, které mohou v různé míře převažovat. Jsou to equinozita v hlezenním kloubu, inverze přednoží, varozita paty, exkavace (vyklenutí střední části nohy) a addukce přednoží. Zdá se, že hlavním činitelem při vzniku a udržování této deformity je tah m. tibialis posterior, k deformitě rovněž patří mediální subluxace v Chopartově kloubu a zkrácení Achillovy šlachy. Anglický název congenital talipes equinovarus přímo vyjadřuje místo primárního postižení, častěji se ale užívá clubfoot (něm. Klumpfuss).

Incidence PEC v evropské populaci je přibližně 1-2 na 1000 živě narozených dětí, v Japonsku 0,5 na 1000, a v jižním Pacifiku zhruba 7 na 1000 živě narozených.

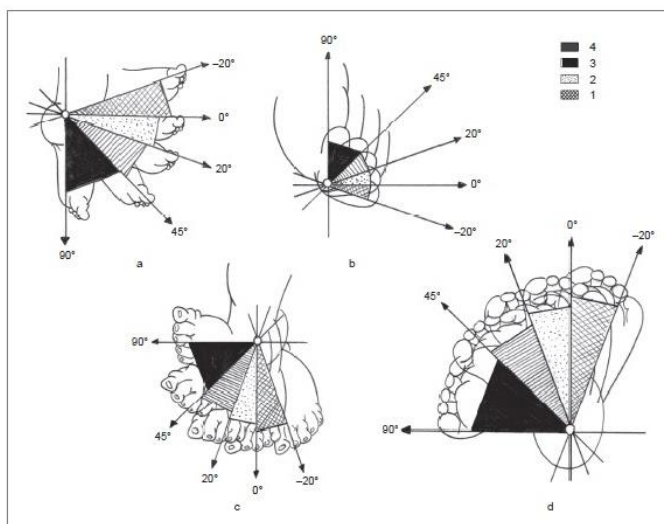
2.2 Klasifikace

Hersh (1967) rozdělil equinovarovní deformity na vrozené a získané a obě skupiny dělí dále podle etiologie. U vrozených rozeznává equinovarus idiopatický, neurogenní, myogenní, osteogenní, kolagenní a chondrogenní, u získaných pak PEC, vznikající z neurogenní nebo cévní příčiny. Vrozený idiopatický pes equinovarus rozděluje na typ vnitřní, kdy je noha rigidní, se značnou fibrózou a abnormálním postavením kostí, a na typ zevní s flexibilní, poměrně snadno korigovatelnou vadou. V současné době se používá jednoduché dělení dle Lehmana a spol. (1984) a Tachdjiana (1990):

1. typ polohový, pasivně korigovatelný,
2. typ rigidní, pravý,
3. rezistentní rigidní typ, sdružený s dalšími vrozenými vadami či arthrogrypózou.

Klasifikace klinického obrazu je obtížná pro příliš velký subjektivní pohled jednotlivých hodnotitelů. Pro informaci předložíme dva základní, aktuálně používané klasifikační systémy: evropský, který vytvořil v Montpellier Allan Dimeglio a francouzští spolupracovníci (1995) a systém americký (Pirani, 2002).

Dimegliaova klasifikace je 20 bodová; rozlišuje 4 základní parametry, hodnocené 0-4 body a další 4 nepříznivé příznaky, hodnocené vždy 1 bodem. Výsledkem jsou 4 stupně závažnosti equinovarovní deformity: základní parametry, hodnocené 0-4 body podle rigidity a reponovatelnosti: 1. equinozita v sagitální rovině, 2. varozita ve frontální rovině, 3. derotace bloku calcaneus-přednoží a 4. addukce přednoží v horizontální rovině (obr. 1). Další nepříznivé příznaky tvoří zadní rýhy, mediální rýha, kavózní deformita a hypotrofie lýtkového svalstva. Stupně: 1. benigní deformita (0-5 bodů), 2. středně závažná deformita (6-10 bodů), 3. závažný PEC (11-15 bodů) a 4. velmi těžká deformita (16-20 bodů). Používá se rovněž verbální vyjádření rigidity do 4 kategorií od nejlehčí po nejtěžší: 1. benigní deformita soft-soft, 2. mírná deformita soft- stiff, 3. závažná deformita stiff-soft a 4. velmi závažná deformita stiff-stiff.



Obr. 1 Klasifikace PEC podle Dimeglia; šrafováním je rozlišeno bodové hodnocení 1-4 body: a – hodnocení equinozity v sagitální rovině, b - hodnocení varozity v sagitální rovině, c – hodnocení derotace v horizontální rovině, d – hodnocení addukce přednoží v horizontální rovině.

Piraniho klasifikace používá pro složku deformity podle závažnosti 0-1/2-1 bod, maximální hodnota může být 10 bodů. Součástí jsou: 1. zakřivení laterálního okraje nohy, 2. závažnost mediální rýhy, 3. závažnost zadní rýhy, 4. interval mediální kotník-naviculare, 5. palpce laterálního okraje talu, 6. „prázdná“pata, 7. interval fibula-Achillova šlacha, 8. rigidita equinu v extenzi kolena, 9. rigidita addukční složky a 10. kontraktura dlouhých flexorů prstů.

2.3 Klinický obraz

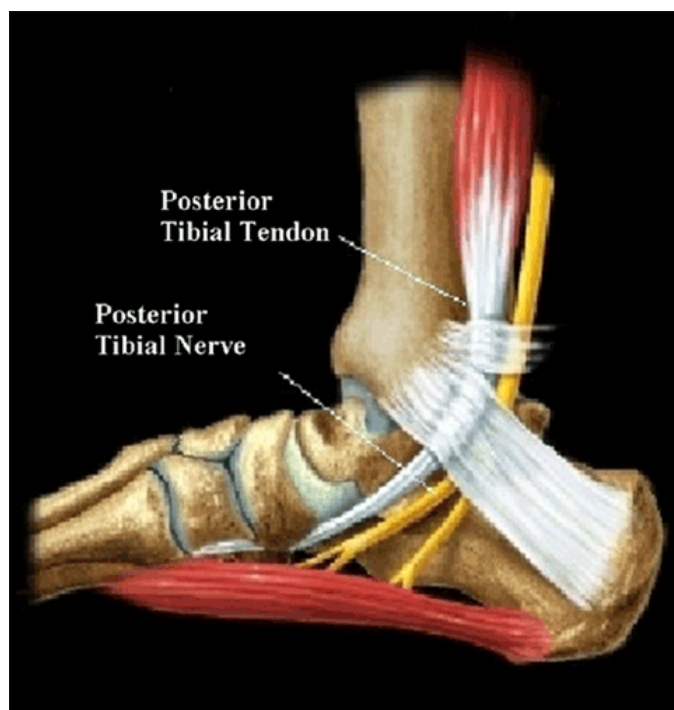
Vzhled nohy s pravým PEC je charakteristický (obr. 2). Noha je v plantiflexi, pata je malá, varózní, vysunutá vzhůru, na kůži zápatí jsou hluboké příčné rýhy. Střední část nohy a přednoží stojí v addukci a supinaci. Noha je jakoby stočena do kornoutu (Frejka, 1970). Ultrazvukem lze deformitu diagnostikovat již od 15. týdne intrauterinního života. Není-li vada diagnostikována prenatálně, je zjevná ihned po narození. Zjištění PEC není indikací k přerušení těhotenství. Deformita je různě rigidní, ale není manuálním redresem plně odstranitelná. Kůže na konvexní straně nohy je ztenčelá, napjatá, přirozené rýhy chybí. Zevní kotník je více vzadu a více prominuje, přední část talu tvoří nejnápadnější prominenci na laterální straně dorza nohy. Na mediální straně nohy, která je konkávní, jsou hlubší kožní rýhy, os naviculare přiléhá těsně k vnitřnímu kotníku, takže palpací není možné vyhmatat mezeru mezi oběma kostmi. Při pokusu o pasivní dorziflexi můžeme hmatat zkrácenou a napjatou Achillovu šlachou. Již u novorozence je při jednostranném postižení nápadná hypotrofie lýtky a chodidlo je kratší (Ošťádal, 2014).



Obr. 2 *Oboustranný rigidní PEC – klinický obraz: chodidlo je kratší, noha je celkově menší, pata vytažená proximálně, kožní zářez nad patičkou a ve střední části chodidla.*

Od pravých PEC je třeba odlišit polohové deformity, vznikající nedostatkem místa v děloze,

kteří jsou méně rigidní a téměř zcela reponovatelné, i když pohledem není zpravidla možné tyto dvě skupiny odlišit. Polohový PEC se upraví sám bez jakékoliv léčby do několika dnů po porodu. Z toho někdy vznikají překvapivě výborné výsledky konzervativního léčení při porovnání s původně hrozivým iniciálním nálezem. Převahou svalů na mediální straně chodidla, zvláště pak tahem šlachy m. tibialis posterior, se noha stáčí do typické kornoutovité deformity (obr. 3).

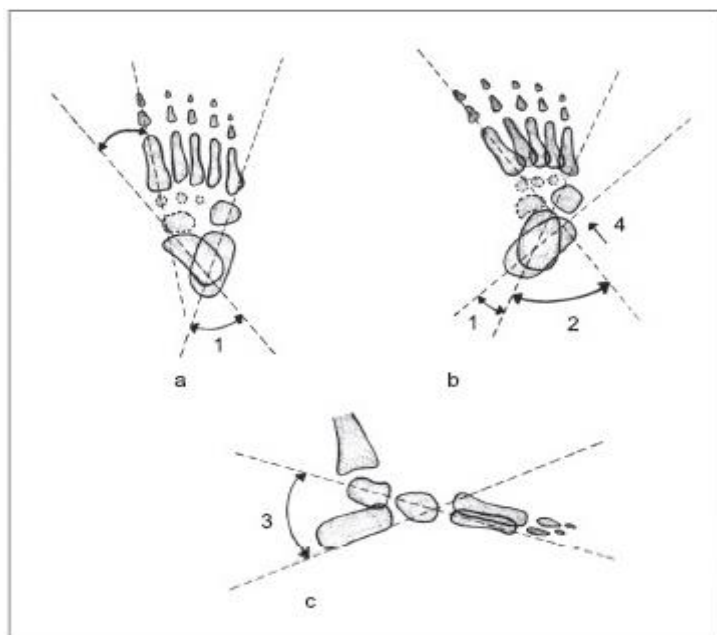


Obr. 3 *Distální úpon musculus tibialis posterior.*

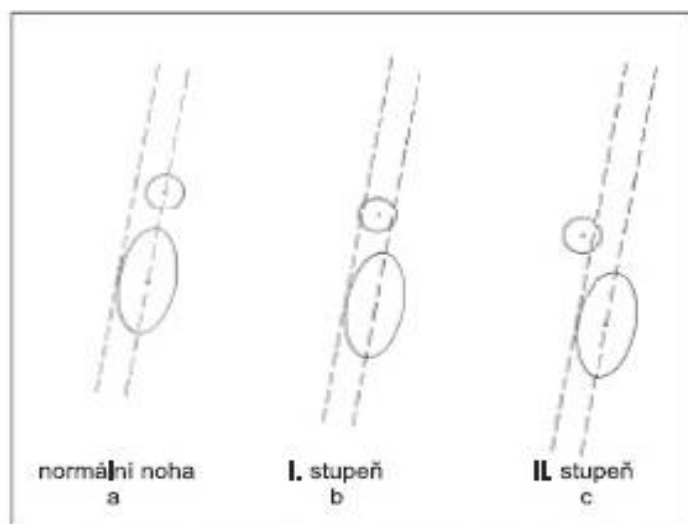
Je-li vada neléčena až do vertikalizace, chodidlo našlapuje na zevní okraj a v extrémních případech až na dorzum nohy. V místech nefyziologické zátěže se nad V. metatarzem a na dorzolaterální straně chodidla vytvářejí tuhé mozoly až tlakové ulcerace. Nefyziologickým zatížením se deformuje rostoucí skelet nohy a v kloubech se rozvíjí časná artróza.

Rtg vyšetření není nutné pro stanovení diagnózy, ale k posouzení závažnosti a sledování průběhu léčby. K verifikaci nálezu je důležité zhotovení RTG snímku v dorzoplantární a zejména ve standardizované boční projekci, při které jsou zevní strana paty a zadní části nohy paralelní s kazetou. V boční projekci se zhotoví snímek v maximální plantární a dorzální flexi (Henkel a Willert, 1969). U normální nohy se laterální talocalcaneární (TC) úhel

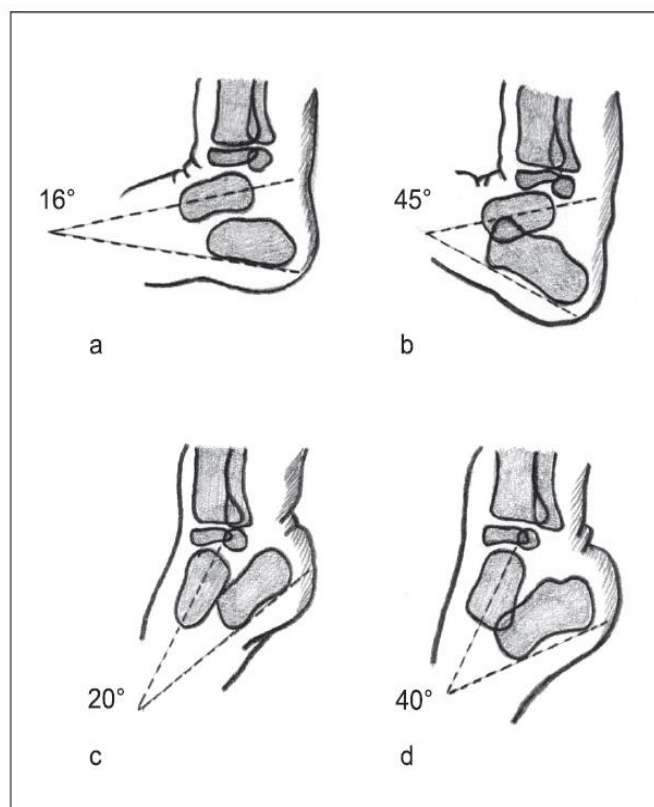
v dorziflexi s everzí calcanea zvětšuje, v plantiflexi se s inverzí zmenšuje, u PEC je tomu naopak. V plošném jednorovinném zobrazení se odečítá přímo malpozice jednotlivých základních kostěných elementů nohy; subluxace kosti loďkovité se odečítá nepřímou, neboť v době vyšetření ještě zpravidla není osifikovaná. V prvních měsících života jsou obrysy talu i kosti patní oválné, proto linie, určující osu kosti patní, je vedena plantárním okrajem. Pro zjednodušení se hodnotí tři základní úhly – laterální TC úhel, dorzoplantární TC (Kiteův) úhel a úhel mezi talem a dlouhou osou I. metatarzu. Zmenšuje-li se TC úhel (paralelita) a talometatarsální úhel je menší než 20° nebo je negativní, jsou tyto změny typické pro PEC. Součet TC úhlů v obou projekcích se označuje jako talocalcaneární index a jeho hodnota menší než 40° značí nedokonalé vyléčení (obr. 4,6). Na dorzoplantárním snímku se hodnotí vztah kosti krychlové ke kosti patní. Za normálních okolností osa patní kosti protíná střed kosti krychlové. U PEC je kost krychlová posunuta od této osy mediálně (Simmonsovo znamení, obr. 5). Metatarzy jsou stočené mediálně a vzájemně se překrývají.



Obr. 4 a - schéma dorzoplantárního snímku normální nohy; b - schéma dorzoplantárního snímku nohy při PEC, c – schéma bočního snímku: 1 – talocalcaneární dorzoplantární úhel (Kite), 2 – úhel mezi osou I. metatarzu a osou talu, 3 – laterální talocalcaneární úhel, 4 – mediální dislokace krychlové kosti.



Obr. 5 a – u normální nohy leží střed kosti krychlové v ose kosti patní, b – lehká mediální dislokace calcaneocuboidního kloub (CC), c – těžká dislokace CC kloubu o šíři kosti krychlové (volně podle Simmonse).

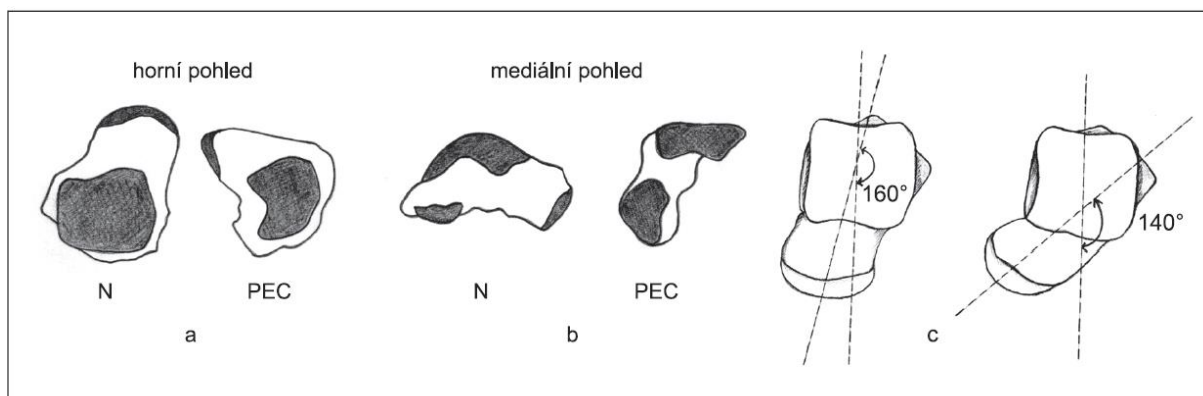


Obr. 6 Schéma talocalcaneárního úhlu v boční projekci: a, b – maximální plantiflexe a dorziflexe u PEC, c, d – totéž u normální nohy

Vada je náchylná k recidivám, z nichž nejvyšší četnost vykazuje PEC u artrogrypózy, zde i optimálně vedená terapie má za následek značné omezení elasticity a pohyblivosti chodidla. Deformita neléčená či nevhodně léčená je v dospělosti velmi nápadná a je zdrojem utrpení pro svého nositele (Dunzl a Karpíšek, 1990).

2.4 Patologická anatomie

PEC byla považována za vadu osteogenní, popisuje ale vadné postavení talu, nikoliv jeho vadný tvar. Do jisté míry můžeme rozlišit primární (vrozené) a sekundární (adaptační) patologicko-anatomické změny. Základní primární deformitou je podle většiny autorů postižení talu. Hlezenní kost je celkově menší, skloněna do equinozity v hlezenním kloubu, hlavice s krčkem jsou stočeny plantárně a mediálně. Deklinační úhel má za normálních okolností hodnotu 150–160°, u vrozeného equinovaru je zmenšen na 125–140°. Vidlice hlezna je fyziologicky vzadu užší než vpředu, trochlea talu má obdobný tvar. U neléčeného PEC vlivem subluxačního postavení v plantiflexi se přední část kloubní plochy talu relativně rozšiřuje a ztrácí tím možnost repozice do maleolární vidlice (Ippolito, 1995) (obr. 7).



Obr. 7 Srovnání tvaru talu normální nohy a PEC u novorozence, a – pohled shora; krček talu je zkrácen a skloněn mediálně, kloubní ploška pro os naviculare je na mediální straně hlavice, b – medioplantární deviace hlavice talu, c – schéma Paturetova úhlu (N - normální noha, PEC – pes equinovarus).

Os naviculare je dislokována mediálně, je těsně přiložena k vnitřnímu kotníku a je v této nové poloze držena tahem plantárního calcaneonaviculárního vazy (lig. spring), vazy tibionaviculárního a silným tahem šlachy m. tibialis posterior. Další malpozice jednotlivých kostí tarzu vznikají vystupňovanou horizontální subtalární rotací, při které se kolem osy, tvořené lig. talocalcaneare interosseum, stáčí kost patní hrbolem k zevnímu kotníku a do varozity, přední okraj s kostí krychlovou je dislokován mediálně pod talus. Kosti středního tarzu a metatarzy jsou stočeny do addukce a cavovarózního postavení. Rigidita celé deformity je udržována tuhým vazivovým pruhem, tvořeným zesílenými vazivovými pochvami dlouhých ohybačů haluxu a prstů v místě jejich překřížení pod os naviculare (tzv. Henryho uzlu). Nejsou-li tyto rotační změny včas upraveny, přizpůsobuje se tvar kostí patologickému postavení, laterální okraj nohy relativně přerůstá a celý řetěz patologických změn se fixuje a prohlubuje. U neléčené, zastaralé deformity jsou tuhé kalozity až ulcerace na zevní hraně nohy nebo na jejím hřbetu (Ippolito, 1995).

2.5 Patogeneze

Patogeneza PEC nebyla dosud objasněna. Vyslovena byla řada teorií: patří k nim porucha vaskularizace talu (Irani a Sherman, 1963), faktory zevního prostředí, nitroděložní poškození, abnormální svalové úpony a faktory genetické (Idelberger, 1939, Bonnell a Cruess, 1969, Dunn, 1972, Wynne-Davies, 1972, Lochmiller a spol. 1998, Gurnett a spol. 2008, Gibbons a Grey, 2013). Nejstarší mechanistická teorie pochází od Hippokrata, který předpokládal vliv zevních sil během nitroděložního vývoje. Tato teorie měla vždy řadu významných zastánců. Vzhledem k hypotrofii lýtkového svalstva, která tuto vadu vždy doprovází, byla zvažována teorie neuromuskulárního defektu, elektromyografická ani histologická vyšetření svalů však neprokázala lézi distálního motoneuronu či histologické změny svaloviny. Irani a Sherman (1972) našli při vyšetření 11 zárodků primární deformitu krčku talu, který je skloněn medioplantárně podobně, jako je tomu u typických vad po narození. Byl rovněž popsán menší počet cévních kanálků v chrupavčitém modelu talu a z toho plynoucí ischemie v sinus tarsi. Pravděpodobnou příčinou je primární defekt zárodečného mezenchymu, který vzniká na základě působení dosud neznámé noxy v období před 7. týdnem nitroděložního vývoje.

Studie etnických skupin, populací a rodin naznačují genetický vliv jako jeden z hlavních etiologických faktorů; multifaktoriální dědičnost je velmi pravděpodobná (Wynne-Davis,

1972). Způsob přenosu je polygenní; vada se stává manifestní při jisté prahové hodnotě genetických faktorů, při menší než prahové hodnotě se vyvine normální noha. Příbuzní v 1. stupni (rodiče – děti, sourozenci) mají 2,9% riziko vzniku této vady, ve 2. stupni (teta – strýc, prarodiče) 0,5% a ve 3. stupni (bratřenci – sestřenice) 0,2%. Riziko porodu dalšího dítěte s PEC je zvýšeno na 10–15 %, jsou-li oba rodiče nositeli vady. Započalo pátrání po možných „PEC citlivých“ genech; zájem vzbudily dva transkripční faktory, PITX1 a TBX4. Patogenetická dráha PITX1-TBX4 je odpovědná za časný vývoj končetiny; oba hrají roli ve vývoji zadní části nohy, avšak prakticky se nepodílejí na vývoji přednoží; to možná vysvětluje, proč se tato vývojová porucha nevyskytuje na horní končetině (Gurnett a spol., 2008, Alvarado a spol. 2010).

Maximálně kontrahovaná část PEC je lokalizována mezi mediálním malleolem, sustentaculem tali a os naviculare. Tato oblast se již makroskopicky výrazně liší od okolní tkáně: díky její podobnosti s meziobratlovou ploténkou je označována jako „disc-like tissue“. Ultrastrukturální studie kontrahované části PEC zjistilo buňky, obsahující mikrofilamenta obdobné těm, které pozorujeme u palmární fibromatózy (Sano a spol., 1998). Buňky z kontrahované části obsahují velké množství kolagenu III (Fukuhara a spol., 1994, Gilbert a spol., 2001, Li a spol., 2001). Buňky z palmární fibromatózy a kontrahované části PEC obsahují několik růstových faktorů, včetně destičkového růstového faktoru (PDGF) a transformovaný růstový faktor β (TGF β). Blokáda PDGF a TGF β vedou k poklesu hladiny kolagenu, proliferaci a chemotaxi, což může redukovat tkáňovou kontrakci (Li a spol., 2001). Předpokládá se, že exprese těchto faktorů nemusí být primární příčinou kontraktury, ale spíše mohou sekundárně aktivovat jiné signální dráhy, jako signalizaci zprostředkovanou beta-kateninem, která hraje významnou roli v regulaci kontraktury u PEC (Cheon a spol., 2004, Poon a spol., 2009).

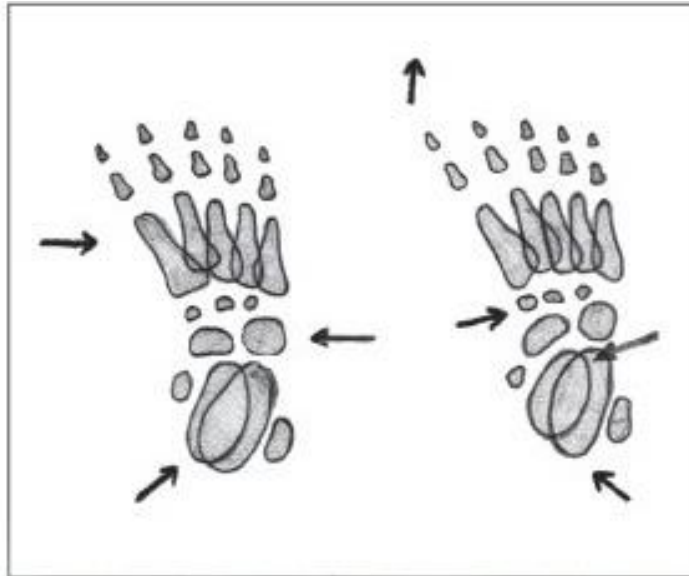
Všechny tyto studie podporují hypotézu, že fibroblasty a růstové faktory se podílejí na patogenetických mechanismech, odpovědných za vznik PEC. Identifikace jednotlivých proteinů by tak mohla pomoci pochopit faktory, které se na vzniku této závažné vrozené vady podílejí a tak přispět k vývoji efektivnějších terapeutických postupů.

2.6 Léčba konzervativní

Terapie se dělí obvykle na konzervativní a operační (Ošřádal, 2014). Používání těchto

postupů se v průběhu medicínských dějin významně měnilo. Konzervativní léčení spočívá v postupné korekci deformity sérií sádrových redresních obvazů, způsob jejich přikládání se podle jednotlivých autorů liší. Všeobecně se rozlišuje sádrování korekční (redresní), které má postupně odstranit deformitu, a sádrování retenční, které zajistí dosaženou korekci. Korekční působení sádrového obvazu má omezené trvání; již po 48 hodinách se obvaz mění z korekčního na pouhý retenční. Je-li sádrový obvaz vyměněn každý druhý den, trvá redresní fáze asi 3 týdny. Velkou pozornost je třeba při každé výměně sádry věnovat správnému umístění korekčních tlaků (Yamamoto a spol. 1998).

Od dob Hippokratových se používal redresní tlak v trojbodovém systému, tj. z mediální strany na přednoží a patu s protitlakem na oblast před zevním kotníkem. Pokrok znamenalo derotační sádrování, při němž se pečlivě modelovala oblast paty, lehkým tlakem se stahovala dolů, oddalovala se od zevního kotníku a stáčela se do neutrálního postavení (tzv. Wiener Handgriff-Scheel – obr. 8). Snad nejznámějším protagonistou konzervativního léčení byl Kite (1972), který v letech 1924–1960 léčil více než 800 pacientů, terapie trvala průměrně 6 měsíců. Kite (1972) korigoval každou komponentu PEC separátně, začínal s addukcí přednoží a pokračoval varozitou paty, jako poslední odstraňoval equinozitu. Nikdy nedovolil začít s korekcí další deformity, nebyla-li hotova fáze předchozí. Metoda byla velmi pracná a výsledky ostatních autorů nebyly zdaleka tak dobré. Ponseti (1996) je rovněž zastáncem konzervativního léčení, v současné době velmi populárního, který koriguje všechny složky deformity současně a dosahuje korekce průměrně 5 výměnami redresních sádrových obvazů. Ctí sekvenci malpozic při PEC deformitě a domnívá se, že nemůže být izolovaně korigována addukce přednoží bez laterální subtalární derotace kosti patní a bez korekce inverze, k překonání equinozity přidává u většiny případů subkutánní tenotomii Achillovy šlachy; poté doporučuje abdukční ortézu až do 6 let věku. Ponseti (Ponseti a Smoley, 1963, Ponseti, 1996, Ponseti a spol. 2006) věří, že manipulací vzniká druh aseptického zánětu, který je třeba zklidnit v sádrovém obvazu a nejitřít cvičením. Tato teorie si přímo protiřečí s moderní koncepcí francouzských autorů (Dimeglio a spol., 1996), kteří s úspěchem používají kontinuální pasivní cvičení ve speciálně konstruované motorové dlaze. V současné době Ponsetiho terapeutický koncept zvítězil a jeho metoda je (až na výjimky) celosvětově nejvíce používána. Podrobně se k této metodě vrátíme v dalším textu.



Obr. 8 Správné rozmístění korekční tlaků podle Bösche: a – schéma klasického trojbodového korekčního talu, b – směr korekčních tlaků podle Böscheva návrhu.

Rozhodující roli u všech konzervativních postupů hraje časný začátek účinné terapie, protože měkké tkáně jsou ještě pod hormonálními vlivy, a proto poddajnější. Již v prvních dnech po porodu má být naložen první redresní sádrový obvaz, který se mění v pravidelných intervalech. Redresní sádrování má své zásady – nepoužívá se nikdy analgetické sedace (algická reakce upozorňuje na nepřiměřené násilí), prostředí má být pro dítě příjemné a matka má dítě uklidňovat. Při modelování sádrového obvazu je nutno nenásilně korigovat všechny složky deformity současně, nepostupuje se v dříve oblíbené Kiteově sekvenci addukce-varozita-equinozita (Kite, 1972). Směr aplikace korekčních sil směřuje z mediální strany laterálně, současně se provádí subtalární derotace, abdukce a korekce equinózního postavení i varozity. Redresní tlak nesmí být příliš energický, nelze se pokoušet o jednorázovou úplnou korekci. Tato korekce je totiž pouze zdánlivá, patička zůstane v inverzi a přednoží je prolomením ve středním tarzu převedeno do pronace („segmental break“), nožka reaguje otokem a vynucená přestávka v léčení maří předešlé úsilí. Ponseti (1996) říká „never pronate the foot“, tím se repozice zamkne v Chopartově kloubu. Buď se šetrným redresním sádrováním podaří polohovou deformitu plně zkorigovat a pokračuje se v ortéze podle Ponsetiho návrhu nebo je indikováno operační léčení.

2.7 Léčba operační

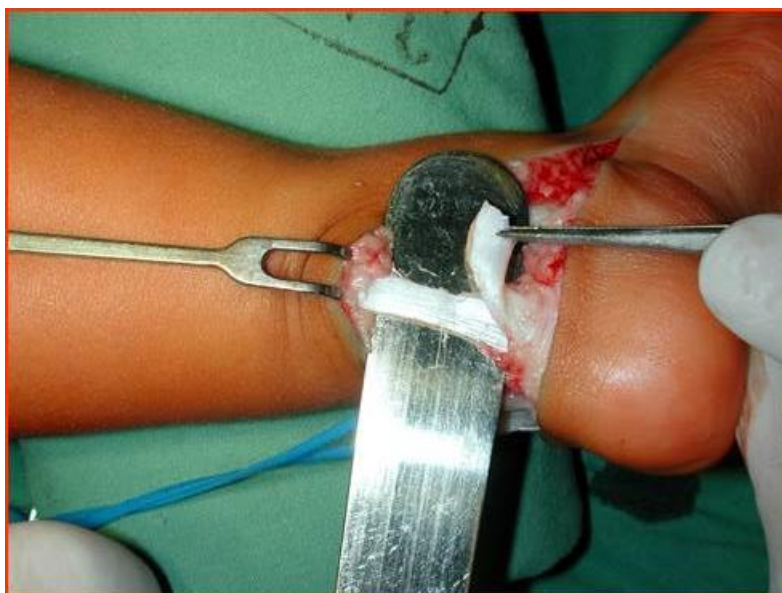
V názorech na volbu operace není v literatuře plná shoda (Ošťádal, 2014). Před Ponsetiho érou se mnohem více indikovala operační léčba. Byla používána buď tzv. cesta malých kroků, kdy jsou postupně korigovány jednotlivé složky deformity, s nevýhodou opakovaných operací a prolongovaného sádrování nebo jednorázová kompletní korekce za cenu většího operačního výkonu, náročného na operační techniku.

Po zavedení historicky nejúspěšnější konzervativní Ponsetiho metody počet operačních výkonů výrazně poklesl. Po prvních optimistických výsledcích se ukázalo, že, bohužel, ani tato metoda není stoprocentní. Proto musí být praktická a teoretická znalost „velké“ operativy PEC udržována, a to alespoň na klinických pracovištích. Operativa není jen alternativou konzervativního postupu či léčbou recidiv, nýbrž u rigidních neurogenních equinovarózních deformit tvoří podstatnou složku léčby. Tachdjian (1990) dokonce zastává názor, že operace je vzhledem k menšímu použitému násilí oproti sádrování léčbou konzervativní. Způsobů operačního léčení je celá řada a každá nová metoda byla předkládána v dobré víře, že je účinnější a bezpečnější než ty předchozí. Nejrůznějšími typy operačních výkonů můžeme dosáhnout aktuální korekce do příznivého postavení, zejména však musíme operací vytvořit podmínky k dalšímu příznivému vývoji. Jestliže se k deformitě, podmíněné vrozeným tvarem základního elementu nohy, přidá neúplná repozice a funkční ztráta flexorů po jejich prolongaci a operační trauma, znamená to pro rostoucí, vulnerabilní nohu trvalé poškození, dalšími výkony již nekorigovatelné. Je možno souhlasit s Dimegliem a spol. (1996), že pouze první operace má největší naději na úspěch, všechny další výkony již mohou zpravidla pouze částečně zlepšit tvar a funkci nohy, zejména jsou-li šlachy flexorů trvale poškozeny zbytečnou prolongací. Prolongovaná imobilizace pouze částečně korigované nohy vede k zafixování a prohloubení stávající deformity a k dalšímu zhoršení po odstranění sádrové a dlahové korekce.

Operační léčení je obecně indikováno tehdy, přetrvává-li PEC klinicky i radiologicky i přes dostatečně dlouhodobé a správně vedené konzervativní léčení. Existuje celá řada operačních postupů (Hersh, 1967, Bensahel a spol. 1987), které všechny pojí základní princip – talonavikulární repozice a uvolnění kontraktur s repozicí v talonavikulárním kloubu.

Dorzální uvolnění se používá u těch případů, kde se daří včasnou Ponsetiho konzervativní terapií nohu korigovat, u kterých ale přetrvává equinózní postavení i přes subkutánní tenotomii Achillovy šlachy. Na RTG přetrvává talokalkaneární paralelita, pata je vysunuta

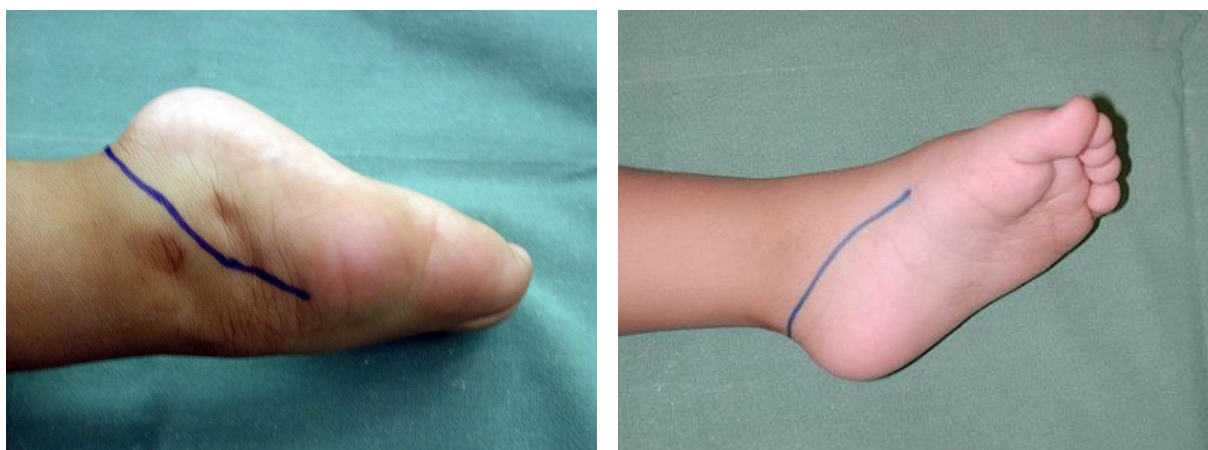
proximálně a dorziflexe není možná. V poloze na břicho se Achillova šlacha prodlužuje z příčné incize ve frontální rovině asi o 3 cm (obr. 9), protíná se pouzdro talocalcaneárního a tibiotalárního kloubu, lig. fibulocalcaneare, zadní část deltového vazu až k sustentaculum tali. Po operaci se zajistí repozice patní kosti K dráty, které je možné zavést příčně, ale lépe talocalcaneárně z planty. Sádruje se nad koleno na 6 týdnů, sádra je vždy podložená a vpředu prostřižená. Zpravidla 10. pooperační den se sádrový obraz vymění za podloženou cirkulární fixaci. Po sejmutí sádry se doléčuje individuálně zhotovenou plastovou dlažkou v everzi, dorziflexi a zevní rotaci chodidla a v 90° flexi v kolenním kloubu. Bandáž se mění zpočátku po třech, od jednoho roku věku po 6 měsících.



Obr. 9 Prodloužení Achillovy šlachy při dorzálním uvolnění ve frontální rovině.

Dojde-li ke kompletní recidivě PEC, kterou není dále možno léčit konzervativně, indikujeme subtalární uvolnění. Od r. 1983 používáme na našem pracovišti kompletní subtalární uvolnění z příčné incize (Cincinnati incision – Crawford, 1982) postupem v podstatě shodným s původním popisem (Mc Kay, 1983a,b,c) (obr. 10,11). Principem operace je korekce horizontální subtalární rotace po kompletní kapsulotomii talokalkaneárního kloubu s ponecháním mezikostního vazů. Pravidelnou součástí je kapsulotomie kloubu calcaneokuboidního s repozicí kosti krychlové, uvolnění tzv. „čtyřrohého“ spojení mezi talem, kostí patní, kostí krychlovou a loďkovitou; dorzálně prodlužujeme Achillovu šlachu

o asi 3 cm „Z“ řezem ve frontální rovině a zadní kapsulotomií otevíráme tibiotalární a talocalcaneární klouby. Protínáme lig. fibulocalcaneare, oproti původnímu popisu však neotevíráme pochvy peroneálních šlach pro riziko jejich pooperační luxace. Na mediální straně preparujeme svazek, protínáme vazivové pochvy m. flexor hallucis longus a m. flexor digitorum longus, chráníme hlubokou porci deltového vazy a prodlužujeme šlachy m. tibialis posterior (obr. 12,13). Na mediální straně otevíráme talonavikulární kloub, jehož štěrbina v důsledku medioplantární dislokace kosti loďkovité má téměř sagitální orientaci. Plantárně je os naviculare držena v patologickém postavení silným a zkráceným plantárním calcaneonavikulárním vazem (spring ligament). Kavózní složku PEC odstraníme protětim plantární aponeurózy a šlašitého začátku m. abductor hallucis ze separátní plantární kožní incize. Nenásilnou manipulací korigujeme nohu do správného postavení, nejvýraznější částí celé korekce je derotace kosti patní – v porovnání s výchozím postavením se pata otočí kolem vertikální osy o 60–90° hrbolem dovnitř a současně do valgosity. Délka chodidla se prodlouží o 1,5–3 cm. Korigované postavení zajistíme celkem čtyřmi Kdráty – přes kloub talonavikulární a calcaneokuboidní a dvěma dráty zajišťujeme polohu kosti patní proti talu; dráty však nesmějí procházet hlezenním kloubem. Známkou správné repozice je snadná sutura kůže (obr. 14,15). U reoperací může vlivem jizevnatých změn vzniknout posteromedialně napětí; v takovém případě ponecháme nohu v lehké inverzi a plné korekce dosáhneme během prvního pooperačního týdne opakovanou výměnou sádrového obvazu (Ošťádal, 2014).



Obr. 10,11 „Cincinnati incision“ – operační přístup používaný ke kompletnímu peritalárnímu uvolnění



Obr. 12,13 Snímek z operace - peritalární uvolnění dle McKaye, vypreparovaný nervověcévní svazek na gumovém závěsu, prodloužení šlachy *m. tibialis posterior*.

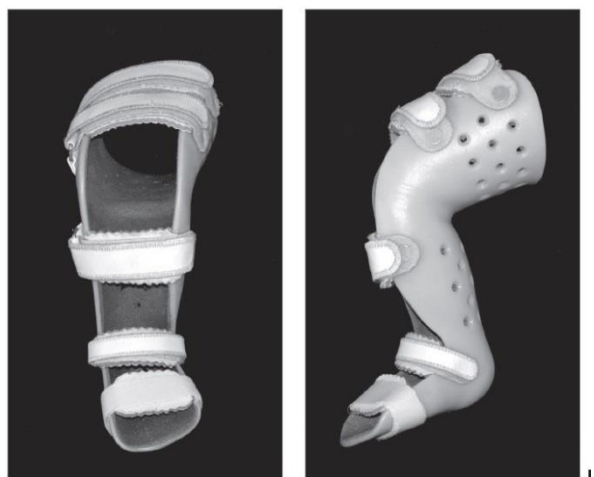
Tato technika je sice náročná, ale ve většině případů poskytuje výborné výsledky. Šlachy flexorů nikdy neprodlužujeme, i značné flekční postavení prstců korigujeme pooperačně pasivním vytahováním v dorziflexi a podkládáním molitanem. Po operaci přikládáme cirkulární, podložený a vpředu prostřížený sádrový obvaz nad koleno. Noha je polohována v závěsu a po sejití otoku, což bývá 7.–10. den, přiložíme definitivní sádrový obvaz v hyperkorekci nohy a flexi 90° v kolenním kloubu na dobu 6 týdnů. Po této době odstraníme perkutánně zavedené K dráty a odebíráme míru na polohovací ortézu, jíž nahrazujeme sádrovou fixaci (obr. 16). Osvědčila se i krátká AFO ortéza (ankle-foot-orthosis), ve které dítě první měsíce po operaci chodí. Původně doporučovanou pohyblivou sádru již nepoužíváme, rovněž odmítáme fixaci sádrovými dlahami. Polohovací ortézy měníme po 6 měsících po dobu nejméně 3 let od operace (obr. 23,24) (Chomiak a spol. 2009, Ošťádal a spol. 2011)



Obr. 14,15 Derotace po peritalárním uvolnění je zajištěna čtyřmi Kdráty, zavedenými přes kůži.

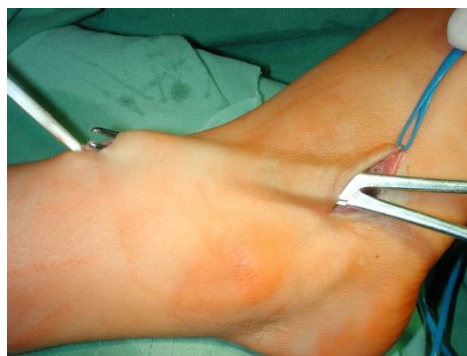
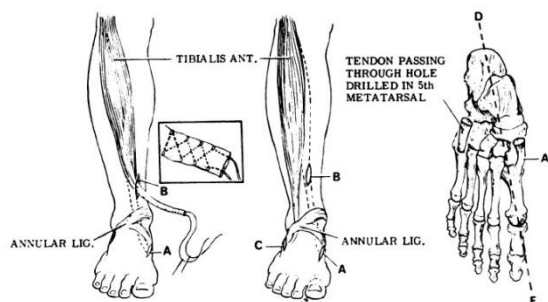
Problematická bývá plná obnova funkce u reoperací, neboť při původních operacích zpravidla bývají poraněny šlachy a sekundární srůsty flexorů již nelze odstranit. Tato vynikající operace je rovněž devalvována závažnými komplikacemi, které vznikají vždy jako iatrogenní poškození z nedokonalé operační techniky (Dungl a spol. 2014).

Následná péče je velmi důležitá, stejně jako léčení samotné. Za 12 týdnů od operace je sejmuta sádrová fixace a přiložena na míru zhotovená ortéza. S rozvojem ortopedické protetiky jsme přestali používat Denisovu-Brownovu dlahu, individuální pomůcka je vždy účinnější. Před adjustací pomůcky je vždy nutné, aby předepisující lékař zkontroloval vyrobenou ortézu a mohl případně upravit její tvar. Nikdy se tato kontrola nemá vynechat, a to ani při spolupráci se zkušeným ortopedickým technikem. Ortéza je přikládána na denní i noční spaní a má se nejméně každých 6 měsíců obměnit. U primárních výkonů požadujeme dlahování 3 roky od operace, u reoperací často prodlužujeme ortotickou péči do 6 let věku. Pravidelné kontroly nejméně 1krát ročně do ukončení růstu jsou samozřejmostí. Je nutno zdůraznit, že nošení na míru zhotovené ortopedické obuvi není zapotřebí.



Obr. 16 AFO (ankle-foot orthosis). Individuálně vyráběná plastová ortéza, sloužící k zajištění pooperační fixace po peritalárním uvolnění.

K léčbě recidiv se používá, kromě shora zmíněných postupů, celá řada chirurgických metod; jejich výběr závisí na zkušenostech operátora a místních podmínkách. Při tendenci k recidivě supinačního postavení, zaviněné jistou slabostí peroneálních svalů, se velmi osvědčila temporérní transpozice šlachy m. tibialis anterior na zevní stranu nohy (obr. 17). Důležitou podmínkou úspěšnosti této operace je elastická noha, kterou lze pasivně převést do pronáčního postavení. Silná šlacha je vytažena proximálně mezi horní a dolní extenzorová retinakula a podkožním tunelem je v přímém směru protažena na zevní stranu nohy (obr. 18), kde je všita do kosti krychlové nebo až do šlachy krátkého peroneálního svalu při úponu na bázi V. metatarzu. Za 2–3 roky se šlacha vrací do místa původního úponu na mediální stranu I. metatarzu. Další možností je šlachu m. tibialis ant. dle Ponsetiho transponovat do laterální cuneiformní kůstky a ponechat ji tam navždy (Ošťádal, 2014).

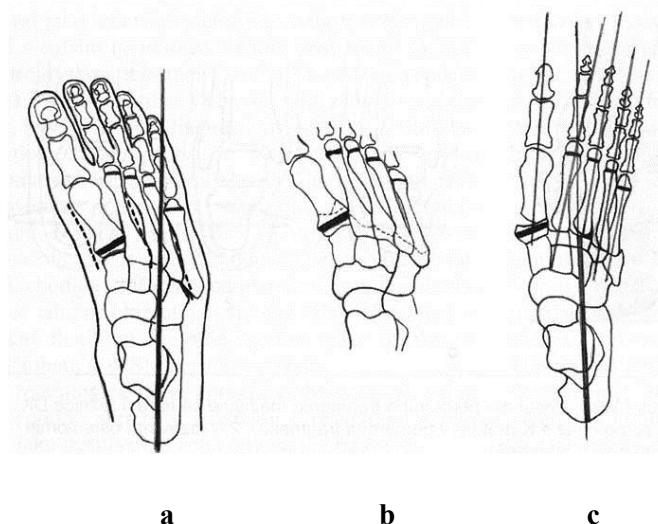


Obr. 17 Dočasná transpozice *m. tibialis anterior* na laterální stranu.

Obr. 18 Naše modifikace – šlachy *m. tibialis anterior* transponujeme ne pod extenzorovými retinaculy, ale podkožním tunelem, na laterální stranu nohy.

Při tendenci k varozitě přednoží, podmíněné přerůstáním laterálního sloupce nohy, je velmi osvědčenou operací enukleace osifikačního jádra kosti krychlové a následná transfixace Kdrátem. Tento výkon je někdy vhodné spojit s transpozicí šlachy *m. tibialis anterior*. U perzistující varozity a zkrácení kosti patní je doporučována valgizující osteotomie patní kosti z mediálního přístupu s vložením štěpu. V jizevnatém terénu může být sutura obtížná, alternativou je lineární osteotomie ze zevní strany s posunutím periferního fragmentu plantárně a laterálně.

Metatarzální osteotomie je indikována při reziduální varozitě přednoží u nohy po operaci PEC, když bylo dosaženo správného postavení kostí tarzu. Byla doporučena rovněž osteotomie všech metatarzů při jejich bázích, u I. metatarzu musí být osteotomie vzdálena od epifýzy alespoň 5 mm, aby nedošlo k růstové poruše (obr. 24,24a). Z V. a někdy i IV. metatarzu je vhodné resekovat krátký segment diafýzy k snazšímu vyrovnání přednoží. Zpravidla vystačíme se třemi podélnými incizemi, příčný kožní řez je méně výhodný. Každý metatarz transfixujeme vždy jedním tenkým K drátem (obr. 19). Kapsulotomie tarzometatarzálních kloubů, byla pro neuspokojivé dlouhodobé výsledky opuštěna.



Obr. 19 Schéma metatarzální osteotomie (Berman); a – varózní uchýlení přednoží, čárkovaně jsou vyznačeny tři podélné incize, b – naznačený rozsah a tvar osteotomie, na V. metatarzu je vyznačen rozsah resekce c fixace jednotlivých paprsků kirschnerovými dráty, obnovena podélná délka nohy.

K terapii zastaralých, značně rigidních deformit byla s úspěchem použita i technika postupné redrese zevní fixací podle Ilizarova. Výsledky této techniky byly přijímány až s nekritickým optimismem, ale deformita ochotně recidivuje a noha je po takovém léčení rigidní, dystrofická, dlouhodobě značně bolestivá. V kombinaci s kapsulotomiemi rigidních kloubů jsou výsledky i u těžkých a zastaralých deformit přijatelné (Grill, 1984).

2.8 Rehabilitace

Rehabilitace má rovněž své místo v doléčení PEC, ale její význam bývá přeceňován. Rodiče jsou podrobně instruováni o způsobu cvičení; cílem je dosažení svalové rovnováhy mezi everzními a inverzními svaly nohy a udržení elastické nohy, volně pohyblivé v subtalárních kloubech i v kloubu hlezenním. Rodiče musí být poučeni o tom, že jistý zkrat chodidla u jednostranných vad i jistá hypotrofie lýtkového svalstva patří k základnímu obrazu PEC, a že tento nálezní nekoliduje s dobrým výsledkem. V posledním desetiletí jsme svědky aplikace Vojtovy reflexní terapie i na PEC, výsledky jsou však velmi rozporuplné (Shack a Eastwood, 2006).

3. CÍLE PRÁCE A PRACOVNÍ HYPOTÉZY

Na základě analýzy dostupných literárních dat jsme si stanovili dva hlavní cíle práce.

1. Pro léčbu PEC jsou užívány v podstatě dvě metody: fyzioterapie a postupné cvičení bez imobilizace a shora uvedená Ponsetiho metoda. V literatuře se uvádí, že tato metoda má krátkodobou úspěšnost v impozantních 100%, podobně vysoce úspěšné mají být i výsledky dlouhodobé. Sami se však domníváme, že údaje o úspěšnosti mohou být významně ovlivněny dobou, která uplyne od ukončení léčby. Naším cílem bylo proto srovnat krátkodobé (do 3 let) a dlouhodobé (3-7 let) výsledky léčby PEC Ponsetiho metodou a určit faktory, které se podílejí na vzniku recidiv. Testovali jsme tak hypotézu, zda lze léčit všechny recidivy PEC i u dětí starších 3 let výlučně Ponsetiho metodou.

2. Dostupné studie podporují hypotézu, že patogenetické mechanismy, odpovědné za vznik PEC, zahrnují fibroblasty a růstové faktory. Pro pochopení bílkovinného složení extracelulární matrix jsme proto použili proteomickou analýzu kontrahovaného kloubního pouzdra u pacientů s PEC. Zvláštní pozornost byla věnována možným rozdílům vazivové tkáně na mediální a laterální straně nohy s PEC. Předpokládali jsme, že identifikace jednotlivých proteinů může pomoci pochopit mechanismy, které se na vzniku této vážné anomálie podílejí a přispět tak k vývoji účinnějších terapeutických postupů.

4. SROVNÁNÍ KRÁTKODOBÝCH A DLOUHODOBÝCH VÝSLEDKŮ LÉČBY PES EQUINOVARUS PONSETIHO METODOU

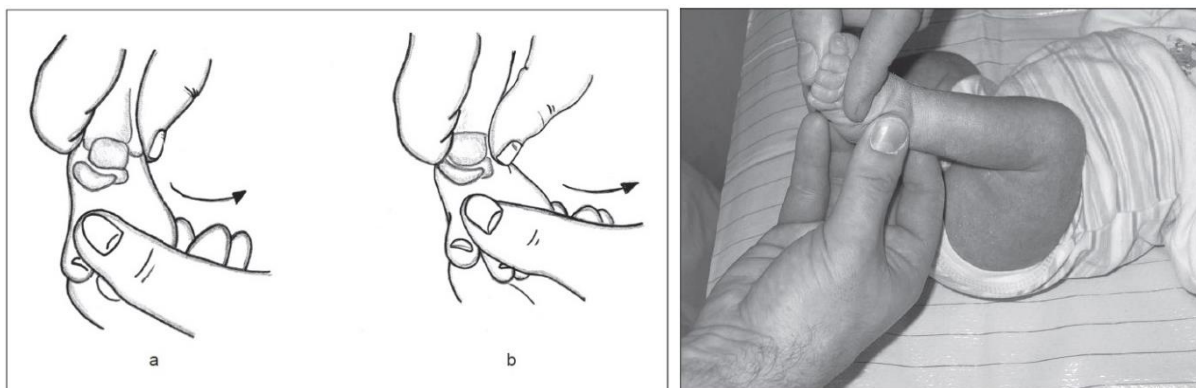
4.1 Metoda

4.1.1 Výběr pacientů

Do souboru bylo zařazeno celkem 195 dětí (143 chlapci a 52 dívek) s diagnózou PEC, léčených Ponsetiho metodou na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Bulovka v Praze v letech 2005 – 2012. U 108 dětí (55%) se PEC vyskytoval bilaterálně, tzn., že celkový počet nohou léčených Ponsetiho metodou byl 303. Vybráni byli pacienti, u nichž léčba začala mezi porodem a 6 měsíci života (i v případě, že byli původně léčeni na jiných pracovištích jinou metodou). Vyloučeni byli pacienti, u nichž byla deformita spojena s nějakou jinou vrozenou vadou. Studie byla schválena etickou komisí, vyžadován byl písemný souhlas rodičů. 28 pacientů (14%) mělo pozitivní rodinnou anamnézu. Stupeň postižení byl při přijetí klasifikován metodou dle Dimeglia a spol (1995). Jak bylo uvedeno již v úvodní kapitole, tato metoda používá 4 parametry při každém stupni poškození dle výsledků jemné manipulace, měřené ručním goniometrem: (i) equinózní deviace v sagitální rovině, (ii) varózní deviace ve frontální rovině, (iii) derotace calcaneopedálního bloku v horizontální rovině a (iv) relativní addukce přednoží v horizontální rovině.

4.1.2 Léčba

Základní principy Ponseti metody (Ponseti, 1996, 2000) jsou uvedeny v úvodní části této práce; na naší klinice používáme následující postup. Léčba začíná bezprostředně po přijetí, nejraději krátce po porodu a spočívá v postupné manipulaci nohy – zvětšování abdukce v supinaci - v korekčních sádrových obvazech. Protitlak působí na laterální plochu hlavice kosti hlezenní (obr. 20,21), aby se zabránilo rotaci talu v hlezenním kloubu. Sádrový obvaz obměňujeme v 5 – 8 denních intervalech; k dosažení abdukce 60 stupňů je třeba v průměru 5 korekčních sádrových obvazů (3 – 11).



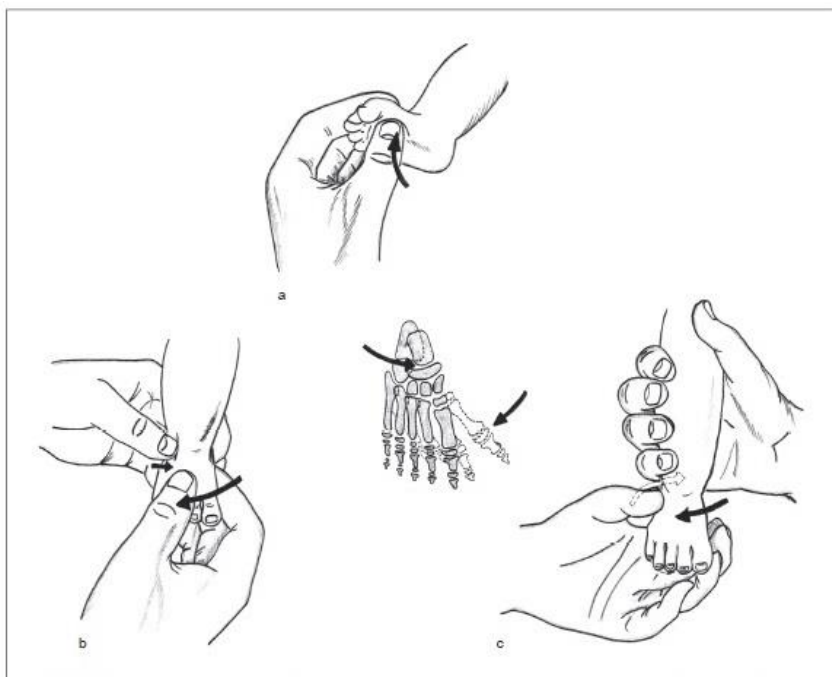
Obr. 20,21 Manipulace nohy dle Ponsetiho před naložením redresního sádrového obvazu

Nebylo-li dosaženo uvedeného stupně abdukce, pokračuje se nadále v sádrování ve stejných intervalech až do dosažení potřebného výsledku. Sádrový obvaz nakládáme vždy od prstů až na stehno po třísko, obvaz pouze pod koleno totiž neudrží patní kost v abdukci; koleno je přitom ohnuté do 90 stupňů (obr. 22). V jednotlivých sádrách korigujeme varozitu paty, addukci a inverzi přednoží a kavózní složku této deformity; equinozitu nekorigujeme, ta se upravuje sama při repozici patní kosti (obr. 23). Signálem k ukončení sádrování jsou: (i) hmatný interval mezi vnitřním kotníkem a os naviculare, (ii) dostatečně hmatný přední výběžek patní kosti, (iii) abdukce nohy do 60 stupňů a (iv) patní kost v neutrálním nebo lehce valgózním postavení (obr. 24). Byla-li přítomna všechna 4 kritéria, avšak equinozita v hlezenním kloubu zůstávala nadále nedostatečně korigována, tzn., že není možná dorziflexe alespoň 10 stupňů, indikujeme tenotomii Achillovy šlachy. Tenotomie se provádí za běžných aseptických kautel na operačním sále, obvykle v krátkodobé celkové anestezii. Tento způsob se liší od Ponsetiho (1996, Herzenberg a spol. 2002), který preferuje lokální anestezii. Sami užíváme lokální anestezii pouze v případě, je-li celková anestezie z různých lékařských důvodů kontraindikována. Tenotomie byla provedena u 276 z 303 léčených nohou. Skalpel zasuneme z mediální strany paralelně s Achillovou šlachou cca 1 cm nad hrbolem patní kosti, poté jej otočíme o 90 stupňů a přerušíme celou Achillovu šlachu tak, aby její obaly zůstaly co nejméně porušené. Ihned po výkonu naložíme sádrový obvaz v 60 stupňové abdukci a 10 stupňové dorziflexi. Matku s dítětem propouštíme obvykle druhý den po operačním výkonu. Sádrovou fixaci po tenotomii Achillovy šlachy snímáme po 3 týdnech a nakládáme abdukční dlahu, často nesprávně nazývanou dlahou Denis-Brownovou. Existuje více modelů těchto dlah: v principu se vždy jedná o 2 botičky spojené pelotou, které umožňují nastavení do zevní

rotace 60 - 70 stupňů; rozstup botiček na pelotě je určen vzdáleností ramínek. Jedná-li se o vadu jednostrannou, botičku se zdravou nohou nastavujeme do zevní rotace 40 - 45 stupňů. Děti nosí dlahu první 3 měsíce bez přerušení – je snímána pouze na koupel. Do 3 - 6 let je pak dlahu přikládána na 14 -16 hod. denně, tzn. na noční a denní spaní. Doba ukončení fixace je individuální a závisí na konkrétním klinickém obrazu daného pacienta. Rodiče jsou poučeni o nutnosti každodenního cvičení, spočívajícím především v protahování Achillovy šlachy. Kontroly na ambulanci provádíme nejprve v 6 týdenních intervalech; nedojde-li k recidivě, intervaly mezi kontrolami se postupně prodlužují až na 4 až 6 měsíců. Ortéza se snímá ve věku 3 let. S cvičením se pokračuje až do ukončení vývoje skeletu. Vyskytne-li se recidiva do 3 let věku, musí se shora zmíněný postup opakovat; k zvládnutí recidivy je zpravidla zapotřebí menšího počtu sádrových obvazů. Byl-li konzervativní způsob léčby recidivy neúspěšný, přistoupili jsme k chirurgickému výkonu. U pacientů starších 3 let jsme k léčbě recidiv použili pouze chirurgický zákrok.



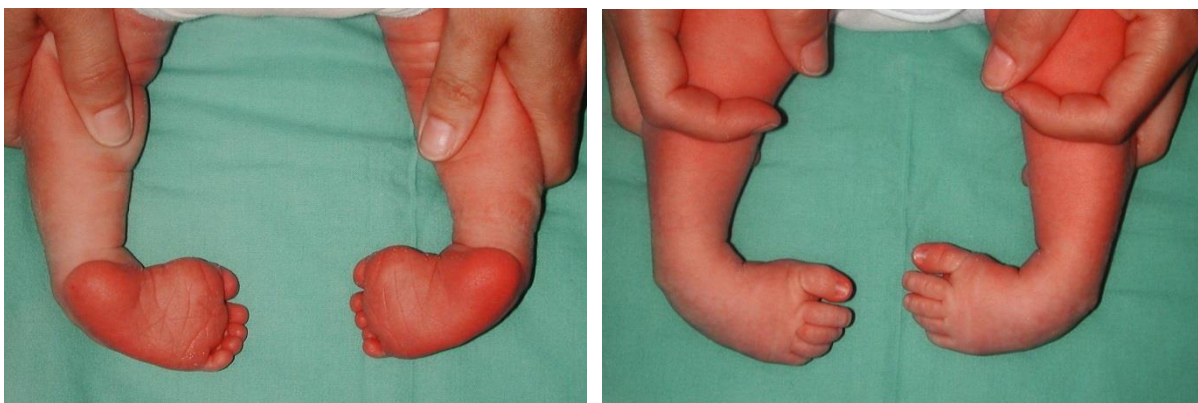
Obr. 22 Redresní sádrový odvaz sahá vždy nad koleno, které je ohnuto v pravém úhlu



Obr. 23 Ponsetiho způsob korekce PEC. a,b – dorziflexe I. praprsku, palec druhé ruky vykonává protitlak na prominující krček talu z laterální strany, přednoží je tlačeno do zevní rotace, c – pata je odtlačena od zevního kotníku, druhá ruka fixuje bérec.



Obr. 24 Poslední sádrový obvaz, kdy je dosaženo „překorigování vady“ do abdukce 60 stupňů.



Obr. 25,26 *Oboustranný rigidní PEC po narození*



Obr. 27,28 *Klinický snímek téhož pacienta po léčbě Ponsetiho metodou v 6 letech.*

4.2 Výsledky

Při peritalárním uvolnění (operace dle McKaye), kdy je cirkulárně obnažen celý subtalární kloub a to jak z mediální tak z laterální strany, jsme pozorovali, že struktura vazivové tkáně kloubního pouzdra a příslušných ligament se již makroskopicky výrazně liší. Na mediální straně je kloubní pouzdro rigidnější než kloubní pouzdro na laterální straně tarzu.

Ponsetiho metodou bylo v letech 2005 - 2012 léčeno celkem 195 pacientů (74% chlapců) (Tab. 1). U 108 dětí (55%) byl výskyt PEC bilaterální, takže celkový počet nohou, léčených Ponsetiho metodou, byl 303. Soubor se skládal z 16% pacientů, klasifikovaných dle Dimeglia

a spol.(1995) jako stupeň I (nejlehčí postižení), 30% jako stupeň II, 31% jako stupeň III a konečně 23% jako stupeň (nejtěžší postižení).

roky	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
nohy	55	40	38	34	42	43	34	17

Tab. 1 Počty léčených nohou s PEC v letech 2005 až 2012 na Ortopedické klinice Na Bulovce

Primární korekce bylo dosaženo ve všech případech konzervativním přístupem, tj. samotnými sádrovými obvazy či v kombinaci s tenotomií Achillovy šlachy; všechny 4 základní požadavky na ukončení sádrových obvazů (viz Metoda) byl splněny.

První recidiva se objevila 6 týdnů po zavedení abdukčních dlah. Stupeň recidiv se však u jednotlivých pacientů lišil: od částečných změn (equinus, addukce přednoží či varózní postavení calcaneu) až ke kompletní recidivě počátečního stavu. Všechny recidivy byly v počátku léčeny (do 3 let věku) konzervativním postupem. Byl-li opakovaný konzervativní postup neúspěšný (4 podmínky ukončení fixace nebyly splněny), byl indikován chirurgický přístup (u 82 pacientů – 40%, 111 nohou – 37%). Operační léčba byla provedena u 30% nohou postupem náležitým k Ponsetiho metodě (retenotomie AŠ, transpozice m. tibialis anterior) (Tab. 2) a v 70% pomocí alternativních technik (Tab. 3). Skupina pacientů s recidivou, indikovaná pro chirurgickou léčbu, se skládala z 8%, klasifikovaných jako stupeň I dle Dimeglia a spol. (1995), 25% jako stupeň II, 35% jako stupeň III a 35% jako stupeň IV. Průměrná doba od zahájení léčby k chirurgickému zákroku bylo 2,7 roku. V některých případech se recidivy objevily i po chirurgickém zákroku: u 13 nohou 2x, u 3 nohou 3x a v jednom případě 5x. Počet recidiv indikovaných k chirurgickému zákroku, stoupal se stoupající dobou sledování (Tab. 3). Zatímco u pacientů, u kterých byla léčba zahájena v r. 2005 se recidivy objevily v 72%, pak u pacientů zařazených do studie v r. 2011 dosáhla počet recidiv jen 3%.

roky	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
nohy	16	4	6	3	2	0	1	0

Tab. 2 Počty nohou s recidivou; indikace k operační léčbě v rámci Ponsetiho metody (retenotomie Achillovy šlachy, transpozice musculus tibialis ant.)

Zahájení léčby	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
pacienti	28	19	15	8	7	1	2	0
nohy	40	26	21	11	8	2	3	0

Tab. 3 Počet nohou s recidivou indikovaných k operační léčbě (rok udává zahájení léčby pacienta)

Typy operací	
Tenotomie AŠ	274
Retenotomie AŠ	16
Osteotomie tarzu	40
Dorzální uvolnění	21
Posteromediální uvolnění	14
Peritalární uvolnění	34
Supramaleolární osteotomie	1
Osteotomie přednoží	6
Transpozice MTA	47

Tab. 4 Celkový počet jednotlivých operací v našem souboru.

4.3 Diskuse

Hlavním výsledkem této studie byl nález významného rozdílu mezi hodnocením krátkodobých a dlouhodobých výsledků Ponsetiho metody v léčbě PEC. Počet recidiv v průběhu prvních tří let léčby, indikovaných pro chirurgickou léčbu, byl významně nižší (5%) ve srovnání s pacienty, u nichž léčba začala před 6 – 8 lety (65%). K vysvětlení tohoto nálezu je zapotřebí – zvláště pro nejstarší skupinu (rok 2005) – vzít v úvahu „learning curve“ stejně jako skutečnost, že jsme prováděli pouze skluznou tenotomii Achillovy šlachy, namísto kompletní tenotomie Achillovy šlachy. Na druhé straně výsledky z r. 2007 a pozdější byly významně lepší: počet recidiv dosáhl pouze 44%. Můžeme proto uzavřít, že primární korekce PEC je možná u téměř 100% pacientů, avšak pro korekci recidiv je třeba v některých případech použít chirurgický přístup.

Konzervativní řešení vzdorujících recidiv sádrováním u pacientů starších 3 let je dle našich

zkušeností velmi obtížné, především pro nižší poddajnost vyvíjející se fibrotické tkáně. Je však zapotřebí upozornit, že přísná věková hranice limitující úspěšnost tenotomie Achillovy šlachy, neexistuje. Nezaznamenali jsme žádné poruchy hojení Achillovy šlachy: hmatný rigidní pruh se objeví již 3 týdny po tenotomii, což svědčí pro úspěšnou regeneraci. Údaje o možných komplikacích jsou vzácné; tenotomie Achillovy šlachy by měla být považována za konzervativnější metodu než agresivní léčba sádrovými obvazy (Dogan a spol., 2008). Jsme proto přesvědčeni že komplexní léčba PEC vyžaduje nejen exaktní znalosti konzervativního přístupu, ale též různých postupů chirurgických, jako je dorzální a peritalární uvolnění, osteotomie zadní a přední části nohy, stejně jako supramaleolární osteotomie, zvláště při léčbě neurogenní PEC, kde je přítomnost recidiv mnohem častější (Iltara a spol. 2010).

Patogenetické mechanismy, které se podílejí na vzniku PEC, dosud známy nejsou a možné hypotézy budou diskutovány v dalších kapitolách dizertační práce. Údaje o pohlavních rozdílech v incidenci PEC nejsou koncizní. Iltar a spol. (2010) pozorovali, že na začátku léčby byly dle Dimegliovy klasifikace deformity častější u chlapců než u děvčat, konečné skóre bylo však u obou pohlaví srovnatelné. Obecně lze říci, že dle literárních údajů činí poměr chlapců a děvčat 2:1, v našem souboru to bylo 3:1, Morcuende a spol. (2004) pozorovali dokonce poměr 4:1. Souhlasíme s názorem Radlera a spol. (2007), že radiografické měření dětské nohy není příliš spolehlivé. Uvádí, že dochází ke zkreslení při určování linií, představujících osy osifikujících jader, které se v časných stádiích vývoje často jeví jako kruhové.

Existuje velké množství studií, poukazujících na skutečnost, že recidivy po korekci jsou dány nedostatečně pečlivou fixací (Abdelgawad a spol., 2007, Yagmurlu a spol., 2011). Jestliže rodiče pacientů nedodržují pokyny lékaře, lze očekávat mnoho různých malých i velkých recidiv. Morcuende a spol. (2004) pozorovali, že recidivy se vyskytují jen u 6% spolupracujících rodin a ve více jak 80% rodin nespolupracujících. Sami jsme pozorovali recidivy u pacientů, kde rodina zkracovala dobu fixace. Dobbs (Dobbs a spol., 2004, Dobbs a Garnett, 2009) upozornil, že úroveň rodičovské výchovy je dalším významným rizikovým faktorem; naše výsledky tyto názory potvrzují. Podle Gibbonse a Graye (2013) se nejvíce recidiv objevuje v průběhu nošení abdukční ortézy.

4.4 Závěry

Závěrem je možno říci, že cílem jakékoliv léčby PEC je dosáhnout kosmeticky přijatelného výsledku s pružnou, funkční, nebolestivou, plantigrádní nohou. Ani Ponsetiho metoda není schopna upravit celou deformitu, ale přináší značné zlepšení. Je jasné, že toto zlepšení vytváří lepší výchozí pozici pro chirurgickou úpravu přes to, že nedosáhne dokonalé úpravy nohy. Souhlasíme s názorem Yagmurlu a spol. (2001), že Ponsetiho metoda by měla být použita v kterémkoliv věku pacienta s PEC přinejmenším proto, aby bylo dosaženo alespoň částečné úpravy této deformity. Naše výsledky však naznačují, že úprava PEC pouze sádrováním, tenotomií Achillovy šlachy a eventuální transpozicí m. tibialis anterior je nemožná.

5. PROTEOMICKÁ ANALÝZA EXTRACELULÁRNÍ MATRIX U PES EQUINOVARUS CONGENITUS

5.1 Metoda

5.1.1 *Pacienti a vzorky tkáně*

Do studie bylo zařazeno celkem 18 pacientů (13 chlapců a 5 dívek) s diagnózou PEC, léčených na Ortopedické klinice Na Bulovce v letech 2011 – 2013. Léčba začala mezi 1. a 8. týdnem života a spočívala v jemné manipulaci nohy a aplikaci 5 – 9 (v průměru 6) sádrových obvazů nad koleno dle Ponsetiho (1996). Perkutánní tenotomie Achillovy šlachy byla provedena u 12 pacientů. Primární korekce bylo dosaženo ve všech případech.

Vzorky tkáně byly získány od pacientů, operovaných pro recidivu PEC (stáří 1 – 7 let, průměr 4 roky); subtalární uvolnění bylo provedeno u 13 pacientů, transfer m. tibialis ant. s osteotomií os cuneiforme a os cuboideum u 3 pacientů a dorzomediální uvolnění u 3 dětí. Kontrahovaná tkáň byla odebrána z mediální části talonaviculárního skloubení. U 5 pacientů byly pro srovnání odebrány vzorky z mediální a laterální strany talonaviculárního skloubení. Tkáň byla bezprostředně po odebrání zmrazena a poté použita pro analýzu proteinového složení. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice Bulovka a rodiče pacientů poskytli písemný souhlas.

5.1.2 *Jednodimenzionální a dvoudimenzionální gelová elektroforéza*

Jednodimenzionální gelovou elektroforéza (SDS-PAGE) byla prováděna na 10% polyakrylamidových 1mm gelech. Tato metoda byla prováděna na přístroji Mini-Protean Tetra cell systému (Bio-Rad) při napětí 200 V, 50 minut. Koncentrace vzorků byla 2,2mg na 1 ml vzorkového roztoku (1% SDS; 0,5% merkaptoethanol), nanáška vzorku na gel byla 5 ul. Gely byly po elektroforéze barveny barvou Bio-Safe Coomassie Blue G250 stain (Bio-Rad). Po obarvení byly gely skenovány na přístroji GS-800 Calibrated Densitometer a vyhodnoceny pomocí vyhodnocovacího programu (Quantity One; Bio-Rad).

Dvoudimenzionální gelovou elektroforéza (2D-GE) byla prováděna na 10% polyakrylamidových 1mm gelech. Část lyofilizovaného vzorku (1mg) byla lyzována v 140 ul lyzačního pufru (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 2% (váha/objem) 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulphonát (CHAPS), 0,2% (váha/objem) Bio-Lyte ampholyt (3–10 pH) a 1% (váha/objem) dithiothreitol). Proteiny vzorku byly dále přeneseny na gelové stripy (Ready Strip IPG Strips (pH 3–10 nelineární, 7 cm; Bio-Rad). Isoelektrická fokusace probíhala na těchto stripech na přístroji Pro-tean IEF cell system (Bio-Rad) dle instrukcí výrobce (Bio-Rad). Po izoelektrické fokusaci se stripy zalily nad 10% akrylamidový gel roztokem 0,5% agarózy. Dále byl postup shodný s elektroforézou SDS-PAGE

5.1.3 Příprava vzorků pro LC-MS/MS

Všechny vzorky byly třikrát omyty redestilovanou vodou, lyofilizovány a štípány na peptidy roztokem, obsahujícím NH_4HCO_3 (0,05 mol/L) a trypsin (0,2mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USDA) 1/100 (váha/váha-trypsin/vzorek) 3 h při teplotě 37° C. V průběhu štěpení trypsinem byly vzorky zbaveny tuku pomocí 0,3 mL acetonu a ponechány přes noc při teplotě -20° C. Tento proces byl třikrát opakován a vzorky byly poté centrifugovány při 10 000xg. Lyofilizované pelety byly štěpeny ještě jednou v 0,2mL roztoku, obsahujícím NH_4CO_3 (0,05 mol/L) a trypsin (0,04 mg/mL) (1/100 w/w trypsin/vzorek) při teplotě 37° C přes noc. Vzorky byly poté zfiltrány (velikost pórů 0,45 μm , Miller-HV, Japonsko) a bílkoviny byly extrahovány pomocí zip-tip C18 (Supel-Tips C18, TPSC18-96EA, Supelco, PA, USA). Extrahované vzorky byly lyofilizovány a rozpuštěny ve 24 μL 1% kyseliny mravenčí.

5.1.4 Analýza kolagenní frakce

Vzorky tkáně byly homogenizovány a poté natráveny 20 h pomocí pepsinu v 0,5 M CH_3COOH při teplotě 4° C (poměr 12% vlhké tkáně). Vzorky byly pak centrifugovány (15 000xg po 2 h) a extrakt byl lyofilizován. Vzorky lyofilizované kolagenní frakce byly rozpuštěny v elektroforetickém pufru a separovány pomocí dodecyl sulfidové polyakrylamidové gelové elektroforézy. Gely s elektroforeticky oddělenými vzorky byly nanášeny na nitrocelulóзовou membránu (20 h 500 mA/52 V) a membrány byly analyzovány elektrochemicky pomocí

Western blotů. Primární polyklonální králičí protilátky (1:500) byly použity pro detekci kolagenu typu I (abcam c.n. ab 292, abcam USA) a kolagenu typu III (abcam c.n. ab 7778). Jako sekundární byly použity peroxidázou značené králičí IgG protilátky (1:250) (Sigma c.n. A0545). Jednotlivé kolagenní frakce byly stanoveny pomocí chemiluminiscence.

5.1.5 Analýza tryptického extraktu pomocí LC-MS/MS

K proteinové analýze byl použit nano-LC přístroj Proxeon Easy-nLC (Proxeon, Odense, Dánsko) připojený pomocí nanoelktrosprayeru k maXis Q-TOF hmotovému spektrofotometru s ultra vysokým rozlišením (Bruker Daltonics, Brémy, Německo). nLC-MS/MS přístroje jsou řízeny softwarem HyStar 3,2 a microOTOFcontrol 3,0. Data byla shromažďována a analyzována pomocí softwaru Protein-Scape 3,0 a Data/Analysis 4,0 (Bruker Daltonics). Směs peptidů byla vstříknuta do kolony NS-AC-11-C18 Biosphere C18 (velikost částic 5 μ m, velikost pórů 12nm, délka kolony 150 mm, vnitřní průměr 100 μ m) (NanoSeparation, Nieuwkoop, Holandsko).

Separace peptidů byla dosažena lineárním gradientem mezi mobilní fází A (voda) a B (acetonitril), obě obsahující 0.1% (v/v) kyseliny mravenčí. Separace byla zahájena 5% mobilní fází B, následovala gradientová eluce do 30% B během 70 min. Dalším krokem byla eluce lineárním gradientem na 50% B během 10 min a pak během 8 min do 100% B. Nakonec byla kolona promyta 100% B 2 min. Ekvilibrace před následujícím krokem bylo docíleno promytím kolony 5% mobilní fází B po 10 min. Rychlost průtoku byla 0,25 μ /min a kolona udržovaná v okolní teplotě (25° C).

Byla použita online nano-electrospray ionizace (nano-ESI) v pozitivním módu. ESI napětí bylo nastaveno na +4,5 kV, skenovací čas byl 1,3 Hz. Operační podmínky: vysušující plyn (N₂), 1 litr min⁻¹; teplota plynu 160° C; tlak 40 kPa. Experimenty byly provedeny skenováním od 2,200 m/z. Referenční použitý iont (vnitřní standard) byl iont C₂₄ H₁₉ F₃₆ N₃ O₆ P₃ (1221.9906 m/z). Hmotová spektra, odpovídající každému signálu z chromatogramu byly zprůměrnovány, což umožňuje přesné molekulární hmotové stanovení. Všechny LC-MS/MS analýzy byly prováděny v duplikátu.

5.1.6 Aminokyselinová analýza

Aminokyselinová analýza byla prováděna pomocí systému PICO-TAG Amino Acid Analysis System (Waters, Milford, USA). Metoda využívala derivatizace fenylothiocyanátem (prováděnou dle instrukcí výrobce), následovanou separací vzniklých produktů pomocí HPLC chromatografií na koloně s obrácenou fází (C18; kolona Pico-Tag 300x 3,9 I.D. mm; Waters USA) za použití acetátového pufru (pH 6,4; 0,14 mol/L) - acetonitrilový gradient (dle instrukcí výrobce). Hydrolyza proteinů byla prováděna pomocí par HCl (6mol/l HCl s 2% fenolem) 20 h při teplotě 110° C ve zkumavce pod vakuem (a následně dusíkem).

5.1.7 Vyhledávání v databázi

Data z hmotového spektrometru byla vyhodnocena pomocí softwaru ProteinScape. Bílkoviny byly identifikovány korelací tandemových hmotových spekter pomocí IPI a SwissProt databází, za použití vyhledávacího programu MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Taxonomie byla soustředěna na *Homo sapiens*. Trypsin byl vybrán jako enzymový parametr štěpení. Hmotová tolerance byla zvolena $\pm 10,0$ ppm pro MS a $\pm 0,05$ Da pro MS/MS. U cysteinů byla předpokládána karbamidomethylace, u prolinu a lysinu hydroxylace, u serinu, threoninu a tyrosinu fosforylace, u methioninu oxidace. Všechny tyto možné modifikace byly nastaveny jako variabilní. Monoisotopický peptidový náboj byl nastaven na 1+, 2+ a 3+. Akceptovány byly pouze signifikantní nálezy proteinů (MASCOT skóre > 80 (<http://www.matrixscience.com>)).

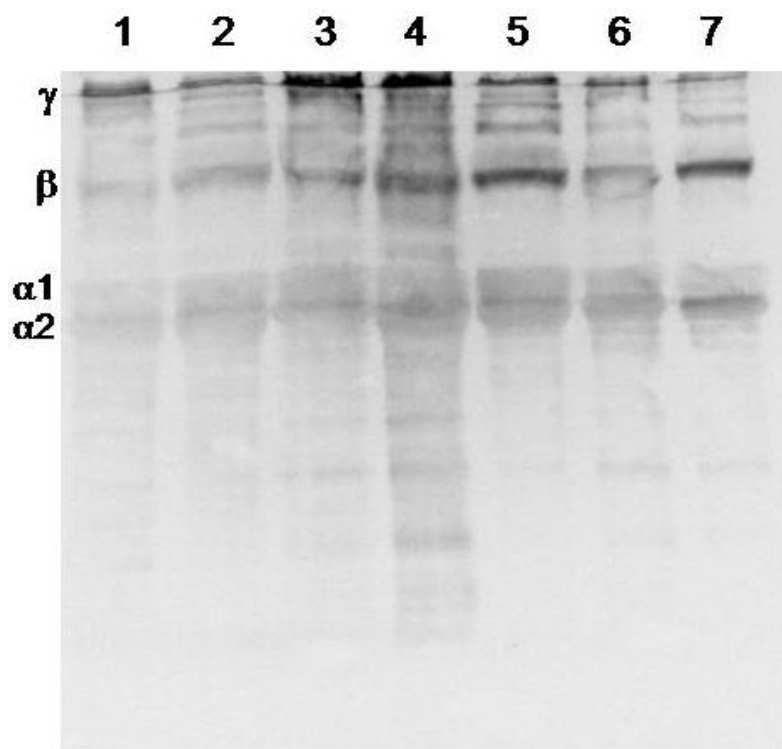
5.2 Výsledky

5.2.1 Gelová elektroforéza:

Jednodimenzionální ani dvojdimenzionální polyakrylamidovou elektroforézou se nepodařilo nalézt signifikantní rozdíly v obsahu proteinů mezi mediální (M) a laterální (L) stranou subtalárního kloubu (obr. 29 – 33). To znamená, že obsah kolagenu I a III se v obou vzorcích nelišil.

Vzhledem k tomu, že makroskopický vzhled vzorků, odebraných z mediální (tužší oblasti) se

od vzorků, izolovaných z laterální části významně liší, předpokládali jsme, že za uvedené rozdíly mohou být zodpovědné jiné proteiny než kolageny I a III. Použili jsme proto jako první protické analýzy bílkovinného složení pouzdra talonaviculárního kloubu u PEC.



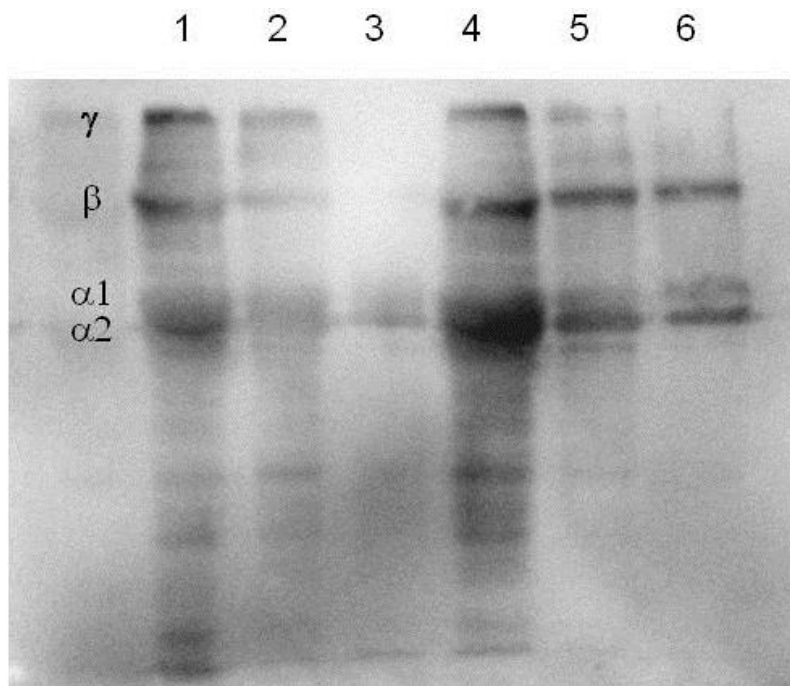
Obr. 29 Analýza kolagenu typu I

Jednodimenzionální polyakrylamidová elektroforéza; srovnání vzorků odebraných z mediální a laterální strany nohy s PEC (M – mediální strana, L – laterální strana).

1-M, 2-M, 3-L, 4-M, 5-M, 6-M, 7-L

Gama frakce – polymery jednotlivých řetězců alfa 1 a 2

Beta frakce – dimery řetězců alfa 1 a 2 a jejich nízkomolekulární štěpy.



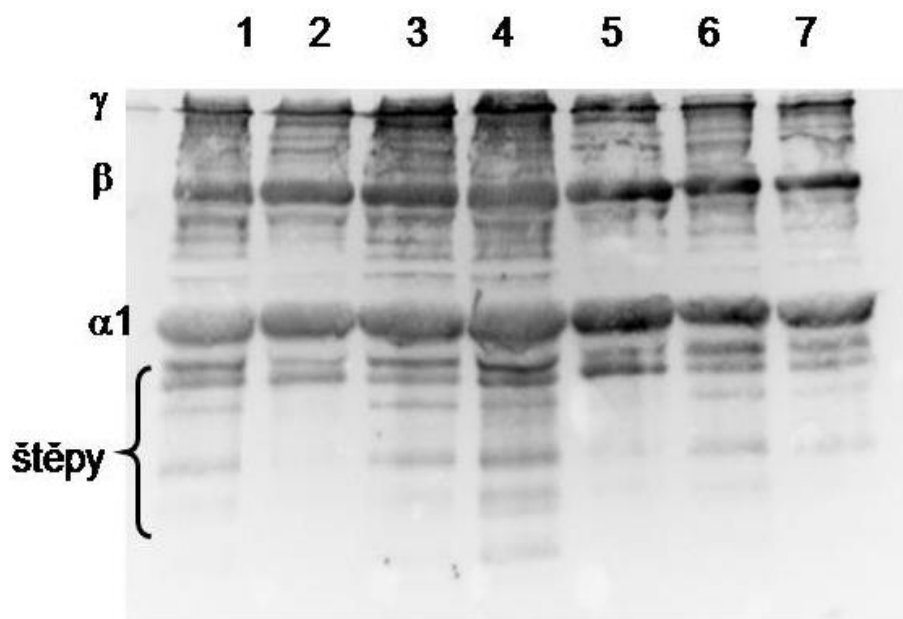
Obr. 30 Analýza kolagenu typu I

Jednodimenzionální polyakrylamidová elektroforéza ke srovnání vzorků odebraných z mediální a laterální strany nohy s PEC (M – mediální strana, L – laterální strana).

1-M, 2-M, 3-L, 4-M, 5-L, 6-L

Gama frakce – polymery jednotlivých řetězců alfa 1 a 2

Beta frakce – dimery řetězců alfa 1 a 2 a jejich nízkomolekulární štěpy.



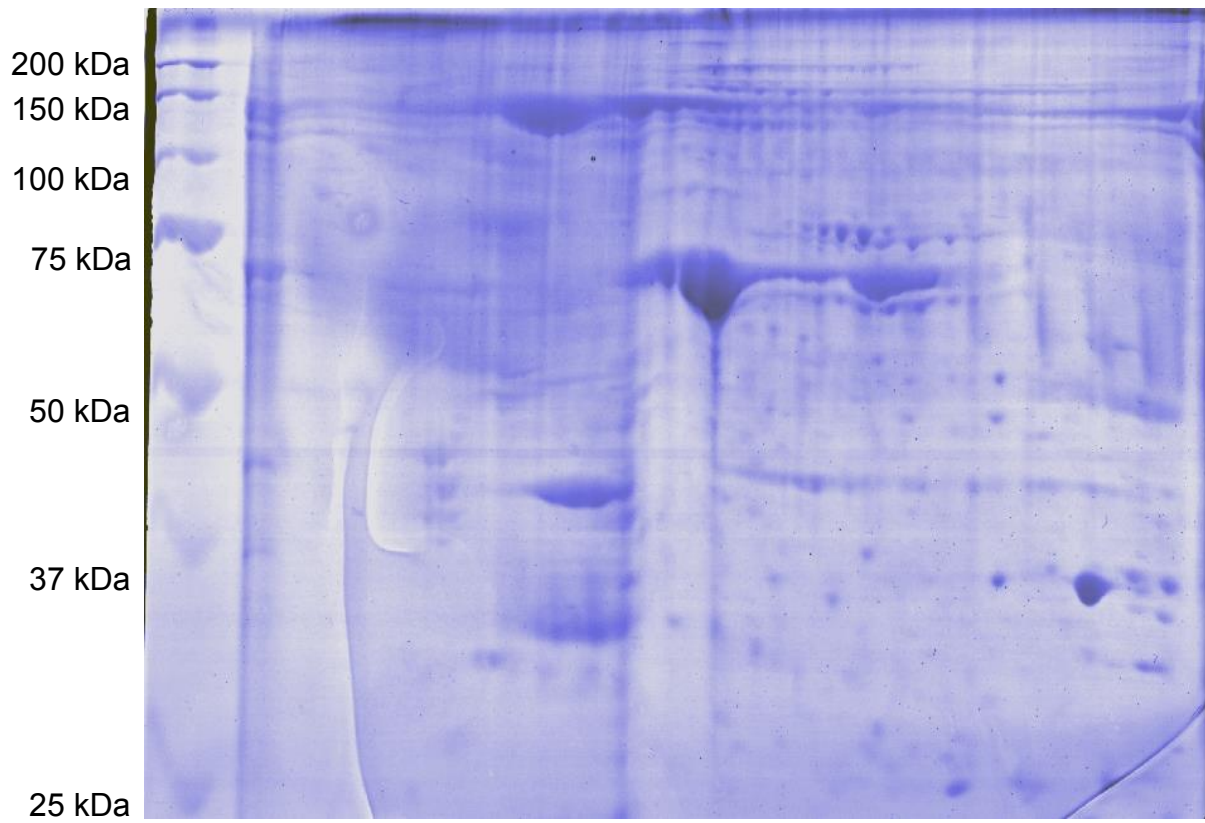
Obr. 31 Analýza kolagenu typu III

Jednodimenzionální polyakrylamidová elektroforéza ke srovnání vzorků odebraných z mediální a laterální strany nohy s PEC (M – mediální strana, L – laterální strana).

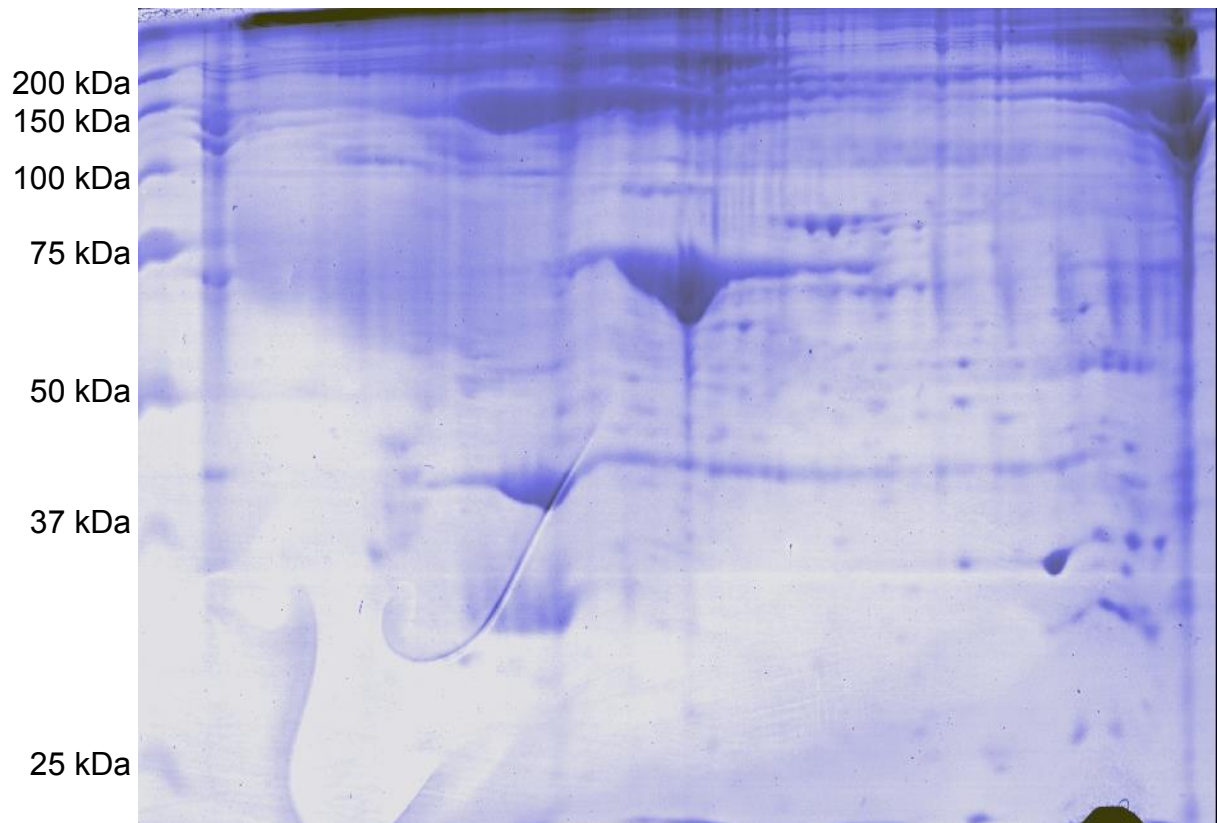
1-M, 2-M, 3-L, 4-M, 5-M, 6-M, 7-L

Gama frakce – polymery jednotlivých řetězců alfa 1

Beta frakce – dimery řetězců alfa 1 a 2 a jejich nízkomolekulární štěpy.



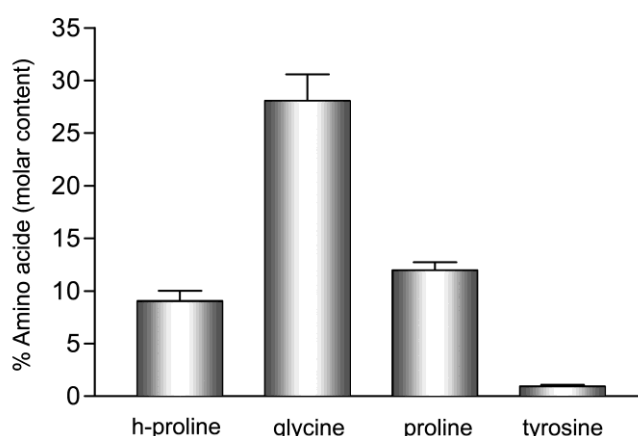
Obr. 32 *Dvoudimenzionální polyakrylamidová elektroforéza vzorku odebraného z mediální strany nohy s PEC.*



Obr. 33 *Dvoudimenzionální polyakrylamidová elektroforéza vzorku odebraného z laterální strany nohy s PEC.*

5.2.2 Aminokyselinová analýza

Aminokyselinová analýza tkáňových vzorků ukázala převahu kolagenů, především kolagenu I, III a VI. Podíl glycinu byl vždy přibližně 28% a prolinů (tj. prolin + hydroxyprolin – h-prolin) 21% (obr. 32). Vysoký molární obsah glycinu a h-prolinu, přítomných ve srovnatelných hladinách, naznačují převahu kolagenů I a III.



Obr. 34 Aminokyselinová analýza

Molární množství jednotlivých aminokyselin bylo porovnáno s molárním množstvím tyrozinu

5.2.3 Bílkoviny extracelulární matrix

Identifikováno bylo celkem 19 bílkovin extracelulární matrix (Tab. 5). Hlavní součástí všech analyzovaných vzorků byly fibrilární kolageny typu I a III, které jsou hlavními proteiny extracelulární matrix. Navíc byly zjištěny další typy kolagenů, zvláště kolageny V, VI a XII. Mezi ostatními 14 proteiny je bílkovina ABI3PB, malý na leucin bohatý proteoglykan biglykan, na leucin bohaté proteoglykany asporin a prolargin, proteoglykan osteoglycin/mimecan, na stres citlivý proteoglykan fibromodulin, keratin sulfát proteoglykan lumican, membránová primární aminosyláza, velký proteoglykan versican, glykoprotein tenascin-x, který se vyskytuje pouze ve fibroblastech, fibronectin, vysokomolekulární glykoprotein, který váže kolagen, periostin, TGF β -indukující matricelulární protein a TGF β -indukovaný protein IG-H3 (TGF β 1p).

Accession n.	Protein Name	Score	Peptides	S.C. [%]	Hits	Molecular Function
IPI00297646	Collagen type I alpha-1 chain	4980.7	104	50.1	13	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00304962	Collagen type I alpha-2 chain	3985.3	78	60.2	13	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00021033	Collagen type III alpha-1 chain	2114.0	51	41.5	13	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00220701	Collagen type VI alpha-3 chain	1706.7	39	18.5	13	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00291136	Collagen type VI alpha-1 chain	948.5	19	30.6	13	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00304840	Collagen type VI alpha-2 chain	778.2	17	26.1	11	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00010790	Biglycan	471.6	10	49.8	10	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00020987	Prolargin	379.4	9	30.6	11	Cytoskeletal anchoring activity
IPI00025465	Osteoglycin (Mimecan)	313.0	7	25.0	9	Growth factor aktivita
IPI00000860	Fibromodulin	300.6	8	25.8	8	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00018219	Transforming growth factor- β -induced protein ig-h3	294.6	8	19.2	6	Receptor binding
IPI00020986	Lumican	229.4	6	19.5	4	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00221384	Collagen alpha-1(XII) chain	241.4	5	3.8	3	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00418431	Asporin	192.5	7	17.4	7	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00004457	Membrane primary amine oxidase	183.4	4	11.7	1	Cell adhesion molecule aktivita
IPI00215630	Versican	179.5	5	9.0	3	Extracellular matrix structural konstituent
IPI00844090	Collagen alpha-1(V) chain	172.0	2	2.5	1	Extracellular matrix structural konstituent
IPI01011141	Tenascin	161.7	5	3.7	1	Cell adhesion molecule aktivita
IPI00440822	ABI3BP Isoform 1 of Target of Nesh-SH3	143.5	2	3.0	1	Unknown
IPI00910262	Periostin	136.2	3	11.6	1	Cell adhesion molecule aktivita
IPI00479723	Fibronectin	121.8	3	2.0	1	Extracellular matrix structural konstituent

Tab. 5 Seznam proteinů detekovaných v nLC-MS/MS

Accession N – indikace proteinu v IPI (interanational protein index) databázi (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/IPI>); *Score* = Mascot skóre; *Peptides* = počet jednotlivých peptide detekovaných ve vzorcích; *S.C.* = Sequence coverage (%); *Hits* = počet vzorků, kde byl protein signifikantně detekován. Molekulární funkce proteinů v biologických procesech byly kategorizovány podle klasifikace, používané ve veřejné databázi dostupné na <http://www.hprd.org>.

Protein	MW [kDa]	n. of peptides	coverage [%]
COL6A1 Collagen alpha-1(VI) chain	108.5	10	13.2
ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	8	16.7
COL6A3 Isoform 2 of Collagen alpha-3(VI) chain	321.2	10	4.9
COL6A2 Isoform 2C2 of Collagen alpha-2(VI) chain	108.5	8	9.9
COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	7	8.1
COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5	6.1
TGFBI Transforming grow factor beta 75 kDa protein	45.4	3	6.3
POSTN Isoform 4 of Periostin	83.8	2	4.5
OGN similar to Mimecan	40.5	2	7.3
COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	3	3.5
HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	1	10.6
ANXA2 Annexin A2	38.6	1	3.2
KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	1	3.9
LUM Lumican	38.4	1	3.3
HSPG2, Perlecan, Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	468.5	1	0.4
PRELP Prolargin	43.8	1	2.6
ANXA1 Annexin A1	22.7	1	5.4

Tab. 6 SPL list 5 vzorků odebrané z mediální strany a 5 vzorků odebrané z laterální strany u nohou s PEC. Oranžově zvýrazněny proteiny, jejichž zastoupení bylo na mediální straně nejméně 2x větší než na straně laterální.

Proteomická analýza vzorků z mediální a laterální části kloubního pouzdra naznačila možné rozdíly v proteinovém složení obou vzorků: obsah kolagenu VI, asporinu, mimecanu, prolaminu a TGFbeta byla větší v mediální, tužší části kloubního pouzdra (tab. 6 – 8). Kvantitativní analýza bude předmětem další práce.

	v x vzorcích M		v x vzorcích L		SPL 5xM/5xL
	z 6ti vz.	z 10ti vz.	z 8ti vz.	z 9mi vz.	
	1. měření	2. měření	1.měření	2. měření	
TGFB-transforming growing factor beta	4x	2x	0x	0x	ANO
ASPN-asporin	5x	2x	0x	1x	NE
OGN-osteoglycin (mimecan)	5x	5x	2x	3x	ANO
PRELP-prolargin	6x	5x	1x	6x	ANO
LUM-lumican	0x	5x	1x	2x	ANO
Fibronectin	0x	1x	0x	0x	NE
BGN-biglican	5x	5x	2x	5x	NE
TNC-tenascin	0x	1x	0x	0x	NE

Tab. 7 Porovnání vzorků z mediální a laterální strany nohy u pacientů s PEC

	1. měření	2. měření	celkem
M			
I peptidy	335	66	401
VI peptidy:	226	244	470
III peptidy	80	254	334
L			
I peptidy	330	62	392
VI peptidy:	86	257	343
III peptidy	93	160	253
	1. měření	2. měření	celkem

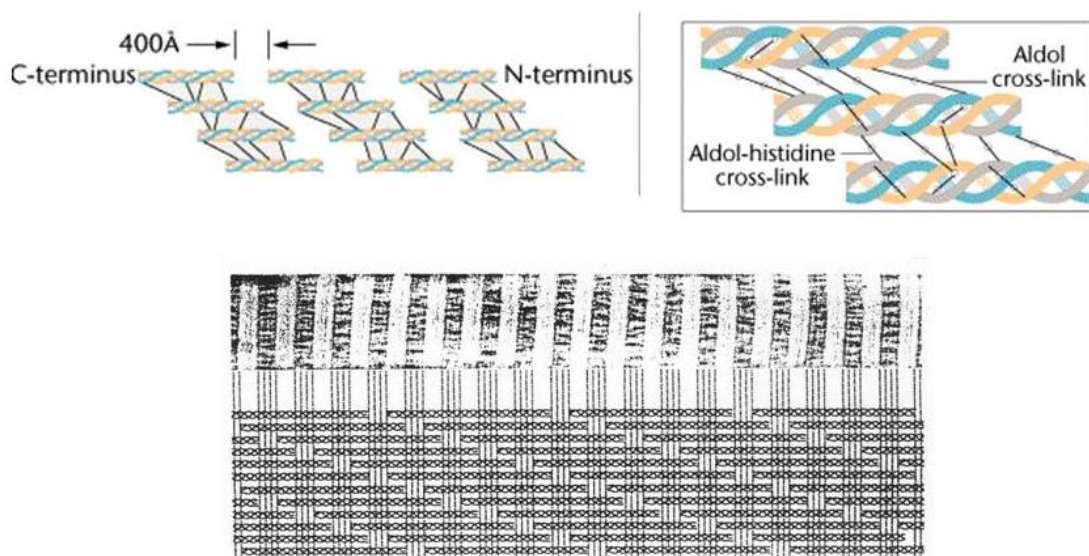
Tab. 8 Jednotlivá měření vzorků M - mediální strana, L - laterální strana a celková suma kolagenů I, VI a III

5.3 Diskuze

Extracelulární matrix představuje komplexní strukturu, složenou z četných proteinů, včetně kolagenů glykoproteinů, malých na leucin bohatých proteoglykanů a jiných bílkovin se stechiometrickou organizací, dávající extracelulární matrix a příbuzným tkáním jejich jedinečnou strukturální a funkční charakteristiku (Mikesh a spol., 2013). Hlavním výsledkem

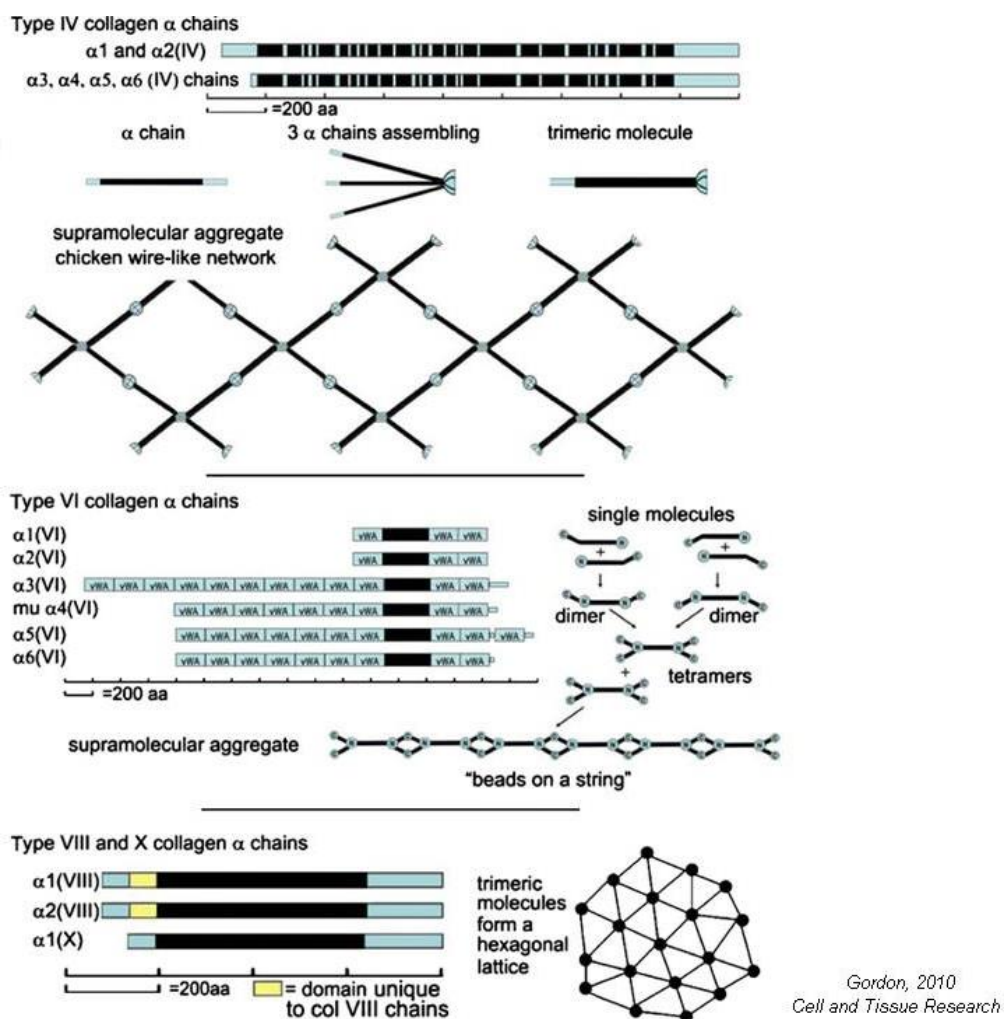
naši studie je pozorování, že extracelulární matrix u PEC je složena – kromě již popsaných kolagenů I a III a TFG β - z dalších 16 proteinů, včetně kolagenů V, VI a XII (Li a spol., 2001, Poon a spol., 2009, Ošťádal a spol., 2014).

Kolageny představují skupinu molekul, které buňky používají pro vytváření strukturální integrity a funkce. Tři α řetězce, které tvoří trojitý helix molekuly kolagenu, se skládají z opakujících se peptidových tripletů glycin–X–Y. X a Y mohou představovat různé aminokyseliny, ale nejčastěji jsou to prolin a hydroxyprolin. Funkce kolagenu závisí na supramolekulárním uspořádání molekuly do agregátů, které se stanou součástí matrix. Z celkem 28 dosud popsaných typů kolagenu převažuje u člověka 5 typů (Gordon a Hahn, 2010). Hlavní komponentou extracelulární matrix u PEC jsou kolageny typu I a III. Kolagen I je nejčastěji lokalizován v kůži, šlachách, vazivu, kostech, v rohovce atd., kde představuje něco mezi 80 a 90% celkového kolagenu. Trojitý helix kolagenu je tvořen dvěma $\alpha 1$ a jedním $\alpha 2$ řetězcem. Podíl kolagenu I v jednotlivých tkáních se mění v průběhu vývoje a za různých patologických stavů. Kolagen typu III je normální součástí kůže (10-20%) a byl popsán v řadě dalších vazivových tkáních; je přítomen v různém množství v kombinaci s kolagenem I. Trojitý helix kolagenu III je tvořen třemi $\alpha 1$ řetězci. Poměr kolagen I : kolagen III se charakteristickým způsobem mění v průběhu ontogenetického vývoje: v časném fetálním období je kolagen III více zastoupen než kolagen I. Podobně se preponderance kolagenu III a pozdější změna k poměru 3:1 vyskytuje při kožním hojení ran (Nimni, 1983)



Obr. 35 Kolageny I,II,III,V,IX,X – uspořádání do fibril

V naší studii jsme jako první prokázali, že extracelulární matrix u PEC je tvořena rovněž kolageny typu V, VI a XII. Typ V se ve velkém množství nachází ve stěně cév, kde je, zdá se, syntetizován hladkými svalovými buňkami; je složen ze tří řetězců α_1 , α_2 a α_3 . V diferencované chrupavce jsou protilátky proti kolagenu V lokalizovány v pericelulární matrix v lakunách chrupavky (Gay a spol., 1981, Chen a spol., 2014). Tento typ může být specifickou formou kolagenu, která svou lokalizací na povrchu buňky přispívá k modifikaci jejího tvaru, k tvorbě exocytoskeletonu a k vazbě na ostatní součásti vazivové tkáně (Gay a spol., 1981).



Obr. 36 Kolageny IV, VI, VII a X tvořící prostorové síť

Mikrofibrilární kolagen typu VI je jedinečným členem rodiny kolagenů, který je přítomen v extracelulární matrix (Gordon a Hahn, 2010, Sabatelli a spol., 2012a). Sabatelli a spol.

2012b) pozoroval sníženou a diferencovanou lokalizaci nových $\alpha 5$ a $\alpha 6$ řetězců v kosterním svalu ve srovnání s početnými $\alpha 3$ řetězci, což naznačuje, že tyto nové řetězce hrají zvláštní úlohu ve specializovaných strukturách extracelulární matrix. Kolagen VI je přítomen v lidských vazivových tkáních, jako jsou kloubní ligamenta, šlachy a kůže. Ve skutečnosti je hlavní funkcí kolagenu VI tvořit záchytnou síť, která spojuje kolagenní vlákna a okolní matrix (Groulx a spol., 2011). Kolagen typu VI hraje rozhodující roli při svalové funkci, jak je patrné z mutací, vyvolávajících betlémskou myopatii a Ulrichovu vrozenou svalovou dystrofii (Lampe a Bushby, 2005, Kim a spol., 2012). Svaly, které postrádají kolagen VI, mají dilatované sarkoplasmatické retikulum a nefunkční mitochondrie (Grumati a spol., 2011). Latentní mitochondriální dysfunkce se vyskytuje jak ve svalových buňkách, tak ve fibroblastech, odvozených ze svalových kultur pacientů se shora zmíněnými svalovými dystrofiemi, což svědčí o významné úloze mitochondrií v patogenezi těchto poruch. Kolagen XII je člen tzv. FACIT kolagenů (fibril-associated collagens with interrupted triple helices); je zvýšen v permanentních lidských a myších rohokových jizvách (Massoudi a spol., 2012) a zřejmě hraje roli v architektuře stromatu a uspořádání fibril (Mikesh a spol., 2013).

Dostupné informace o funkci dalších proteinů, které jsme poprvé popsali v extracelulární matrix u PEC, jsou, bohužel, velmi nedostatečné. Proteoglykany byly poprvé izolovány v bazálních membránách embryonálních tkání. Malé, na leucin bohaté proteoglykany, jako biglykan, se podílejí na uspořádání kolagenních fibril; jejich fragmentace je zřejmě spojena se změnami metabolismu kolagenu v průběhu rozvoje onemocnění, doprovázených remodelací extracelulární matrix, jako je revmatoidní artritida a jaterní fibróza (Genovese a spol., 2013). Na leucin bohaté proteoglykany jako je asporin (který působí společně s $TGF\alpha$) a prolargin (který váže heparin sulfát proteoglykan perlekan basální membrány a kolagen typ I) se účastní remodelace srdečního svalu v průběhu ischemicko/reperfusního poškození srdečního svalu (Barollobre-Barreiro a spol., 2012). Proteoglykan osteoglycin/mimecan (který rovněž působí společně s $TGF\beta$) se podílí na arteriogenezi (Kampmann, 2009) a růstu srdečního svalu (Wang a spol., 2013) Fibromodulin (oxidativní stres-senzitivní proteoglykan) reguluje organizaci extracelulární matrix u myší jaterní fibrózy (Mormone a spol., 2012). Lumikan (keratin sulfát proteoglykan) podporuje hojení kožních ran tím, že aktivuje fibroblasty a kontrakci (Liu a spol., 2013). Primární membránová amino oxidáza se účastní buněčné adheze a je spojena s různými formami zánětu a fibrózy (Foot a spol., 2013). Děložní fibroidy a koloidní jizvy obsahují relativně velké množství versicanu (velký proteoglykan, který váže hyaluronovou kyselinu); to ovlivňuje šíření fibrotického procesu působením na buněčnou

proliferaci a tvorbu TGF β a kolagenu (Carrino a spol., 2012). Tenascin-x, glykoprotein extracelulární matrix, exprimovaný výlučně ve fibroblastech, pomáhá vzniku fibrózy za přítomnosti kolagenu; potencionálně působí spolu s kolageny I, III a V. Dle Jinga a spol (2011) je tenascin-x iniciátorem srdeční fibrózy cestou zvýšení TGF β . Fibronektin, vysokomolekulární glykoprotein, který váže kolagen, je hlavním biosyntetickým produktem kultur fibroblastů a spolu s TGF β byl imunohistochemicky detekován ve fibrotických procesech jater a peritonea (Lee a spol., 2014). Relativně blízká distribuce kolagenu VI a fibronektinu, která byla pozorována v extracelulární matrix normálních epiteliálních buněk, je dána zřejmě skutečností, že globulární doména kolagenu VI se může vázat na imobilizovaný fibronektin. To naznačuje, že kolagen VI je důležitý regulátor fibrilogeneze fibronektinu (Groulx a spol., 2011). Periostin, TGF β indukovaný protein celulórní matrix, podporuje adhezi a migraci epiteliálních buněk a zvyšuje srdeční fibrózu (Zhao a spol., 2013).

<i>Typ</i>	<i>Molekulární složení</i>	<i>Lokalizace</i>
VI Mikrofibrilární Váže se na velká fibrilární vlákna	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	dermis, chrupavka, placenta, plíce, cévní stěny
XII Mikrofibrilární Ukotvující fibrily	$[\alpha 1(XII)]_3$	perichondrium, ligamenta, šlacha

Obr. 38 Mikrofibrilární kolageny VI a XII se váží na fibrilární vlákna kolagenů I a III a tím prostorově zahušťují pojivovou tkáň

Téměř všechny typy vazivové tkáně jsou pod určitou mechanickou tenzí a to i v klidu. I když je jasné, že myofibroblasty mohou vyvolávat a udržovat sílu kontrakce, je otázkou, jak se tato vlastnost přenáší do zkrácení tkání, které pozorujeme při patologických kontrakturách. Kontraktura vazivové tkáně je pomalý, permanentní a nízkoenergetický proces, který zahrnuje buňky matrix a dominuje při extracelulárních jevech, jako je remodelace matrix. Kontraktura vazivové tkáně zahrnuje stoupající, anatomické zkrácení extracelulární matrix. Všechny remodelační procesy jsou charakterizovány vyjmutím molekul matrix a jsou často zprostředkovány matrix metaloproteinázami. Nedostatečné znalosti o vztahu mezi kontrakcí myofibroblastů a remodelací extracelulární matrix znemožňují tento proces srozumitelně

vysvětlit (Tomasek a spol., 2002). Některé nové pohledy na kontrakturu vazivové tkáně podporují důležitost změn složení kolagenní matrix na funkci buněk a tkání (Wakatsuki a spol., 2000). Dokonalejší znalosti o bílkovinném složení extracelulární matrix tak mohou mít zcela zásadní význam. V naší studii se nepodařilo prokázat rozdíly v obsahu proteinů ve vazivové tkáni mezi mediální (rigidní) a laterální částí subtalárního kloubu. Definitivní stanovisko bude však možno uzavřít až po analýze většího množství vzorků.

Možný klinický dopad našich výsledků spočívá např. v potencionální aplikace trypsinu ke kontrahované tkáni mezi mediální malleolus, sustentaculum tali a os naviculare. Extracelulární matrix v této oblasti obsahuje zvýšené množství kolagenu VI, který se degraduje lépe než kolagen I. Injekční aplikace trypsinu by mohla vést k uvolnění kontraktury a následně k redukci řady chirurgických zásahů, stejně jako k usnadnění konzervativního přístupu k léčbě PEC.

Limitem naší studie je skutečnost, že vzorky tkáně byly získány z nohou pacientů, kteří prodělali operační léčbu, téměř vždy předchází korekční sádrování (Ošťádal a spol., 2013). Zdá se však, že změny, spojené s tkáňovou kontrakturou, vztah k postnatální léčbě nemají (Poon a spol., 2009) Jiným možným omezením je absence kontrolní skupiny; získat normální tkáň je však nesmírně obtížné, a proto její případná analýza nemohla být součástí studie. Možnou alternativou ke kontrolním vzorkům může být použití méně kontrahované tkáně z calcaneocuboidního kloubu (Poon a spol., 2009). Takové srovnání bude předmětem našeho dalšího výzkumu.

5.4 Závěry

Naše studie je první globální proteomickou analýzou extracelulární matrix kontrahované tkáně pacientů s PEC. Určení obecných proteomických parametrů různých oblastí PEC může sloužit jako základ pro příští studie extracelulární matrix, jejichž cílem bude molekulární pohled na různá stadia onemocnění a možné terapeutické intervence. Následná analýza mechanismů, které regulují remodelaci extracelulární matrix a vznik kontraktur mohou mít značný význam pro pochopení biologie těchto patologických procesů a zavedení nových preventivních a terapeutických postupů.

6. ZÁVĚR

1. Srovnání krátkodobých a dlouhodobých výsledků léčby pes equinovarus Ponsetiho metodou

Naším prvním cílem bylo srovnat krátkodobé (do 3 let) a dlouhodobé (3-7 let) výsledky léčby Ponsetiho metodou a určit faktory, které se podílejí na vzniku recidiv. Zjistili jsme významný rozdíl mezi hodnocením krátkodobých a dlouhodobých výsledků: počet recidiv v průběhu prvních tří let léčby, indikovaných pro chirurgický zásah, byl významně nižší (5%) ve srovnání s pacienty, u nichž léčba začala před 6 – 8 lety (65%). K vysvětlení tohoto nálezu je zapotřebí – zvláště pro skupinu nejdéle sledovaných dětí – vzít v úvahu „learning curve“. Primární korekce PEC je tedy možná u téměř 100% pacientů, avšak pro korekci recidiv je třeba v některých případech použít chirurgický přístup. Na základě vlastních zkušeností jsme dospěli k závěru, že kromě nedostatečné compliance ze strany rodičů je hlavním rizikovým faktorem čas: u dětí starších 3 let není možno recidivy léčit pouze Ponsetiho metodou (sádrování, tenotomie Achillovy šlachy, transpozice m. tibialis ant.), ale je nutno přistoupit k operační léčbě.

Potvrdili jsme tak naši hypotézu, že vyléčit všechny recidivy PEC pouze Ponsetiho metodou možné není.

2. Proteomická analýza extracelulární matrix u pes equinovarus congenitus

V druhé části naší práce jsme ověřovali hypotézu, že patogenetické mechanismy, odpovědné za vznik PEC, zahrnují vazivovou tkáň a růstové faktory. Pro pochopení bílkovinného složení extracelulární matrix jsme proto použili proteomickou analýzu kontrahované tkáně u pacientů s PEC. Hlavním výsledkem naší studie je originální pozorování, že extracelulární matrix u PEC je složena – kromě již popsaných kolagenů I a III a TGF β – z dalších 16 proteinů (jsou specifikovány v testu), včetně kolagenů V, VI a XII. Určení obecných proteomických parametrů různých oblastí PEC může sloužit jako základ pro budoucí studie extracelulární matrix, jejichž cílem bude molekulární pohled na různá stadia onemocnění a možné terapeutické intervence. Následná analýza mechanismů, které regulují remodelaci

extracelulární matrix a vznik kontraktur mohou mít značný význam pro pochopení biologie těchto patologických procesů a zavedení nových preventivních a terapeutických postupů.

Potvrdili jsme tak hypotézu, že bílkovinné složení extracelulární matrix může hrát významnou roli v patogeneze vzniku PEC.

|

LITERATURA

- Abdelgawad AA, Lehman WB, Van Bosse HJ**, et al. Treatment of idiopathic clubfoot using the Ponseti methods: minimum 2-year follow-up. *J Pediatr Orthop B*. 2007; 16(2): 98-105.
- Alvarado DM, Aferol H, McCall K**, et al. Familial isolated clubfoot is associated with recurrent chromosome 17q23.1q23.2 microduplications containing TBX4. *Am J Hum Genet*. 2010; 87: 154-60.
- Barallobre-Barreiro J, Didangelos A, Schoendube FA**, et al. Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2012; 125: 789-802.
- Bensahel H, Csukonyi Z, Desgrippes Y**, et al. Surgery in residual club-foot: one-stage medioposterior release „a la carte“. *J Pediatr Orthop*. 1987; 7: 145-8.
- Bonnell J, Cruess RL**. Anomalous insertion of the soleus muscle as a cause of fixed equinus deformity. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 1969; 51: 999-1000.
- Carrino DA, Mesiano S, Barker NM**, et al. Proteoglycans of uterine fibroids and keloid scars: similarity in their proteoglycan composition. *Biochem J*. 2012; 443: 361-8.
- Crawford AH, Marxen JL, Osterfeld DI**. The Cincinnati incision: a comprehensive approach for surgical procedures of the foot and ankle in childhood. *J Bone Joint Surg Am*. 1982; 64: 1355-58.
- Diméglio A, Bensahel H, Souchet P**, et al. Classification of clubfoot. *J Pediatr Orthop B*. 1995; 4: 129-36.
- Diméglio A, Bonnet F, Mazeau P**, et al. Orthopaedic treatment and passive motion machine: consequences for the surgical treatment of clubfoot. *J Pediatr orthop B*. 1996; 3: 173-80.
- Dogan A, Kalender AM, Seramet E**, et al. Mini-open technique for the Achilles tenotomy in correction of idiopathic clubfoot: a report of 25 cases. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2008; 98(5): 414-7.

- Dobbs MB, Gurnett CA.** Update on clubfoot: etiology and treatment. *Clin Orthop Relat Res.* 2009; 467: 146-53.
- Dobbs MB, Rudzki JR, Purcell DB,** et al. Factors predictive of outcome after use of the Ponseti method for the treatment of idiopathic clubfeet. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86: 22-7.
- Dungl P.** Ortopedie a traumatologie nohy. 1. vyd. Praha: Avicenum 1989.
- Dungl P** et al. Ortopedie, Grada Publishing, 2. vyd. 2014, 1167.
- Dungl P, Karpíšek M.** Rozsáhlé subtalární uvolnění v léčení pes equinovarus congenitus. *Acta Chir Orthop Traum Cech.* 1990; 57: 111-126.
- Dunn PM.** Congenital postural deformities: perinatal associations. *Proc R SocMed.* 1972; 65: 735-8.
- Foot JS, Yow TT, Schilter H,** et al. PXS-4681A, a potent and selective mechanism-based inhibitor of SSAO/VAP-1 with anti-inflammatory effects in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013; 347: 365-74.
- Frejka B.** Základy ortopedické chirurgie. 2. vyd. Praha: Avicenum 1970.
- Fukuhara K, Schollmeier G, Uthoff HK.** The pathogenesis of club foot. A histomorphometric and immunohistochemical study of fetuses. *J Bone Joint Surg Br.* 1994; 76: 450-7.
- Gay S, Rhodes RK, Gay RE, Miller EJ.** Collagen molecules comprised of alpha 1(V)-chains (B-chains): an apparent localization in the exocytoskeleton. *Coll Relat Res.* 1981; 1: 53-8.
- Genovese, F, Barascuk N, Larsen L,** et al. Biglycan fragmentation in pathologies associated with extracellular matrix remodeling by matrix metalloproteinases. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2013; 6: 9.
- Gibbons PJ, Gray K.** Update of clubfoot. *J Paediatr Child Health,* 2013; doi: 10.1111/jpc.12167.

- Gilbert JA, Roach HI, Clarke NM.** Histological abnormalities of the calcaneum in congenital talipes equinovarus. *J Orthop Sci.* 2001; 6: 519-26.
- Gordon MK, Hahn RA.** Collagens. *Cell Tissue Res.* 2010; 339: 247-57.
- Grill F.** Clubfoot therapy according to Bosch. Conservative and operative aspects. *Acta Orthop Traum Surg.* 1984; 103: S 320-27.
- Groulx JF, Gagné D, Benoit YD,** et al. Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biol.* 2011; 30: 195-206.
- Grumati P, Coletto L, Sandri M,** et al. Autophagy induction rescues muscular dystrophy. *Autophagy.* 2011; 7: 426-8.
- Gurnett CA, Boehm S, Connolly A,** et al. Impact of congenital talipes equinovarus etiology on treatment outcomes. *Dev Med Child Neurol.* 2008; 50: 498-502.
- Gurnett CA, Farhang A, Kruse LM** et al. Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation. *Am J Hum Genet.* 2008; 83: 616-22.
- Henkel L, Willert GH.** Dysmelia a classification and a pattern of malformation in a group of congenital defects of the limbs. *J Bone Joint Surg.* 1969; 51-B: 399.
- Herzenberg H, Radler C, Bor N.** Ponseti versus traditional methods of casting for idiopathic clubfoot. *J Pediatr Orthop.* 2002; 22(4): 517-21.
- Chen W, Rock JB, Yearsley MM.** Different collagen types show distinct rates of increase from early to late stages of hepatitis C-related liver fibrosis. *Hum Pathol.* 2014; 45: 160-5.
- Cheon SS, Nadesan P, Poon R,** et al. Growth factors regulate beta-catenin-mediated TCF-dependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing. *Exp Cell Res.* 2004; 293: 267-74.
- Chomiak J, Frydrychová M, Ošťádal M** et al. Ponsetiho metoda v léčení pes equinovarus congenitus – první zkušenosti. *Acta chirurg Orthopaed et Traumatol Čechoslov.* 2009; 76: 194-201.

- Idelberger K.** Die Ergebnisse der Zwillingsforschung beim angeborenen Klumpfuß. *Verh Dtsch Orthp Ges.* 1939; 33: 272-6.
- Iltar S, Uysal M, Alemdaroglu KB,** et al. Treatment of clubfoot with the Ponseti method: should we begin casting in the newborn period or later? *J Foot Ankle Surg.* 2010; 49: 426-31.
- Ippolito E.** Update of pathologic anatomy of clubfoot. *J Pediatr Orthop B.* 1995; 4: 17-24.
- Irani RN, Sherman MS.** The pathological anatomy of idiopathic Club-foot. *J Bone and Joint Surg.* 1963; 45-A: 45-52.
- Irani RN, Sherman MS.** The pathological anatomy of idiopathic clubfoot. *Clin Orthop Relat Res.* 1972; 84: 14-20.
- Jing L, Zhou LJ, Zhang FM,** et al. Tenascin-x facilitates myocardial fibrosis and cardiac remodeling through transforming growth factor- β 1 and peroxisome proliferator-activated receptor γ in alcoholic cardiomyopathy. *Chin Med J.* 2011; 124: 390-5.
- Kampmann A, Fernández B, Deindl E,** et al. The proteoglycan osteoglycin/mimecan is correlated with arteriogenesis. *Mol Cell Biochem.* 2009; 322: 15-23.
- Kim J, Jimenez-Mallebrera C, Foley AR,** et al. Flow cytometry analysis: a quantitative method for collagen VI deficiency screening. *Neuromuscul Disord.* 2012; 22: 139-48.
- Kite JH.** Nonoperative treatment of congenital clubfoot. *Clin Orthop Relat Res.* 1972; 84: 29-38.
- Lampe AK, Bushby KM.** Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet.* 2005; 42: 673-85.
- Lehman WB, Grant A, Rose D,** et al. A method of evaluating possible pin penetration in slipped capital femoral epiphysis using a cannulated internal fixation device. *Clin Orthop.* 1984; 186: 65-80.
- Li C1, Nguyen Q, Cole WG, Alman BA.** Potential treatment for clubfeet based on growth factor blockade. *J Pediatr Orthop.* 2001; 21: 372-7.

- Lee CJ, Subeq YM, Lee RP, et al.** Calcitriol decreases TGF- β 1 and angiotensin II production and protects against chlorhexide digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. *Cytokine*. 2014; 65: 105-18.
- Liu XJ, Kong FZ, Wang YH et al.** Lumican Accelerates Wound Healing by Enhancing α 2 β 1 Integrin-Mediated Fibroblast Contractility. *PLoS One*. 2013; 8: e67124.
- Lochmiller C, Johnston D, Scott A, et al.** Genetic epidemiology study of idiopathic talipes equinovarus. *Am J Med Genet*. 1998; 79: 90-6.
- Massoudi D, Malecaze F, Soler V, et al.** NC1 long and NC3 short splice variants of type XII collagen are overexpressed during corneal scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 7246-56.
- McKay DW,** New concept of and approach to clubfoot treatment: section I principles and morbid anatomy. *J Pediatr Orthop*. 1982a; vol.2-A, 347-356.
- McKay DW,** New concept of and approach to clubfoot treatment: section II correction of the clubfoot. *J Pediatr Orthop*. 1982b; vol.3-A, 10-21.
- McKay DW,** New concept of and approach to clubfoot treatment: section III evaluation and results. *J Pediatr Orthop*. 1982c; vol.3-A, 141-148.
- Mikesh LM, Aramadhaka LR, Moskaluk C, et al.** Proteomic anatomy of human skin. *J Proteomics*. 2013; 84: 190-200.
- Morcuende JA, Dolan LA, Dietz FR, et al.** Radical reduction in the rate of extensive corrective surgery for clubfoot using the Ponseti method. *Pediatrics*. 2004; 113: 376-80.
- Mormone E, Yongke Lu, Xiaodong Ge, et al.** Fibromodulin, an Oxidative Stress-Sensitive Proteoglycan, Regulates the Fibrogenic Response to Liver Injury in Mice. *Gastroenterology*. 2012; 142: 612–621.
- Nimni ME.** Collagen: Structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1983; 13: 1-86.

- Ošťádal M.** Ponsetiho způsob léčení PEC. V Dungal P.: Orthopedie, Grada Publishing Praha 2014, s. 956-60.
- Ošťádal M, Chomiak J, Dungal P,** et al. Comparison of the short-term and long-term results of the Ponseti method in the treatment of idiopathic pes equinovarus. *Int Orthop.* 2013; 37: 1821-5.
- Ošťádal M, Chomiak J, Dungal P,** et al. Ponsetiho methoda při léčbě pes equinovarus congenitus (PEC). *Neonatologické listy.* 2011; 17: 3-6.
- Ošťádal M, Eckhardt A, Herget J** et al. Proteomic analysis of the extracellular matrix in idiopathic pes equinovarus. *Mol Cell Biochem.* 2014; DOI 10.1007/s11010-014-2300-3
- Pirani S.** The Ponseti method and results in developing nations. Presented at the Symposium on Conservative Methods on the Treatment of Clubfeet. SICOT. August 30, 2002; San Diego, CA
- Ponseti IV.** Congenital clubfoot: fundamentals of treatment. Oxford, England: Oxford University Press; 1996.
- Ponseti IV.** Treatment of congenital club foot. *J Bone Joint Surg Am.* 1992; 74: 448-54.
- Ponseti IV, Smoley EN.** Congenital club foot: Results of treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 1963; 45: 261-266.
- Ponseti IV, Zhivkov M, Davis N** et al. Treatment of the complex idiopathic clubfoot. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 451: 171-6.
- Ponseti IV.** Clubfoot management. *J Pediatr Orthop.* 2000; 20: 699-700.
- Poon R, Li C, Alman BA.** Beta-catenin mediates soft tissue contracture in clubfoot. *Clin Orthop Relat Res.* 2009; 467: 1180-5.
- Radler C, Manner HM, Suda R,** et al. Radiographic evaluation of idiopathic clubfeet undergoing Ponseti treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89: 1177-83.
- Sabatelli P, Palma E, Angelin A,** et al. Critical evaluation of the use of cell cultures for inclusion in clinical trials of patients affected by collagen VI myopathies. *J Cell Physiol.* 2012a; 227: 2927-35.

- Sabatelli P, Gualandi F, Gara SK**, et al. Expression of collagen VI $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in human muscle and in Duchenne muscular dystrophy-related muscle fibrosis. *Matrix Biol.* 2012b; 31: 187-96.
- Sano H, Uthoff HK, Jarvis JG**, et al. Pathogenesis of soft-tissue contracture in club foot. *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80: 641-4.
- Shack N, Eastwood DM.** *J Bone Joint Surg.* 2006; 88-B: 1085-9.
- Tachdjian MO.** Pediatric Orthopedics. Vol. I.-IV. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B**, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 349-63.
- Wang P, Zhou S, Xu L.** Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and collagen synthesis in cardiac fibroblasts: blockade by tanshinone IIA. *J Ethnopharmacol.* 2013; 145: 152-61.
- Wakatsuki T, Kolodney MS, Zahalak GI**, et al. Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. *Biophys J.* 2000; 79: 2353-68.
- Wynne-Davies R.** Genetic and environmental factors in the etiology of talipes equinovarus. *Clin Orthop Relat Res.* 1972; 84: 9-13.
- Yagmurlu MF, Ermis MN, Akdeniz HE**, et al. Ponseti management of clubfoot after walking age. *Pediatr. Int.* 2011; 53: 85-9.
- Yamamoto H, Muneta T, Morita S.** Nonsurgical treatment of congenital clubfoot with manipulation, cast, and modified Denis Browne splint. *J Pediatr Orthop.* 1998; 18: 538-42.
- Zhao S, Wu H, Xia W**, et al. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J Cardiol.* 2013; [Epub ahead of print]

SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

1. Publikace, které mají vztah k dizertační práci (s IF):

OŠTÁDAL, M., ECKHARDT, A., HERGET, J., MIKŠÍK, I., DUNGL, P., CHOMIAK, J., FRYDRYCHOVÁ, M., BURIAN, M. Proteomic analysis of the extracellular matrix in idiopathic pes equinovarus. *Mol Cell Biochem.* 2015; Mar; 401(1-2):133-9. doi: 10.1007/s11010-014-2300-3. Epub 2014 Dec 4. ISSN 0300-8177 IF 2,388

OŠTÁDAL, M., CHOMIAK, J., DUNGL, P., FRYDRYCHOVÁ, M., BURIAN, M. Comparison of the short-term and long-term results of the Ponseti method in the treatment of idiopathic pes equinovarus. *Int. Orthop.* 2013; vol. 37 (9), p.1821-5. doi: 10.1007/s00264-013-2033-3. ISSN 0341-2695 IF 2.319

2. Publikace, které mají vztah k dizertační práci (bez IF):

OŠTÁDAL, M., CHOMIAK, J., DUNGL, P., FRYDRYCHOVÁ, M., VACULÍK, J.: Ponsetiho metoda při léčbě pes equinovarus congenitus (PEC). *Neonatologické listy*, 2011, Roč. 17, č. 2, s. 3 -5. ISSN: 1211-1600.

OŠTÁDAL, M. Ponsetiho způsob léčení PEC. In *DUNGL, Pavel. Ortopedie. 2. přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada, 2014. Kapitola 24.3.3.1, s. 956-960.*

CHOMIAK, J., FRYDRYCHOVÁ, M., OŠTÁDAL, M., MATĚJÍČEK, M: Ponsetiho metoda v léčení pes equinovarus congenitus – první zkušenosti. *Acta chir. Orthop. Traum. čech.*, 2009, roč.76, č. 3, s. 194-201. ISSN 0001-5415.

3. Publikace, které nemají vztah k dizertační práci (s IF):

HERGET J, WILHELM J, NOVOTNÁ J, ECKHARDT A, VYTÁSEK R, MRÁZKOVÁ L, OŠTÁDAL M.
A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res.* 2000;49(5):493-501. ISSN: 0862-8408

CHOMIAK, J., DUNGL, P., OŠŤÁDAL, M., FRYDRYCHOVÁ, M., BURIAN, M. Muscle transfers in children and adults improve external rotation in cases of obstetrical brachial plexus paralysis: a comparative study. *Int Orthop.* 2014; vol. 38 (4) , p. 803-810. doi: 10.1007/s00264-013-2202-0 ISSN 0341-2695 IF 2.319

BURIAN, M., DUNGL, P., NANKA, O., CHOMIAK, J., OŠŤÁDAL, M., FRYDRYCHOVÁ, M., KUBEŠ, R. Anteromedial wedge reduction osteotomy for the treatment of femoral head deformities. *Hip Int.* 2013; vol. 23 (3), p. 281-6. doi: 10.5301/hipint.5000017. ISSN 1724-6067 IF 0.763

BURIAN, M., DUNGL, P., CHOMIAK, J., OŠŤÁDAL, M., FRYDRYCHOVÁ, M. Úspěšnost konzervativní léčby vývojové kyčelní dysplazie metodou „over-head trakce“ (Efficiency of Conservative Treatment by Overhead Traction in developmental Dysplasia of the Hip). *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 77; s. 371-377, 2010. ISSN 0001-5415 IF 1.628

CHOMIAK, J., PODŠKUBKA, A., DUNGL, P., OŠŤÁDAL, M., FRYDRYCHOVÁ, M. Cruciate Ligaments in Proximal Femoral Focal Deficiency: Arthroscopic Assessment. *J Pediatr Orthop.* 2012 Jan; 32(1): s. 21-28. ISSN 0271-6798 IF 1,153

4. Publikace, které nemají vztah k dizertační práci (bez IF):

OŠŤÁDAL, M. - HERGET, J., DUNGL, P.
Oxid dusnatý a jeho úloha v ortopedii
Acta Chir. orthop. Traum. Čech., Roč. 69, č. 3 (2002), s. 183-186. ISSN: 0001-5415

OŠŤÁDAL, M., CHOMIAK, J., DUNGL, P., ADAMEC, O.
Transfer distálního úponu m. rectus femoris u pacientů s dětskou mozkovou obrnou.
Acta chir. Orthop. Traum. čech., 2007, roč.74, č. 6, s. 388-391. ISSN 0001-5415

VANĚČKOVÁ, M., OŠŤÁDAL, M., SEIDL, Z., OBENBERGER, J., VITÁK, T.,
PETEROVÁ, V., DANĚŠ, J., DUNGL, P.
Jumper's knee / chronická patelární tendinitida / v obraze magnetické rezonance.
Čes. Radiol., 55, 2001, 2, 94 – 96.

VANĚČKOVÁ, M., OŠŤÁDAL, M., SEIDL, Z., OBENBERGER, J., VITÁK, T,
DANEŠ, J.

Jumper's knee: Diagnosis, surgical treatment and return to high level performance within three months.

European Journ. of Sports Traumatology and Related Research, Dec. 2001; 23(4): p.179-182

ADAMEC, O., CHOMIAK, J., FRYDRYCHOVÁ, M., OŠŤÁDAL, M., DUNGL, P.

Acetabular coverage procedures after conservative treatment of DDH

EPOS, 27th Annual Meeting, 9.-12.4.2008, Varšava, Polsko

Journal of Children's Orthopaedics, vol.2, March 2008, Suppl.1, s. S63-64; ISSN 1863-2521