Univerzita Karlova v Praze

Matematicko-fyzikální fakulta

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**



Bc. Petr Šedivý

# MR spektroskopie pacientů s diabetem mellitus

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Helena Štěpánková, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Rád bych na tomto místě poděkoval především vedoucí své diplomové práce paní prof. RNDr. Heleně Štěpánkové, CSc. a svým dvěma konzultantům panu Ing. Milanu Hájkovi, DrSc. a paní Mgr. Monice Dezortové, Ph.D za všestrannou pomoc a rady. Dále bych chtěl poděkovat za pomoc od kolegů Mgr. Filipa Jírů, Ph.D., Mgr. Dity Wagnerové, MUDr. Antonína Škocha, Ph.D. a Ing. Jana Rydla. Dále děkuji všem dobrovolníkům, kteří se účastnili vyšetření vykonaných v rámci mé diplomové práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu při studiu a při sepisování této diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V ..... dne.....

podpis

Název práce: MR spektroskopie pacientů s diabetem mellitus

Autor: Bc. Petr Šedivý

Katedra / Ústav: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Helena Štěpánková, CSc., Katedra fyziky nízkých teplot

Abstrakt: Diplomová práce se zabývá *in vivo* MR spektroskopií. Měření vykonaná v rámci diplomové práce se uskutečnila na celotělovém tomografu v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Cílem práce bylo studovat rozdíly mezi biochemickými procesy a energetickým metabolismem probíhajícím ve svalové tkáni při zátěží mezi skupinou zdravých jedinců a pacientů s diabetem mellitus typu 1 (DM1). K tomuto vědeckému záměru byla využita fosforová spektroskopie v kombinaci s ergometrem. Diplomová práce je členěna do 5 kapitol. V první kapitole jsou teoreticky popsány základy *in vivo* <sup>1</sup>H a <sup>31</sup>P MR spektroskopie a svalového metabolismu, druhá kapitola se zabývá experimentálním popisem zařízení a měření, ve třetí kapitole jsou zaznamenány obdržené výsledky a čtvrtou kapitolu tvoří diskuze k získaným výsledkům. Hlavním výsledkem a závěrem práce je, že byl shledán rozdíl mezi metabolismem pacientů s DM1 a zdravých dobrovolníků.

Klíčová slova: <sup>31</sup>P MR spectroskopie, ergometr, metabolismus, bioenergetika, diabetes

Title: MR spectroscopy in patients with diabetes mellitus

Author: Bc. Petr Šedivý

Department: Katedra fyziky nízkých teplot

Supervisor: prof. RNDr. Helena Štěpánková, CSc., Katedra fyziky nízkých teplot

Abstract: This thesis deals with *in vivo* MR spectroscopy. Measurements in this thesis were performed on whole-body MR tomograph at the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague. The objective of the thesis was to study differences in the biochemical processes and energy metabolism in the muscle tissue under physical workload between the groups of healthy subjects and patients with type 1 diabetes mellitus (DM1). We used phosphorous spectroscopy in combination with ergometer. The thesis is divided into five chapters. The first chapter describes theoretical introduction to *in vivo* <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P MR spectroscopy and muscle metabolism, the second chapter deals with the description of the experimental equipment and measurement, results of the thesis are reported in the third chapter and the fourth chapter is a discussion of results. Main result of this work is summarized in conclusion; we found differences between the metabolism of patients with DM1 and healthy volunteers.

Keywords: 31P MR spectroscopy, ergometer, metabolism, bioenergetics, diabetes

# Seznam zkratek

<sup>1</sup> H MRS	Protonová spektroskopie (Proton Magnetic Resonance Spectroscopy)
<sup>31</sup> P MRS	Fosforová spektroskopie (Phosphorous Magnetic Resonance Spectroscopy)
Acq	Akvizice (Acquisition)
BMI	Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
CSA	Artefakty chemického posunu (Chemical Shift Artifact)
DFT	Diskrétní Fourierova transformace (Discrete Fourier Transform)
DM1	Diabetes Mellitus 1. typu
DM2	Diabetes Mellitus 2. typu
DP	Diplomová práce
FG	Fast glykolytic fibre
FID	Signál volné precese (Free Induction Decay)
FOG	Fast oxidative glycolytic fibre
FT	Fourierova transformace (Fourier Transform)
GE	Gradientní echo (Gradient Echo)
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
ISIS	Image-Selected In vivo Spectroscopy
MRI	Zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
PRESS	Point RESolved Spectroscopy
RF	Radiofrekvenční pole (Radiofrequency field)
SE	Spinové echo (Spin Echo)
SI,CSI	Spektroskopické zobrazování (Spectroscopic Imaging, Chemical Shift Imaging)
SNR	Poměr signál/šum (Signal-to-Noise Ratio)
SO	Slow oxidative fibre
STE	Stimulované echo (Stimulated Echo)
STEAM	STimulated Echo Acquisition Mode
SVS	Single Voxel Spectroscopy
TE	Echo čas (Echo Time)
TR	Repetiční čas (Repetition Time)
WS	Water suppression

## Seznam chemických sloučenin

ADP	Adenosindifosfát
ADP	Adenosindifosfá

- AMK Aminokyselina
- AMP Adenosinmonofosfát
- ATP Adenosintrifosfát
- BPG bifosfoglycerát
- CoA KoenzymA
- Cr Kreatin
- FAD Flavinadenindinukleotid
- FFA Volné mastné kyseliny
- GPC Glycerol-3-fosfocholin
- GPE Glycerol-3-fosfoetanolamin
- NAD<sup>+</sup> Nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
- NADH Nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
- PC Fosfocholin
- PCr Fosfokreatin
- PDE Fosfodiestery
- PE Fosfoetanolamin
- PEP Fosfoenolpyruvát
- PME Fosfomonoestery
  - Pi Anorganický fosfát

# Seznam použitých fyzikálních symbolů

$k_B$	Boltzmannova konstanta
t	Čas
E	Energie
arphi	Fáze signálu
$G_X, G_Y, G_Z$	Gradienty magnetického pole
γ	Gyromagnetická konstanta
n	Hustota spinů
$\delta$	Chemický posun v ppm, relativní chyba
S	Integrální intenzita signálu
Î	Jaderný spin
<i>x</i> , <i>y</i> , <i>z</i>	Kartézské souřadnice
$\perp$	Kolmost (na statické magnetické pole)
[X]	Koncentrace metabolitu X
f	Korekční faktory
k	k-prostor
$\omega_L$	Larmorova frekvence
arOmega	Larmorova frekvence v laboratorní vztažné soustavě
$B_1$	Magnetické pole radiofrekvenčních pulzů
û	Magnetický moment
$M_0$	Magnetizace vzorku
$O_{max}$	Mitochondriální kapacita
$V_{PCr}$	Počáteční rychlost vzniku PCr
V	Objem
χ	Permeabilita materiálu
h	Planckova konstanta
τ	Relaxační konstanta
$T_1$	Spin-mřížková relaxační doba
$T_2$	Spin-spinová relaxační doba
$B_0$	Statické magnetická pole
$\overleftarrow{\sigma}$	Tenzor chemického posunu
Ĵ	Tenzor nepřímé dipol-dipolové interakce
Т	Teplota
G	Volná Gibbsova energie

 $\varphi$  Úhel stočení vektoru magnetizace

# Obsah

1	Úvod	Ivod1				
2	Teoretic	ká část	3			
	2.1 Zák	ladní principy nukleární magnetické rezonance	3			
	2.1.1	Rezonanční podmínka	3			
	2.1.2	Gyromagnetická částice	4			
2.1.3 2.1.4		Blochovy rovnice	5			
		Spinové echo a stimulované echo	6			
	2.1.5	Chemický posun a J vazba	8			
	2.2 Zpr	acování signálu	11			
	2.2.1	Detekovaný signál	11			
	2.2.2	Používaný software a operace se spektry	12			
	2.2.3	Kvantifikace metabolitů v MR spektrech	15			
	2.2.4	Korekce pro kvantifikaci metabolitů	16			
	2.3 MR	zobrazování	18			
	2.3.1	Získání MR obrazu	21			
	2.4 Sig	nály <sup>31</sup> P a <sup>1</sup> H sloučenin v MR spektru svalu				
	2.4.1	<sup>31</sup> P MR spektrum				
	2.4.2	<sup>1</sup> H MR spektrum svalu				
	2.5 Star	vba svalu a průběh svalové kontrakce				
	2.6 Me	tabolické děje a zdroje energie ve svalové tkáni				
	2.6.1	Anaerobní fermentace				
	2.6.2	Citrátový cyklus				
	2.6.3	Oxidativní fosforylace				
	2.6.4	β Oxidace				
	2.6.5	Zapojení jednotlivých metabolických mechanizmů při zátěži				
	2.7 Dia	betes Mellitus				
	2.7.1	Inzulin				
	2.7.2	Svalová tkáň a porucha mitochondrií				
	2.8 Urč	ované veličiny				
3	Experim	nentální část	45			
	3.1 Dol	provolníci a pacienti	45			
	3.2 Exp	perimentální vybavení				
	3.2.1	Tomograf magnetické rezonance	46			
	3.2.2	Cívka pro měření <sup>31</sup> P spekter				

	3.2.3	B Ergometr	47	
3	.3	Použitý software		
	3.3.1	Program na zpracování signálu z potenciometru	50	
	3.3.2	2 jMRUI - program na zpracování spekter	51	
3	.4	Průběh vyšetření	53	
4	Výsl	ledky		
4	.1	Klidová <sup>31</sup> P spektra	56	
4	.2	Fosforová spektroskopie při zátěži	60	
	4.2.1	Výběr standardního protokolu-porovnání dvou protokolů	60	
4	.3	Porovnání zdravých osob a pacientů s DM1	70	
4	.4	Opakovatelnost a reprodukovatelnost klidových <sup>31</sup> P MR spekter	74	
4	.5	Reprodukovatelnost dynamického měření	77	
5	Disk	uze	78	
5	.1	Výběr protokolu	78	
5	.2	Signál anorganického fosfátu		
5	.3	Záznam práce		
5	.4	Klinické závěry a porovnání s literaturou		
5	.5	Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření	89	
6	Závě	۲۰۰۰ ۲۰۰۰ ۲۰۰۰ ۲۰۰۰ ۲۰۰۰ ۲۰۰۰ ۲۰۰۰ ۲		
Sez	nam p	použité literatury	91	
Sez	nam t	abulek	96	
Příl	ohy		97	
Р	Příloha č. 1 Schéma ergometru97			
Příloha č. 2 Program potenciometr101				
Příloha č. 3 Program na řazení spekter1				
Р	říloha	a č. 4 Formulář	105	

## 1 Úvod

Vyšetřování metodou magnetické rezonance (dále MR) patří k nejmladším radiodiagnostickým metodám používaným ve zdravotnictví. Počátky této vyšetřovací metody spadají do sedmdesátých let 20. století, kdy byly zveřejněny první MR obrazy P. Lauterburem [1]. Od této doby se obor využití magnetické rezonance v lékařství rozvinul a dnes mimo klasické zobrazování (MRI) zahrnuje funkční MR zobrazování, angiografii, relaxometrii, difúzometrii, traktografii a v neposlední řadě také *in vivo* MR spektroskopii (MRS).

MR spektroskopie je technika, která dovoluje neinvazivně a *in vivo* sledovat biochemické procesy probíhající v živých organismech. MR spektroskopie umožňuje detekovat a měřit koncentrace nebo poměry některých metabolitů v lidském těle. Preferenčně lze vybrat příslušnou oblast, z které jsou dané metabolity detekovány, nebo dokonce vytvořit celou metabolickou mapu dané oblasti a určit v ní případnou patologii a její rozsah. Spektrum metabolitů, které lze detekovat, je dáno měřeným izotopem a koncentracemi látek v těle, které obsahují daný izotop. Obecně *in vivo* magnetická rezonance není příliš citlivá metoda, takže lze detekovat maximálně několik desítek metabolitů, které mají koncentraci větší než 1 mM.

MRS sama o sobě není schopna ve většině případů podat přesnou diagnózu onemocnění, ale v kombinaci s dalšími technikami je MR spektroskopie velice účinný nástroj, který je platnou součástí diferenciální diagnostiky. V biomedicínské praxi se nejvíce používá <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P a <sup>13</sup>C MR spektroskopie [2].

Základní technikou MRS je měření signálu volné precese (FID). Lokalizace signálu je v tomto případě dána pouze velikostí a tvarem použité cívky, nejčastěji povrchové. Ačkoli tato technika neumožňuje přesně ohraničený výběr oblasti, z které je spektrum měřeno, má výhodu v jednoduchosti měření a relativně velké intenzitě signálu. Jmenované výhody se dají využít k zrychlení měření nebo k provádění dynamických měření, zejména tam, kde lokalizace není nezbytná.

Pro lokalizovanou MRS z určité malé oblasti, tzv. voxelu, se nejčastěji používají metody PRESS (Point RESolved Spectroscopy), STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode) nebo ISIS (Image Selected In vivo Spectroscopy). Pro tvorbu metabolických map se využívá tzv. spektroskopický imaging (CSI, Chemical Shift Imaging), při němž je měření oblasti rozděleno do mřížky složené z jednotlivých voxelů, ze kterých pak jsou dostupná jednotlivá spektra [3].

Měření použitá v diplomové práci se uskutečnila na Pracovišti radiodiagnostiky a intervenční radiologie v Institutu klinické a experimentální medicíny (ZRIR IKEM) v Praze. Toto pracoviště patří k jedněm z mála institucí v České republice, které se věnují MR spektroskopii. V jeho zaměření je jak klinický a experimentální výzkum, tak i vývoj metod pro měření a zpracování výsledků (např. vývoj softwaru). V rámci diplomové práce (DP) byl sestaven a zprovozněn MR kompatibilní ergometr. K tomuto ergometru a k nové cívce pro měření signálů s rezonanční frekvencí jader fosforu bylo třeba zavést měřicí protokol, což tvořilo část mé diplomové práce. Hlavní část práce se pak zabývá <sup>31</sup>P MR spektroskopií svalových metabolitů a energetickým metabolismem probíhajícím ve svalové tkáni za námahy.

<sup>31</sup>P MR spektroskopie spolu s použitým ergometrem byla použita ke klinickému výzkumu pacientů s onemocněním diabetes mellitus (DM). DM má řadu závažných komplikací, které pokud nejsou léčeny, podstatně zkracují a komplikují život pacientům. Problém s DM nabývá důležitosti s růstem četnosti výskytu tohoto onemocnění v důsledku prodlužování lidského života a zhoršováním životního stylu. <sup>1</sup>H a <sup>31</sup>P MR spektroskopie může pomoci pochopit patologické biochemické procesy probíhající u diabetiků a zjistit jejich původ.

Diplomová práce je dělena do 5 kapitol. První kapitola je věnována teoretickým základům měření a jsou v ní stručně shrnuty poznatky o diabetu. Druhá kapitola se zabývá experimentálním popisem zařízení a měření. Třetí kapitola pojednává o výsledcích měření. Předposlední kapitola obsahuje diskusi s hodnocením obdržených výsledků. Diplomová práce končí závěrem, ve kterém jsou shrnuty hlavní dosažené výsledky práce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Základní principy nukleární magnetické rezonance

V následující podkapitole budou vyloženy základní fyzikální principy jevu nukleární magnetické rezonance.

#### 2.1.1 Rezonanční podmínka

Vztah mezi jaderným spinem  $\hat{l}$  určitého izotopu a jeho magnetickým momentem  $\hat{\mu}$  je dán tzv. gyromagnetickou konstantou, která se liší pro každý konkrétní izotop dotyčného prvku (2.1) [4].

$$\hat{\mu} = \gamma \hat{I} \tag{2.1}$$

Průmět jaderného spinu  $\hat{I}_z$  do směru magnetického pole (B<sub>0</sub> || z) nabývá 2I+1 hodnot (od –  $\hbar I$ , - $\hbar$ (-*I*+1)...do  $\hbar$ (*I*-1),  $\hbar I$ ), kde *I* je jaderné spinové číslo. Každý průmět jaderného spinu s jinou hodnotou jaderného spinového čísla  $I_m$  odpovídá jiné energii jádra izotopu v magnetickém poli. Systém těchto hladin o energii  $E_m$  se nazývá Zeemanovský multiplet. Pokud se vezme v úvahu vztah pro energii magnetického dipólu v magnetickém poli (2.2), lze odvodit rezonanční podmínku (2.3), která udává nutnou frekvenci resp. energii elektromagnetického pole, které je schopno měnit průmět jaderného spinu konkrétního izotopu:

$$E = -\mu \cdot B_0 = -\gamma \hbar I_z B_0 \tag{2.2}$$

$$E_m - E_{m+1} = \gamma \hbar B_0 \Rightarrow \omega_{rezonančni} = \gamma B_0$$
, (2.3)

kde  $\mu$  je magnetický dipólový moment,  $I_z$  průmět momentu hybnosti (tzv. spinu) do směru statického magnetického pole  $B_0$  (v celé práci jej ztotožňuji se z-ovým směrem),  $\gamma$  gyromagnetický poměr daného izotopu.

Rezonanční podmínku lze vysvětlit na základě klasické představy precese jaderného spinu v magnetickém poli s Larmorovou frekvencí. Při splnění rezonanční podmínky bude radiofrekvenční pole (RF) synchronizováno s precesním pohybem magnetického momentu, jak bude ukázáno v následujícím odstavci.

#### 2.1.2 Gyromagnetická částice

Pro gyromagnetickou částici o momentu  $\mu$  v magnetickém poli *B* platí vztah (2.4) [4]:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma(\vec{\mu} \times \vec{B}) \quad . \tag{2.4}$$

Je výhodné tuto rovnici (2.4) přepsat do rotující souřadnicové soustavy:

$$\frac{\delta \vec{\mu}}{\delta t} = \vec{\mu} \times (\gamma \vec{B} + \vec{\Omega}) \quad , \tag{2.5}$$

kde  $\vec{\Omega}$  je vektor úhlové rychlosti gyromagnetické částice v laboratorní soustavě. Z rovnice (2.5) je patrné, že  $\vec{\mu}$  je v rotující soustavě souřadné popsán stejnou rovnicí jako v nerotující soustavě (2.4), pokud se  $\vec{B}$  nahradí tzv. efektivním polem  $\vec{B}_{efekt} = \left[\vec{B} + \frac{\vec{\Omega}}{\gamma}\right]$ .

Nejlépe se nahlíží na systém, ve kterém se vektor magnetizace nepohybuje, což je splněno, když:

$$\frac{\delta \vec{\mu}}{\delta t} = 0 \quad . \tag{2.6}$$

Aby tato podmínka byla splněna, musí platit  $\vec{\Omega} = -\gamma \vec{B}$ . Z pohledu laboratorní soustavy (soustava vnějšího pozorovatele) magnetický moment koná precesi tzv. Larmorovou frekvencí  $\vec{\Omega}_L = (0,0, -\gamma B_0)$  kolem vnějšího statického magnetického pole. Tvar rovnice v rotujícím systému je výhodný z hlediska možnosti popsání dodatečných RF pulzů:

$$\overrightarrow{B_1} = B_1\{\vec{x}\cos\omega_z t - \vec{y}\cos\omega_z t\} , \qquad (2.7)$$

kde  $\vec{x}, \vec{y}$  jsou jednotkové vektory ve směru osy x a y. Po zahrnutí dodatečného RF pole má rovnice pro gyromagnetickou částici v rotující soustavě konečný tvar:

$$\frac{\delta \vec{\mu}}{\delta t} = \vec{\mu} \times \left[ \vec{z} (\gamma B_0 - \omega_z) + \vec{x}' \gamma B_1 \right], \qquad (2.8)$$

kde  $\vec{z}$  je jednotkový vektor ve směru osy z,  $\vec{x}'$  jednotkový vektor ve směru osy x' v rotujícím souřadném systému. Z tvaru rovnice je patrné, že při splnění rezonanční podmínky bude magnetický moment gyromagnetické částice podléhat pouze "konstantnímu"  $B_1$ , tím se rotující systém dostává do stejné situace jako systém v nerotující soustavě při přítomnosti pouze statického pole. Důsledkem je

vykonávání dodatečné precese gyromagnetické částice v rotující soustavě kolem pole  $B_1$ . Za čas *T* se stočí její magnetický moment v rotující soustavě o úhel:

$$\varphi = \int_0^T \gamma B_1 dt \quad . \tag{2.9}$$

#### 2.1.3 Blochovy rovnice

Principiálně je v kondenzovaných látkách detekovatelná pouze suma jaderných magnetických momentů, tzv. jaderná magnetizace. Její velikost je v termodynamické rovnováze úměrná hustotě spinů *n* a populačnímu rozdílu v obsazenosti jednotlivých hladin daném Boltzmannovým rozdělením při dané teplotě. Vztah mezi magnetizací a vnějším magnetickým polem se může zapsat pomocí statické permeability:

$$M_0 = \chi B_0$$
 , (2.10)

kde  $\chi$  permeabilita je závislá již na zmíněných veličinách:

$$\chi = \frac{\mu_0 n \hbar^2 \gamma^2 I(I+1)}{3k_B T}.$$
 (2.11)

Jestliže se do popisu zahrnou interakce s dalšími stupni volnosti (tzv. mřížka), obdrží se Blochovy rovnice (2.12),(2.13) a (2.14) [4]:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma \left(\vec{M} \times \vec{B}\right)_x - \frac{M_x}{T_2}$$
(2.12)

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma \left(\vec{M} \times \vec{B}\right)_y - \frac{M_y}{T_2}$$
(2.13)

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma \left( \vec{M} \times \vec{B} \right)_z - \frac{M_z - M_0}{T_1}, \qquad (2.14)$$

kde  $T_2$  je spin-spinový relaxační čas a  $T_1$  je spin-mřížkový relaxační čas,  $\vec{B}$  vyjadřuje lokální magnetické pole vzniklé složením vnějších statických polí a mikroskopických polí, jež jsou důsledkem vzájemných interakcí spinů a mřížky.

Jedná se o soustavu 3 diferenciálních rovnic, jejichž analytické řešení nemusí existovat, a proto se často řeší numericky. V základním uspořádání pulzního MR experimentu se magnetizace sklopí dle vztahu (2.9) o úhel 90° pomocí RF pole generovaného radiofrekvenční cívkou. Frekvenční šíře pulzu je závislá na jeho časovém průběhu a amplitudě  $B_1$ . Obvykle se požadují pulzy, jež mají pravoúhlý průběh excitační frekvenční šíře. Takovéto pulzy mají pak amplitudu svého

magnetického pole úměrnou funkci *sinc(\omega t)*. Vztah mezi excitační šíří pulzů a jeho časovým průběhem je svázán Fourierovou transformací (FT).

Po sklopení bude vektor magnetizace vykonávat precesi v rovině kolmé na statické magnetické pole svojí Larmorovou frekvencí. Z experimentálního hlediska je detekovatelná pouze složka magnetizace kolmá k vnějšímu statickému poli.

Po sklopení vektoru magnetizace dochází k relaxacím. Spin-spinová relaxace způsobuje rozfázování precese spinů, zatímco spin-mřížková návrat magnetizace do směru statického pole. Výsledkem obou procesů je exponenciální pokles příčné magnetizace:

$$M_{\perp} \sim e^{-t/T_2}$$
 (2.15)

Signál, který vzniká precesí příčné magnetizace po skončení pulsu, se nazývá signál volné precese (FID = Free Induction Decay). Jeho pokles v čase je charakterizován dobou  $T_2^*$  danou vztahem (2.16):

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B \quad , \tag{2.16}$$

kde  $\Delta B$  popisuje nehomogenitu magnetického pole, která je způsobena buď důsledkem chemické různorodosti jednotlivých látek, které vytvářejí svá lokální magnetická pole, nebo nehomogenitami vnějšího statického pole.

Nehomogenity magnetického pole tvoří největší podíl  $T_2^*$  času. Pomocí tzv. spinového echa (SE) se může vliv nehomogenity magnetického pole eliminovat a měří se pouze pokles magnetizace daný  $T_2$  časem. Navíc se v MR *in vivo* spektroskopii rozdíl mezi časem  $T_2$  a  $T_2^*$  využívá k lokalizaci objemu v sekvencích PRESS, STEAM [5].

#### 2.1.4 Spinové echo a stimulované echo

Spinové echo tvoří základní část spektroskopických a zobrazovacích sekvencí. Pro vznik spinového echa se obvykle používá kombinace  $\pi/2$  a  $\pi$  pulzu. Po prvním pulzu  $\pi/2$  dojde již k zmíněnému sklopení vektoru magnetizace do kolmého směru ke statickému magnetickému poli. Vlivem nehomogenit statického magnetického pole a lokálních polí budou jaderné spiny vykonávat precesi na mírně odlišných frekvencích. Velikost signálu bude klesat exponenciálně s  $T_2^*$  [6].

Za čas TE/2 (TE = echo čas) se aplikuje druhý RF puls  $\pi$ . Ten převrátí spiny v rovině, ve které vykonávají precesi (transverzální rovina). Tím dostanou "pomalejší" spiny náskok o fázový úhel, který před  $\pi$  pulzem naopak ztrácely na "rychlejší" spiny. Za další TE/2 čas se všechny spiny srovnají, tzv. refokusují. Dochází k nárůstu signálu a k tvorbě spinového echa.  $\pi$  pulz refokusuje chemický posun a nehomogenity statického magnetického pole. Spinové echo, respektive  $\pi$  pulz však neodstraní útlum způsobený spin-spinovou relaxací  $T_2$  a pohybem atomů s rezonujícími jadernými spiny z excitační vrstvy v důsledku difúze nebo proudění. Znázornění časování pulzů a tvorby SE je demonstrováno na Obr. 1, kde je zobrazena sekvence PRESS (gradienty magnetického pole - Gx, Gy, Gz slouží k lokalizaci objemu, z kterého se detekuje signál).



Obr. 1. Schéma sekvence PRESS.

Druhým často používaným typem spektroskopických sekvencí je tzv. stimulované echo (STE). Pulzní sekvence pro stimulované echo je složena ze tří po sobě jdoucích  $\pi/_2$  pulzů. Při stimulovaném echu vznikají tři nežádoucí signály spinového echa, jež jsou způsobeny sfázováním spinů od každé dvojice pulzů [7]. Tato echa se však (obecně) nekryjí s tzv. stimulovaným echem, případně se dají odstranit přídáním dodatečných gradientů. Signál stimulovaného echa je důsledkem aplikaci všech tří  $\pi/_2$  pulzů. Jestliže se druhý pulz aplikuje v čase *TE/2* a třetí pulz v čase *TE/2+TM* (tzv. mixing time), tak stimulované echo nastane v čase *TE+TM*. Spinový systém

v čase *TE* podléhá hlavně spin-spinové relaxaci a v čase *TM* pouze spin–mřížkové relaxaci. Na první pohled se může zdát, že stimulované echo v podstatě odpovídá spinovému echu, s tím rozdílem, že se  $\pi$  pulz rozdělil na dva pulzy s určitou přestávkou, avšak z podrobnějšího výpočtu vyplývá, že amplituda signálu stimulovaného echa při zanedbání relaxačních procesů je poloviční oproti spinovému echu při použití sekvence s pulzy  $\pi/2$  a  $\pi$ .

Stimulované echo využívá sekvence STEAM, jejíž schéma je znázorněno na Obr. 2, (gradienty magnetického pole - Gx, Gy, Gz opět slouží k lokalizaci objemu). Její výhodou je možnost použití kratších *TE*.



Obr. 2. Schéma sekvence STEAM.

#### 2.1.5 Chemický posun a J vazba

Magnetické pole, které působí na jádra atomů, je složeno ze statického vnějšího magnetického pole  $B_0$  a z lokálních magnetických polí od jader a elektronů okolních atomů. Další složku tvoří proměnné magnetické pole od RF pulzů. Nejsilnější interakce, které vytváří lokální pole v diamagnetických látkách, je přímá dipól-dipólová interakce magnetických momentů ostatních jader.

V důsledku této interakce se rezonanční křivky ve spektrech štěpí nebo rozšiřují. V případě kapalné fáze se však tato interakce v důsledku rotací molekul středuje na nulovou hodnotu a její vliv zůstává pouze na relaxační procesy. Pro NMR kapalné fáze jsou typické projevy chemického posunu a nepřímé dipól-dipólové interakce (*J* vazby). Efekt chemického posunu je důsledkem polarizace elektronů v elektronovém obalu a v chemických vazbách vyvolaná přítomností silného externího magnetického pole. Tyto elektrony začnou vytvářet dodatečné stínicí pole. Rovnice popisující posun rezonanční frekvence v důsledku chemického posunu má tvar:

$$\omega_{\text{rez}} = \gamma \left(1 - \vec{\sigma}\right) B_{ext} , \qquad (2.17)$$

kde  $\vec{\sigma}$  je tenzorem chemického stínění (součet paramagnetického a diamagnetického příspěvku), v případě kapalin se však středuje a uplatní se pouze 1/3 jeho stopy. Z rovnice (2.17) je zřejmé, že frekvenční posun závisí na velikosti externího magnetického pole (je mu přímo úměrný). Jelikož je výhodné popisovat chemický posun nezávisle na velikosti externího magnetického pole tak, aby vyjadřoval pouze poměry ve zkoumané molekule, zavádí se relativní stupnice v ppm dle následujícího vztahu [8]:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{standard}}{\omega_{standard}} 10^6 = \frac{\sigma - \sigma_{standard}}{1 - \sigma_{standard}} 10^6 , \qquad (2.18)$$

kde  $\delta$  nezávisí na velikosti externího magnetického pole,  $\omega_{standard}$  je rezonanční frekvence standardu a  $\omega$  rezonanční frekvence zkoumané látky. Jako standard se v *in vivo* <sup>1</sup>H MR spektroskopii používá signál CH<sub>3</sub> funkční skupiny N-acetylaspartátu, který rezonuje na frekvenci 2,0 ppm, v <sup>31</sup>P MR spektrech má rezonanční frekvenci 0 ppm signál fosfokreatinu.

Molekuly s větším počtem elektronů mají větší rozpětí chemických posunů. Čím větší rozpětí chemických posunů, tím se jednotlivé signály ve spektru lépe přiřazují k jednotlivým atomům v molekule. Z tohoto pohledu je výhodné měření uhlíkových nebo fosforových atomů (bohužel u uhlíku je malé zastoupení (1%) izotopu <sup>13</sup>/<sub>6</sub>C, který je detekovatelný). Nejčastěji se však měří jádra <sup>1</sup>H izotopu (protony), pro ně jsou typické posuny v alifatických sloučeninách 1-3 ppm, u aromatických jader 6-7 ppm, v CHO 9-10 ppm a v COOH 11-12 ppm. Běžná konvence je, že chemický posun se v grafech zobrazuje tak, aby vlevo na ose byly větší hodnoty ppm, což znamená, že napravo jsou atomy, které jsou více stíněné od vnějšího magnetického pole, takže rezonují na menší frekvenci (nalevo analogicky opačně).

Další důležitou interakcí, která ovlivňuje podobu spekter, je nepřímá dipóldipólová interakce spinů – tzv. *J* vazba. Jedná se o interakci mezi magnetickými poli jader, která je zprostředkována elektrony v chemických vazbách. Interakce se dá popsat tenzorem  $\vec{J}$ . V kapalinách opět dochází ke středování a zůstává pouze skalární hodnota *J* interakce, která mezi neekvivalentními jádry způsobuje štěpení signálu o velikost *J* (ve frekvenční stupnici). *J* interakce má dosah přes několik chemických vazeb. Velikost štěpení (vzdálenosti signálů) ve spektru je daná *J* vazbou a nezávisí na vnějším magnetickém poli. Počet a relativní velikost signálů jsou dány počtem realizací celkového spinu skupiny ekvivalentních atomů, které vyvolávají štěpení pro uvažovanou druhou skupinu atomů. S *J* interakcí je spojeno použití tzv. decouplingu, což je experimentální technika, při které se potlačuje multipletní struktura spekter (nejčastěji heteronukleární decoupling aplikovaný na <sup>1</sup>H vůči např. <sup>31</sup>P).

### 2.2 Zpracování signálu

V této podkapitole budou popsány pojmy a postupy související se zpracováním signálu měřeného MR tomografem a techniky jeho vyhodnocení.

#### 2.2.1 Detekovaný signál

Jelikož je lidský organismus složen z velkého množství chemických látek, bude signál volné precese jader daného izotopu obsahovat celou řadu komponent (signálů - označeno indexem *k*):

$$s(t) = \sum_{k=1}^{N} n_k e^{-\frac{t}{T_{2k}}} e^{(\omega_k t + \phi_k)} , \qquad (2.19)$$

kde  $T_{2k}$  je spin-spinový relaxační čas, *t* čas od sklopení magnetizace,  $\omega_k$  Larmorova frekvence jednotlivých komponent signálu (včetně chemického posunu),  $n_k$  relativní četnost a  $\phi_k$  jejich fáze.

Cílem *in vivo* MR spektroskopie je obdržení intenzity jednotlivých signálů přispívajících na jejich Larmorově frekvenci. Standardní postup obnáší převedení měřeného signálu s(t) z časové domény do frekvenční domény  $S(\omega)$ . Spojovacím článkem mezi těmito vyjádřeními je FT [4]:

$$S(\omega) = \int_0^{-\infty} s(t) \exp(-i\,\omega t) dt \qquad (2.20)$$

Po provedení FT (a fázových korekcí, viz dále) se obdrží spektrum, které má dvě složky – reálnou, tzv. absorpční složku, a imaginární, tzv. disperzní složku:

$$S(\omega) = \sum_{k} \int_{0}^{-\infty} n_{k} e^{-\frac{t}{T_{2k}}} e^{i(\omega_{k}t)} e^{i\phi_{k}} exp(-i\omega t) dt = \sum_{k} e^{i\phi_{k}} \frac{n_{k}T_{2k}}{1-i(\omega_{k}-\omega)}$$
(2.21)

$$S(\omega) = \sum_{k} e^{i\phi_{k}} \left\{ \frac{T_{2k}}{1 + (\omega_{k} - \omega)^{2} T_{2k}^{2}} + i \frac{T_{2k}(\omega_{k} - \omega)}{1 + (\omega_{k} - \omega)^{2} T_{2k}^{2}} \right\}$$
(2.22)

Absorpční a disperzní složka spolu souvisejí Kramers-Kronigovymi relacemi. Pro vyhodnocování spekter se používá absorpční část (první člen v závorce v (2.22)), protože absorpční spektra jsou přehlednější. Pro získání čisté absorpční křivky se musí provést fázová korekce 0. a 1. řádu, což odpovídá násobení členů  $S(\omega)$ výrazem  $e^{-i\phi_k}$ , kde  $\phi_k = a + b\omega a a b$  jsou volné parametry. Ze vztahu (2.22) můžeme vyvodit dále několik důležitých závěrů pro absorpční složku signálu:

1. plocha pod absorpční křivkou je úměrná  $n_k$  – to znamená počtu jader přispívajících k signálu

2. absorpční křivka nabývá maxima pro  $\omega_k$  při velikosti  $n_k T_{2k}$ 

3. pološířka absorpční křivky je  $\frac{2}{T_{2k}}$ 

Integrál ve vztahu (2.20) je obraz idealizovaného experimentu. Signál se nemůže měřit nekonečně dlouho, protože pro  $t \gg T_{2k}$  by se již detekoval jen šum, který by zhoršoval kvalitu spektra. Přílišné zkrácení detekce má ale vliv na pokles obdrženého integrálu a může způsobit oscilace ve spektru. Někdy je nutno signál FID v časové doméně násobit apodizační funkcí, např. exponenciální pokles, která potlačí oscilace a šum ve spektrech (viz kapitola 2.2.2). Apodizační funkce může rozšířit absorpční křivky.

Signál FID není možné měřit hned po sklopení magnetizace z důvodu tzv. mrtvé doby, při které dochází k přepnutí vysílacího a přijímacího systému tomografu. Tato změna integrační meze ve výrazu (2.20) opět způsobuje deformace spektra a pokles signálu.

Poněvadž není známa spojitá funkce závislosti signálu s(t) na čase, ale pouze její diskrétní hodnoty v okamžicích odečtu, nelze provádět spojitou FT pomocí integrace a musí se použít diskrétní Fourierova transformace (DFT) [9]:

$$S(k) = \Delta t \sum_{n=0}^{N-1} n_j e^{\left(-\frac{t}{T_{2k}} + i\omega_j t\right)(n\Delta t + t_0)} e^{\left(-i\frac{nk}{N}\right)}, \qquad (2.23)$$

kde k je frekvenční souřadnice, N počet odečtů v časové doméně a  $\Delta t$  perioda odečtu.

#### 2.2.2 Používaný software a operace se spektry

Před převedením změřené časové závislosti signálu MR spektra do frekvenční domény lze provést několik operací, které zlepší obdržené výsledky. Nejčastěji připadá v úvahu doplnění signálu nulovými intenzitami ("nulami") nebo naopak jeho zkrácení, korekce na vířivé proudy a apodizace [10].

Doplněním změřeného signálu o nulové intenzity zprava se uměle prodlužuje délka časové závislosti pro FT. To je výhodné, protože rozlišení spektra ve frekvenční doméně je nepřímo úměrné k délce měřicího intervalu. Racionální doplnění "nulami" může být výhodnější než prodloužení skutečné doby měření nejen z časových důvodů, ale i z ohledu na podíl signálu vůči šumu (SNR). Při vyhodnocování dat si však uživatel programu musí uvědomit, že doplněním časové závislosti o "nuly" se nepřidá do spektra žádná dodatečná informace, je to pouze obdoba extrapolace dat, která vizuálně zlepší vzhled spekter.

Zkrácení měřeného signálu spektra (tzv. truncation) se může provést buď na jeho konci, nebo na počátku. Zkrácení na konci slouží k potlačení šumu. Zkrácení na začátku se provádí, pokud je spektrum deformované a první body signálu FID jsou špatné (v důsledku nedokonalého oddělení excitačních pulzů a detekce). Bohužel, tyto body signálu nesou nejvíce informací. Při zkrácení konce signálu můžou vznikat oscilace ve spektru, pokud signál nebyl plně relaxovaný (na úrovni šumu).

Korekci na vířivé proudy je třeba realizovat, jestliže pro obdržené MR spektrum nelze dobře provést fázové korekce. Vířivé proudy vznikají v kovových součástech MR tomografu a ve vodivých tkáních pacienta jako důsledek Lenzova zákona po aplikaci gradientů magnetického pole (proměnné magnetické pole). V signálu se vířivé proudy projeví jako časově závislý fázový posun jednotlivých komponent signálu. Korekce se provádí určením tohoto časově závislého posunu z MR signálu vody z analogické měřicí sekvence, která neobsahuje pulzy pro potlačení signálu vody (WS [2]).

Změřený MR signál lze také apodizovat. Apodizace je proces, při kterém je měřený signál vynásoben jistou funkcí, tzv. filtrem. Dle typu použité funkce dochází ke kompenzaci různých efektů. Nejčastějším záměrem je zvýšení poměru SNR a kompenzace nedostatečné délky doby měření signálu (předejití vzniku oscilací). Tomuto účelu například vyhovuje exponenciální funkce:

$$F(t) = e^{-\frac{t}{T_{tl}}} , \qquad (2.24)$$

kde konstanta  $T_{tl}$  se volí co nejblíže  $T_2$  relaxačnímu času tak, aby došlo k co nejlepšímu navýšení poměru SNR.

Při aplikaci apodizační funkce se neovlivní integrální intenzita jednotlivých signálů sloučenin, pokles signálu v čase bude charakterizován časem  $T_2'$ , pro který platí:

$$\frac{1}{T_2'} = \frac{1}{T_2^*} + \frac{1}{T_{tl}} \quad . \tag{2.25}$$

Jiným používaným filtrem je Gaussova funkce, kterou se může selektivně zesílit pouze jistý úsek signálu, takže lze kompenzovat špatný počátečný signál. Vedle dvou výše zmíněných filtrů existuje mnoho jiných složitějších filtrů, například filtr Lorentz-Gaussovský aj.

Ve frekvenční doméně se může na spektrech provést korekce základní čáry na nulovou úroveň (tzv. baseline correction), posun signálu ve frekvenční škále a fázové korekce. Korekci základní čáry je nutné udělat v případě, pokud paty jednotlivých signálů neleží ve stejné nulové rovině. Při této proceduře se pozadí spektra prokládá např. polynomem, který se následně odečte od změřeného MR spektra. Do zmíněného pozadí spektra přispívají signály velkého počtu různých makromolekul, které mají krátké T<sub>2</sub> relaxační časy a široké spektrální čáry.

Posun spektra ve frekvenční škále je běžná operace, kdy se celé spektrum frekvenčně posune, tak aby frekvence  $\delta$  (ppm) odpovídala zvolenému standardu.

Pokud má spektrum již požadovanou kvalitu, může se pokračovat v určení jednotlivých integrálních intenzit signálu.

Pro výpočet integrálu i pro zpracování spekter v rámci předložené práce byl použit program jMRUI (viz internetové stránky: http://www.mrui.uab.es/mrui/). V programu jMRUI jsou zabudovány dvě základní skupiny procedur pro výpočet integrálních intenzit. Jedna procedura je založena na metodě nejmenších čtverců a použití tzv. prior knowledge (modul AMARES). Druhá skupina procedur je postavena na singulárním rozkladu spektra [11].

Ve své diplomové práci jsem pro kvantitativní vyhodnocení používal modul AMARES s "prior knowledge". "Prior knowledge" je předem známá informace o předpokládaných komponentách ve spektru. Tyto komponenty se pak přes svoje parametry metodou nejmenších čtverců fitují do změřeného spektra. Některé parametry jsou zcela volné, některé mají povolený interval rozptylu, nebo jsou zcela pevné. K veličinám s povoleným intervalem patří pološířka a rezonanční frekvence jednotlivých signálů. K pevně daným veličinám patří tvar křivky signálů (Lorentzova křivka, Gaussova křivka) a vzájemné poměry integrálů (u dubletů a tripletů ATP).

#### 2.2.3 Kvantifikace metabolitů v MR spektrech

Existují dva přístupy v kvantitativním hodnocení metabolitů. Relativní zastoupení metabolitu se určuje poměrem integrálních intenzit spektrálních čar jednotlivých metabolitů. Tento přístup je jednodušší a často se používá v klinické praxi. Nevýhodou je, že se nelze vyhnout případům, kdy je nejasné, zda zmenšení nebo zvětšení konkrétního poměru došlo v důsledku poklesu nebo zvětšení jedné jeho složek. Dokonce pokud poklesnou, nebo vzrostou všechny koncentrace metabolitů, tak se tento výsledek neprojeví na poměrech integrálních intenzit metabolitů. Poměry jsou navíc závislé na parametrech použité měřicí sekvence.

Ze změřených relativních poměrů lze určit i absolutní koncentraci metabolitů, pokud se poměry vztáhnou k metabolitu, který má u většiny osob známou nebo přibližně stejnou koncentraci. Tento způsob kvantifikace označujeme jako metodu interního standardu. Tento postup není zcela přesný, ale při měření ne zcela definované oblasti (např. signál FID měřený pomocí povrchové cívky – jednotlivé měření osoby mají různě velké svaly) je to jediná možnost, jak určit absolutní koncentrace. V <sup>1</sup>H MRS se často vztahují spektra k obsahu vody v dané oblasti, v <sup>31</sup>P MRS svalu ke koncentraci adenosintrifosfátu (ATP) ve svalu (8,2 mmol/l) [12].

Druhá technika určení koncentrace metabolitů spočívá v porovnávání intenzity signálu z měřené tkáně a externího standardu o známé koncentraci. Při tomto postupu lze porovnávat pouze signály, které byly změřeny stejným experimentálním vybavením a stejnými sekvencemi. Navíc by se měla provést korekce dalších vlivů, které jsou zmíněny v podkapitole 2.2.4. Celkový výraz pro koncentraci ve tkáních pak nabývá tvaru (2.26):

$$C_{vivo} = \frac{C_{st}V_{st}N_{st}S_{st}^{cor}}{V_{vivo}N_{vivo}S_{vivot}^{cor}} , \qquad (2.26)$$

kde  $V_{st}$ ,  $V_{vivo}$  jsou objemy voxelu v externím standardu a v tkáni,  $N_{st}$ ,  $N_{vivo}$  počet aktivních atomů v molekule přispívajících k signálu,  $C_{st}$  známá koncentrace látky ve standardu a  $S_{st}^{cor}$ ,  $S_{vivot}^{cor}$  naměřený signál ze standardu a z tkáně korigovaný na dále zmíněné vlivy podle vztahu (2.27).

$$S_{st}^{cor} = \frac{S_{st}^{cor}}{f_{rel}f_{pl}f_{PV} atd}$$
(2.27)

#### 2.2.4 Korekce pro kvantifikaci metabolitů

#### 2.2.4.1 Korekce f<sub>rel</sub> na relaxační dobu

Jednotlivé metabolity se liší spin-spinovými a spin-mřížkovými relaxačními časy. Spin-spinová relaxace rozfázovává vektor magnetizace v rovině kolmé na statické magnetické pole. Spin-mřížková relaxace vrací vektor magnetizace do rovnovážného stavu (do roviny kolmé na statické pole). Pokles signálu spin-mřížkovou relaxací však není velký, protože  $T_1$  časy jsou poměrně dlouhé vůči celkové délce sekvence. Ve většině případů je spíše problém s nedostatečnou obnovou longitudinální magnetizace při měření více akvizic. Celkový korekční faktor pro kompenzaci  $T_2$ relaxace a nedostatečné obnovy magnetizace má tvar má tvar (2.28) [6], v němž *TR* odpovídá repetičnímu času a čas *TE* je doba, ve které se magnetizace vyvíjela v transverzální rovině od svého sklopení až k své detekci.

$$f_{rel} = (1 - e^{-\frac{TR}{T_1}})e^{-\frac{TE}{T_2}}$$
(2.28)

#### 2.2.4.2 Korekce f<sub>pl</sub> na plnění a tvar cívky, offset metabolitů a polohu voxelu.

Každý objekt, který se vloží do cívky, která je součástí MR tomografu a generuje RF pulzy, ovlivňuje zpětně vlastnosti cívky, které jsou popsány její indukčností. Indukčnost cívky pak závisí na tvaru, velikosti a objemu vzorku nebo tkáně, který je v ní umístěn. Indukčnost cívky také závisí na jejím tvaru.

Různá indukčnost cívky se projevuje jak na jejích excitačních (např. velikost amplitudy  $B_1$ ), tak i na detekčních vlastnostech.

Dále je možné zahrnout korekci intenzity signálu, která plyne z diference chemického posunu jednotlivých metabolitů, kvůli neuniformitě profilů excitačních pulzů.

Intenzita signálu v neposlední řadě závisí na poloze voxelu vůči cívce. V případě povrchové cívky klesá její detekční schopnost se vzdáleností velice rychle, a proto je vhodná pro měření struktur blízkých povrchu těla.

#### 2.2.4.3 Korekce f<sub>PV</sub> na "Partial volume"

Při měření *in vivo* nelze vyloučit situace, kdy voxel zasahuje několik různorodých tkání. V takovém případě je výsledný signál součtem signálů z jednotlivých tkání ve voxelu, které mohou mít různou koncentraci detekovaných metabolitů.

V případě lýtkové části nohy připadá v úvahu tkáň kostní, svalová, tuková a krev. Z krve přispívá signál 1,2-bifosfoglycerátu (BPG) [13], ale objem krve v žílách a tepnách je v lýtku malý. Z kostí se nedetekuje žádný signál a navíc se lze voxelem kostem snadno vyhnout. Zbývá pouze svalová a tuková tkáň. Výpočet jejich jednotlivých příspěvků do celkového signálu lze provést posouzením jejich zastoupení ve voxelu pomocí segmentace anatomických obrazů. S korekcí  $f_{PV}$ souvisí i korekce na artefakty chemického posunu (CSA). Artefakt chemického posunu je vzájemný prostorový posun voxelů jednotlivých metabolitů s odlišnou Larmorovou frekvencí (umístění voxelu závisí na přesné Larmorově frekvenci daného metabolitu).

#### 2.3 MR zobrazování

MR zobrazování představuje základní využítí magnetické rezonance v radiodiagnostice. Existuje velice mnoho měřicích sekvencí, jež se liší v řadě parametrů, ale principy vzniku obrazů jsou totožné. Neprve je aplikován gradient magnetického pole ve směru jedné osy (i obecné, zde zvolena osa z):

$$B(z) = B_0 + G_z z . (2.29)$$

Tímto způsobem se stane Larmorova frekvence jednotlivých metabolitů s chemickým stíněním  $\sigma_m$  závislá na poloze (v případě zobrazování je obraz většinou tvořen vodou, případně lipidy) [6]:

$$\omega_{0m} = \gamma (1 - \sigma_m) (B_0 + G_z z) \approx \gamma (1 - \sigma_m) B_0 + \gamma G_z z \quad (2.30)$$

Současně s gradientem je zapnut i selektivní radiofrekvenční pulz o frekvenci  $\omega_{0m}$ . Radiofrekvenční pulz plní rezonanční podmínku pouze v jedné úzké vrstvě kolmé na gradient magnetického pole:

$$z = \frac{\omega_{0m} - \gamma (1 - \sigma_m) B_0}{\gamma G_z z} \quad . \tag{2.31}$$

Šířka vrstvy je úměrná frekvenční šíři použitého pulzu  $\Delta \omega$  a velikosti gradientu:

$$z = \frac{\Delta\omega}{\gamma G_z} \ . \tag{2.32}$$

V uvažované vrstvě dojde ke sklopení jaderné magnetizace o úhel, který je dán velikostí a délkou působícího pulzu.

Další krok v sekvenci představuje kódování x a y souřadnice do precesního pohybu spinů. Pro kódování x souřadnice je použita frekvence spinů a pro kódování y souřadnice je využita jejich fáze. Frekvenční kódování se provádí zapnutím gradientu magnetického pole podél x souřadnice při náběru signálu, tím se stane frekvence volné precese jednotlivých látek závislá na x-ové souřadnici. Poslední prostorová souřadnice y se zakóduje do fáze použitím gradientu magnetického pole ve směru osy y v době před náběrem signálu. Tento gradient pak ovlivní fázi jednotlivých spinů dle vztahu (2.33):

$$\varphi(y) = \gamma(B_0 + yG_{y,n})\tau_1 , \qquad (2.33)$$

kde  $B_0$  je velikost statického magnetického pole a  $\tau_1$  doba působení fázového gradientu. Fázový gradient se musí použít opakovaně při různých intenzitách  $G_{y,n}$ 

tak, aby pokryl celý dále zavedený k-prostor. Vzhledem k periodicitě fáze může dojít k přeložení obrazu z jednoho konce na druhý konec.

Příklad klasické MR zobrazovací sekvence se spinovým echem je zobrazen na Obr. 3. Na něm můžeme pozorovat počáteční  $\pi/2$  pulz s gradientem ve směru osy *z*, který sklopí magnetizaci v požadované vrstvě.



Obr. 3 MR zobrazovací sekvence spinového echa.

Následuje aplikace fázového gradientu  $G_y$  v čase *TE/2*. Poté přichází na řadu  $\pi$  pulz spolu s původním gradientem  $G_z$ , který překlopí spiny v uvažované vrstvě a způsobí vznik spinového echa (SE) za dvojnásobný čas. SE se měří při zapnutém frekvenčním gradientu  $G_x$ . Místo SE se i používá tzv. gradientové echo (GE). V GE jsou RF  $\pi$  pulzy nahrazeny silným gradientem magnetického pole ve směru  $G_x$ , zároveň je použit i slabší gradient magnetického pole ve směru  $G_y$ .



Obr. 4 MR zobrazovací sekvence gradientového echa.

Gradient  $G_x$  rozfázuje spiny v uvažované vrstvě. Za určitý čas je použit gradient  $G_x$  s opačným průběhem než poprvé, což způsobí opětovnou refokusaci spinů a tvorbu GE. GE jsou oproti spinovým echům rychlejší, ale jsou citlivější na nehomogenity statického pole.

U MR zobrazovací sekvence jsou důležitými parametry echo čas (TE) a repetiční (opakovací) čas TR. V závislosti na jejich délce je možné ovlivňovat vlastnosti obrazu. Při dlouhém TR a krátkém TE je obraz určen hustotou spinů (tzv. protondenzitní obraz). Při zkracování času TR nedojde k dostatečné spin-spinové relaxaci u některých tkání, takže jejich signál bude zmenšen v důsledku neobnovení jejich podélné složky magnetizace (T1-vážený obraz - na kontrastu se podílí rozdíl v T<sub>1</sub> časech jednotlivých tkání). Naopak při prodlužování TE se bude výrazně zmenšovat příspěvek signálu od tkání s krátkou spin-spinovou relaxací (T2-vážený obraz - na kontrastu se podílí rozdíl T<sub>2</sub> časů jednotlivých tkání).

#### 2.3.1 Získání MR obrazu

Detekovaný signál obrazu popsané zobrazovací sekvence bude úměrný výrazu (2.34) [7]:

$$S(G_{y,n};t) \approx \iint_{vrstva} n(x;y) e^{-i\gamma (xG_x t + yG_{y,n}\tau_1)} dxdy \quad . \tag{2.34}$$

V integrálu (2.34) nejsou pro zjednodušení vyjádřeny relaxace. Lze zavést tzv. *k*prostor vztahy, (2.35) a (2.36), kde *t* je doba detekce a  $\tau_1$  doba aplikace fázového gradientu  $G_{y,n}$ .

$$k_x(t) = \gamma G_x t \tag{2.35}$$

$$k_{y}(G_{y,n}) = \gamma G_{y,n} \tau_1 \tag{2.36}$$

Integrál (2.34) v následujících nových souřadnicích je přehlednější:

$$S(k_x;k_y) \approx \iint_{vrstva} n(x;y) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy \quad . \tag{2.37}$$

Jelikož je během zobrazovací sekvence (Obr. 3) naměřena závislost  $S(k_x; k_y)$  na  $k_x; k_y$  lze provést její 2D FT v těchto proměnných a získat obraz hustoty protonů (<sup>1</sup>H) n(x; y) v uvažované vrstvě.

### 2.4 Signály <sup>31</sup>P a <sup>1</sup>H sloučenin v MR spektru svalu

V této podkapitole bude podán přehled sloučenin, které lze detekovat ve svalech metodami <sup>31</sup>P a <sup>1</sup>H MRS. U vybraných sloučenin bude uvedena jejich funkce v organizmu a vlastnosti důležité pro MR vyšetřování.

#### 2.4.1 <sup>31</sup>P MR spektrum

Ve svalech lze detekovat několik významných sloučenin obsahující fosfor [13]. Specifikem fosforových sloučenin jsou jejich poměrně dlouhé  $T_1$  relaxační časy a naopak krátké  $T_2$  relaxační časy.  $T_1$  relaxační čas se u ATP pohybuje kolem 4 až 5 s, u PCr a anorganického fosfátu (Pi) 6 až 7 s a u fosfodiesterů dosahuje až 8-9 s.  $T_2$ relaxační čas je u ATP přibližně 50 ms, u Pi 150 ms, u PCr 350 ms a u fosfodiesterů 400 ms [14]. Uvedené relaxační časy platí pro metabolity umístěné do magnetického pole o velikosti 3T.

Na relaxačních mechanismech fosforových sloučenin se podílí dipol-dipolová interakce, ale i anizotropie chemického posunu.

Krátké  $T_2$  a dlouhé  $T_1$  časy jsou nevýhodné pro měření, protože dlouhé  $T_1$  časy snižují možnosti akumulace měření a krátké  $T_2$  omezují použití lokalizované spektroskopie [15].

Samotné <sup>31</sup>P MR spektrum svalu vivo se rozkládá v rozmezí 25 ppm. Pro porovnání <sup>1</sup>H MR spektrum in vivo se rozkládá v rozmezí pouze 10 ppm [16]. Typické fosforové spektrum je zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 5 Změřené <sup>31</sup>P MR spektrum svalu.

### 2.4.1.1 Fosfokreatin (PCr)

Největší signál v <sup>31</sup>P MR spektru svalu pochází od fosfokreatinu (Obr. 6). Tato sloučenina funguje ve svalech jako okamžitý zdroj pro tvorbu molekul ATP, proto se její koncentrace během cvičení zmenšuje. Po zátěži se obnovují původní klidové koncentrace fosfokreatinu ze zvýšené syntézy ATP v mitochondriích.

Fosfokreatin se nenalézá v játrech (v játrech není enzym kreatin-fosfokináza). Tohoto jevu lze využít k ověření lokalizace MR fosforových spekter při měření <sup>31</sup>P v játrech.

Signál fosfokreatinu se často považuje za referenci a to kvůli zmíněné velké amplitudě a i k jeho poloze poblíž pomyslného středu fosforového spektra.



Obr. 6 Fosfokreatin

#### 2.4.1.2 Adenosintrifosfát (ATP)

ATP je jedna z nejdůležitějších látek v lidském těle, představuje základní energetický zdroj organismu. Velká část ATP je v buňkách využívána k chodu proteosyntézy a buněčných pump [17]. Ve svalových buňkách dochází navíc k velké spotřebě ATP při vykonávané fyzické činnosti.

Celkem má molekula ATP (Obr. 7) tři fosforové atomy v neekvivalentních polohách, označovaných  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Každému přísluší vlastní signál ve fosforovém MR spektru ( $\alpha$ ATP ~ -7,8 ppm,  $\beta$ ATP ~ -16,1 ppm,  $\gamma$ ATP ~ -2,8 ppm). Jejich multipletní struktura je dána tím, že  $\alpha$  a  $\gamma$  <sup>31</sup>P sousedí pouze s jedním <sup>31</sup>P, tudíž jejich signály budou dublety. Signál  $\beta$ ATP je tripletem, poněvadž  $\beta$  <sup>31</sup>P sousedí jak s  $\alpha$  tak  $\gamma$  <sup>31</sup>P.

Klidová hodnota koncentrace ATP ve svalech je přibližně 8,2 mmol/l [12]. Během cvičení se koncentrace ATP u zdravých jedinců takřka nemění, což je zajištěno kreatinfosfatázovou reakcí (viz kapitola 2.6). Signál βATP je nejvhodnější pro vyhodnocení, neboť se jeho rezonanční frekvence nekryje s dalšími slabšími signály jiných metabolitů (ADP, AMP) [13].



Obr. 7 ATP

#### 2.4.1.3 Anorganický fosfát (Pi)

Signál anorganického fosfátu je ve spektru dobře znatelný, hlavně při fyzické zátěži. Při cvičení narůstá jeho koncentrace až několikanásobně v důsledku jeho uvolnění z rozpadu ATP na ADP. Po cvičení se vrací na klidové hodnoty.

Nárůst volného fosfátu je spolu s poklesem pH považován za hlavní činitel okamžité únavy svalu [18]. Jeho chemický posun závisí i na kyselosti okolního prostředí, protože se v buňkách nachází ve dvou disociačních formách kyseliny fosforečné (Obr. 8) [19].

Ze známé závislosti jeho chemického posunu vůči PCr lze pak určit pH svalu (viz kapitola 2.8).

V <sup>31</sup>P MR spektru může nastat situace, kdy se signál volného fosfátu rozštěpí na dva signály. To nastává při fyzické zátěži. Může to být důsledkem toho, že detekovaný signál fosfátu pochází z rychlých i pomalých vláken, jež mají navzájem odlišný metabolismus, a tudíž i pH [20]. Druhé vysvětlení, které se nabízí, je, že detekovaný signál pochází i od svalů, které nejsou tak intenzivně zapojeny do cvičení.

Obr. 8 Anorganický fosfát

#### 2.4.1.4 Fosfomonoestery (PME: PC, PE)

K fosfomonoesterům patří především fosfoetanolamin (PE) a fosfocholin (PC). V MR spektru svalu jsou jejich signály málo znatelné a jejich velikost není cvičením ovlivněna, i když PME jsou glykolytické meziprodukty. Většina fosfomonoesterů slouží buňce jako prekurzory látek ke tvorbě buněčných membrán [21].

#### 2.4.1.5 Fosfodiestery (PDE: GPC, GPE)

Nevětší signál z fosfodiesterů má glycerol-3-fosfocholin (GPC) a glycerol-3fosfoetanolamin (GPE). Jejich signál je vůči signálu od fosfomonoesterů silnější, ale za námahy se rovněž nemění. Fosfodiestery detekované ve fosforovém spektru jsou považovány za látky, které jsou naopak vyřazeny z buněčných membrán a jsou určeny k degradaci [21].

#### 2.4.1.6 Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH)

NADH (Obr. 9) představuje jedno z hlavních redukčních činidel v buňce. Jeho signál je slabý, ale ve spektru rezonuje u paty αATP.



Obr. 9 NADH

#### 2.4.2 <sup>1</sup>H MR spektrum svalu

Příklad protonového spektra změřeného z lýtkového svalu je na Obr. 10. Detekované sloučeniny jsou popsány dále.



Obr. 10 Změřené <sup>1</sup>H MR spektrum svalu.

#### 2.4.2.1 Voda

Voda má nejsilnější signál ze všech pozorovatelných sloučenin v protonovém MR spektru. Jeho intenzita ve tkáni *in vivo* odpovídá koncentraci přibližně 40 mol/l. Koncentrace ostatních sledovaných metabolitů je o 4 řády nižší, proto se pro jejich detekci signál vody hardwarově i softwarově potlačuje.

Pro relativně stálou koncentraci vody v tkáni, lze její signál použít k výpočtu koncentrací ostatních látek.

#### 2.4.2.2 Kreatin (Cr)

Kreatin (Obr. 11) je komplementárně doplňková sloučenina k fosfokreatinu. Celková klidová koncentrace kreatinu spolu s fosfokreatinem je ve svalu přibližně 42,5 mmol/l [22].


Obr. 11 Kreatin

### 2.4.2.3 Triglyceridy

Ve svalové tkáni existují dva druhy uložení triglyceridů. Jednak můžou být triglyceridy uchovány ve svalových buňkách ve formě tukových kapének, mluvíme o tzv. intramyocelulárním tuku. Druhou možností uchovávání glyceridů jsou tukové buňky, tzv. adipocyty (extramyocelulární tuk). V těch jsou triglyceridy uloženy ve formě válcovitých provazců.

Triglyceridy mají odlišnou magnetickou permeabilitu než okolní tkáň. V důsledku toho je magnetické pole uvnitř (i ve velmi blízkém okolí) triglyceridových útvarů jiné než v okolní tkáni. Mikroskopické triglyceridové magnetické pole je navíc závislé na samotném tvaru triglyceridů a jejich orientaci vůči vnějšímu magnetickému poli. Z toho vyplývá, že tukové kapénky (koule) ve svalových buňkách budou mít odlišnou Larmorovu frekvenci než zbylá tuková tkáň (válce).

V důsledku tohoto efektu jsou pak tyto dvě formy tuku ve spektru rozlišitelné. Navíc se každý ze signálů rozpadne na další dva píky, protože protony jsou vázány ve skupině  $CH_2$  nebo  $CH_3$  [23] (viz Obr. 10).

#### 2.4.2.4 Další látky

Další látky, které lze <sup>1</sup>H MR spektroskopií detekovat ve svalu jsou cholin, karnitin, acetylkarnitin (Obr. 12). Karnitin a acetylkarnitin jsou sloučeniny, jež jsou součástí mitochondriálního cyklu pro transport acylových řetězců přes jejich membrány. Acetylkarnitin se tvoří uvnitř mitochondrií při nadbytku acetyl-CoA z karnitinu a jako přebytečná sloučenina je transportován ven z mitochondrie, kde je přeměněn zpět na karnitin resp. acylkarnitin [24].



Obr. 12 Acetylkarnitin a cholin.

# 2.5 Stavba svalu a průběh svalové kontrakce

Svaly u člověka se podle struktury a funkce dělí na kosterní (tzv. příčně pruhovaná svalovina), hladkou a srdeční svalovinu a myoepitel. Jelikož se tato diplomová práce zabývá kosterním svalstvem, bude popis omezen pouze na něj.

Příčně pruhovaný sval se skládá ze svalových vláken, které se dále skládají do větších funkčních jednotek – do bříšek a svalových hlav. Svalová vlákna jsou tvořena z několika sarkomer. Jednotlivé sarkomery jsou složeny z myofibril. Sarkomera je základní funkční jednotka svalu.

Každá sarkomera je ohraničena dvěma tzv. Z disky, ke kterým jsou přichycena aktinová vlákna. Ve středu sarkomery je tzv. H zóna, z které vybíhají naproti aktinovým vláknům tlustší vlákna myozinová. Aktinová vlákna vybíhající z okrajů sarkomery nedosahují H zóny, ale v jisté části sarkomery se jejich konce překrývají s konci myozinových vláken [25]. Uspořádání aktinových a myozinových vláken v sarkomeře vytváří typický mikroskopický vzhled, od kterého pochází celé pojmenování tohoto typu svalstva. Stavba sarkomery je znázorněna na Obr. 13.



Obr. 13 Stavba sarkomery.

Aktinové vlákno je dvoušroubovice tvořená kulovitými monomery aktinu, na které se vážou molekuly troponinu a tropomyozinu. Myozinové vlákno je složeno asi ze 150 molekul myozinu, které mají na svém konci myozinovou hlavičku, na které v průběhu svalové kontrakce probíhá hydrolýza ATP.

Z biochemického a fyziologického pohledu se svalová vlákna dělí na vlákna typu I a II, případně III (přechodové typy).

Vlákna typu I (SO slow oxidative) [26] jsou vlákna, ve kterých jako hlavní zdroj energie slouží oxidativní fosforylace. Tento typ vláken je tudíž méně unavitelný, a proto převládá ve svalech, které jsou určeny pro statické, pomalé pohyby nebo polohové funkce. Vlákna typu I mají vůči vláknům typu II menší průřez, obsahují více mitochondrií a jsou bohatě prokrveny.

Vlákna typu II mají velkou glykolytickou kapacitu a jsou určena pro rychlé a silové pohyby. Dělí se na dvě podskupiny A a B. Skupina vláken II A (FOG - fast oxidative glycolytic) [26] má střední oxidační kapacitu a středně rychlou unavitelnost oproti vláknům skupiny II B (FG - fast glykolytic).

Ve svalu soleus je 70 - 90 % svalových vláken typu I, ve svalu gastrocnemius je toto zastoupení menší - 40 až 60% [27,28] (viz Obr. 22). Tento poměr závisí na genotypu každého člověka, věku a na typu provozované zátěže (rozdíl mezi maratonskými běžci a sprintery).

Průběh svalové kontrakce je následující. Nejprve přijde nervový vzruch na nervosvalovou ploténku. Mediátor acetylcholin uvolněný ze svalové ploténky aktivuje nikotinové receptory, které otevřou Na<sup>+</sup> kanály [29]. Tím se vytvoří akční potenciál, který se šíří po celé sarkomeře. Na změnu potenciálu reagují vápenaté kanály v sarkoplazmatickém retikulu, které se zprůchodní pro  $Ca^{2+}$  ionty. Vápenaté ionty se navážou na troponin. Touto vazbou se mírně posune i tropomyozin, což způsobí zpřístupnění vazebného místa pro hlavičky myozinu. Dojde ke štěpení ATP a následné konformační změně hlavičky myozinu vůči aktinovému vláknu, což způsobí zasunutí aktinového a myozinového vlákna více do sebe. Následná konformace hlavičky myozinu a aktinového vlákna je stabilní, dokud nedojde k výměně ADP za ATP. Po výměně ADP za ATP, se celý proces opakuje, pokud jsou ještě přítomny  $Ca^{2+}$  ionty. Další ATP ve svalu se spotřebovává k čerpání  $Ca^{2+}$ zpět do endoplazmatického retikula.

# 2.6 Metabolické děje a zdroje energie ve svalové tkáni

Lidský organismus představuje složitý komplex chemických reakcí, které na sebe navazují, ovlivňují se a vzájemně se regulují. Pří hodnocení biochemických dějů v organismu se musí přihlédnout k celkovému fyziologickému a biologickému aspektu procesu.

V následujících podkapitolách bude podán základní přehled biochemických reakcí probíhajících ve svalové tkáni při vykonávané námaze.

Při každém stahu svalu dochází k okamžité spotřebě molekul ATP (2.38) [30]:

$$ATP + H_20 \leftrightarrows ADP + P_i + \alpha H^+ + Energie \qquad (2.38)$$

Množství uvolněné volné energie a  $H^+$  závisí na koncentraci okolních iontů (~ v klidu -64 kJ/mol a  $\alpha \approx 0,64$  [30]). Z rovnice vyplývá, že se bude ve svalu při námaze zvyšovat koncentrace ADP a volného Pi, a naproti tomu klesat koncentrace ATP. K vyrovnání poklesu koncentrace ATP slouží několik mechanizmů. Prvním mechanizmem je kreatinfosfatázová reakce, kdy dochází k přeměně fosfokreatinu na kreatin za současné přeměny ADP na ATP (2.39):

$$PCr + ADP + \alpha H^+ \leftrightarrows Cr + ATP \tag{2.39}$$

Reakce probíhá za přítomnosti  $Mg^{2+}$  a  $Mn^{2+}$  iontů a  $\alpha \approx 0,85$  [30]. Tato reakce dokáže velice rychle vyrovnat výkyvy ATP, takže během cvičení samotná hladina ATP ve svalu zůstává u zdravých osob konstantní. Celkové množství ATP ve svalu je tak malé, že by jeho zásoba vydržela svalu jen na několik málo vteřin intenzivního cvičení, tudíž PCr slouží jako okamžitá zásobárna energie svalu.

PCr má funkci transportní, neboť kreatinfosfatázová reakce probíhá v opačném směru v intermembránovém prostoru mitochondrií, kde naopak snižuje hladinu ATP za vzniku PCr.

Kreatinfosfatázovou reakci katalyzuje enzym ATP kreatin-fosfokináza, jejíž aktivita je závislá na poměru ATP/ADP. Při tvorbě ATP se spotřebovává  $H^+$  (koeficient  $\alpha$  je větší než u rozpadu ATP), takže lze předpokládat, že na začátku cvičení poroste pH svalu (změna pH má zpětně vliv na rovnováhu dalších metabolických reakcí).

Druhou možností doplnění ATP je tzv. adenylát-cyklázová reakce, při které dochází k obnově ATP ze dvou molekul ADP při vzniku AMP (2.40):

$$ADP + ADP \xrightarrow{Mg^{2+}} ATP + AMP$$
 (2.40)

Tato reakce je katalyzována ATP/AMP fosforyltransferázou. Podílí se přibližně jednou čtvrtinou na okamžitém vzniku ATP. Její činností klesá poměr ATP/AMP, což aktivuje AMP dependentní kinázu, která je jednou z hlavních regulátorů anabolických a katabolických procesů. Tlumí syntézu mastných kyselin a naopak podporuje jejich absorpci a oxidaci, urychluje glykolýzu, zvyšuje absorpci glukózy do buněk zvětšením translokace a exprese GLUT4 transportéru, stimuluje mitochondriální biogenezi pomocí zvýšení aktivity transkripčního faktoru NRF1 a expresi ko-aktivátoru PGC-1α [31].

Třetí mechanizmus obnovy ATP je samotná syntéza ze zásobních látek (z glukózy, resp. glykogenu a z tuků). Glukóza se zpracovává v glykolytické dráze, která probíhá v cytoplazmě svalové buňky. Skládá se z deseti reakcí. Výchozí látkou je glukóza, konečným produktem je pyruvát [32]. Vzniklý pyruvát se buď přeměňuje na laktát za pomoci o koenzymu NADH, nebo putuje do mitochondrie, kde probíhá jeho zpracování v citrátovém cyklu a v oxidativní fosforylaci.

#### 2.6.1 Anaerobní fermentace

Anaerobní fermentace představuje vznik laktátu z pyruvátu pomocí enzymu laktát dehydrogenázy za současné oxidace NADH na NAD<sup>+</sup>. Celá dráha anaerobní glykolýzy včetně anaerobní fermentace probíhá v cytoplazmě buňky. Její výhodou je, že nepotřebuje ke svému chodu kyslík a je až 100 krát rychlejší než oxidativní fosforylace. Sumární vzorec anaerobní glykolýzy je (2.41):

$$gluk \acute{o}za + 2 ATP + 2 Pi (nebo glykogen + 1 ATP + 1 Pi)$$
  

$$\Rightarrow 2 Lakt \acute{a}t + 4 ATP + 2 H_2 O + 2 H^+$$
(2.41)

Ze sumárního vzorce lze nahlédnout na hlavní nevýhody anaerobní glykolýzy. První nevýhoda je její nehospodárnost (zisk pouze 2 molekul ATP z jedné glukózy). Druhá nevýhoda spočívá v jejich konečných produktech (laktát, protony), které způsobují únavu svalu. Nehospodárnost anaerobní glykolýzy je zmenšena Coriho cyklem, který v játrech z laktátu resyntetizovává glukózu.

#### 2.6.2 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus je sekvence 8 enzymatických reakcí probíhajících v mitochondriích [32]. Hlavním cílem citrátového cyklu je přeměna energie uložené v acetyl-CoA do formy redukovaných koenzymů. Tyto koenzymy se pak použijí v oxidativní fosforylaci k vytvoření protonového gradientu na vnitřní membráně mitochondrií. Další funkce citrátového cyklu spočívají v jeho meziproduktech, jež jsou biosyntetické prekurzory řady důležitých látek (aminokyseliny (AMK), porfyriny...). Citrátový cyklus odpovídá za oxidaci nejen většiny cukrů, ale i mastných kyselin i AMK. V jeho průběhu z jedné molekuly acetyl-CoA vzniknou 3 molekuly NADH, 1 molekula FADH<sub>2</sub>, 1 molekula GTP a 2 molekuly CO<sub>2</sub>.

Acetyl-CoA vzniká v mitochondrii z pyruvátu za současného uvolnění 1 molekuly CO<sub>2</sub> a NADH několikastupňovou reakcí katalyzovanou pyruvátdehydrogenasou.

V citrátovém cyklu se nejprve z acetyl-CoA a oxalacetátu syntetizuje citrát. Citrát přechází přes isocitrát na oxalsukcinát za redukce NAD<sup>+</sup> na NADH. Z oxalsukcinátu vzniká 2-oxoglutarát za uvolnění CO<sub>2</sub>. Další reakce obnáší vznik sukcinyl-CoA z oxoglutarát za dalšího uvolnění CO<sub>2</sub> a NADH. Ze sukcinyl-CoA dále vzniká sukcinát (+ vznik 1 GTP), ze sukcinátu fumarát (+ redukce FAD na FADH<sub>2</sub>) a z fumarátu L-malát. V poslední reakci citrátového cyklu se obnovuje oxalacetát z fumarátu (+ redukce NAD<sup>+</sup> na NADH).

#### 2.6.3 Oxidativní fosforylace

Oxidativní fosforylace je souhrnný název pro procesy probíhající na vnitřní membráně mitochondrií. Na vnitřní membráně mitochondrií jsou přítomny 4 komplexy, které využívají energii uchovanou ve formě redukovaných koenzymů (NADH a FADH<sub>2</sub>) k budování protonového gradientu. Protonový gradient pak pohání H<sup>+</sup> ATPázu, která syntetizuje ATP.

První komplex NADH dehydrogenáza redukuje NADH na NAD<sup>+</sup>, přitom přesouvá protony do mezimembránového prostoru a elektrony na koenzym Q. Druhý komplex je sukcinát dehydrogenáza katalyzující oxidaci FADH<sub>2</sub> koenzymem Q (přesun elektronů z FADH na koenzym Q). Třetí komplex ubichinol-cyt c reduktasa katalyzuje oxidaci redukovaného koenzymu Q cytochromem *C* a přesouvá další protony do mezimembránového prostoru. Cytochrom *C* je periferní membránový protein, který přenáší elektrony od komplexu III na komplex IV. Komplex IV (cytochrom *c* oxidasa) odebírá elektrony cytochromu *C* a redukuje jimi molekulární kyslík za vzniku vody. Přitom jsou opět přesouvány protony do mezimembránového prostoru. Při oxidativní fosforylaci se získají z redukce NADH 3 molekuly ATP (2.42):

$$3 ADP + 3 Pi + NADH + \frac{1}{2} O_2 \cong NADH^+ + 3 ATP + H_2 O$$
 (2.42)

Na redukci FADH<sub>2</sub> připadá zisk pouze 2 molekul ATP. Celkově je v citrátovém cyklu z jedné molekuly glukózy získáno 10 molekul NADH, 2 molekuly FADH<sub>2</sub> a 2 molekuly GTP. To odpovídá zisku dalších 36 molekul ATP v oxidativní fosforylaci vůči anaerobní glykolýze.

Energie může být získávána nejen z glukózy, ale i z tuků pomocí  $\beta$  oxidace.

#### 2.6.4 β Oxidace

 $\beta$  oxidace představuje proces, ve kterém jsou v mitochondrii metabolizovány mastné kyseliny na acetyl-CoA. Před  $\beta$  oxidací je mastná kyselina nejprve v cytosolu aktivována navázáním na koenzym A. Reakce probíhá přes meziprodukt acyladenylát a je při ní spotřebováno ATP za vzniku AMP. Avšak acyl-CoA s dlouhým řetězcem není schopen projít přes mitochondriální membránu, proto dochází k přenosu acylu na karnitin. Acylkarnitin má speciální přenašečový protein (karnitintranslokáza), který mu umožní projít membránou mitochondrie.

V mitochondrii dochází k opětovnému přenosu acylu na koenzym A. Dále je acyl-CoA zpracováván v mitochondrii již zmíněnou  $\beta$  oxidací. Jeden cyklus  $\beta$  oxidace obnáší sled čtyř reakcí, při kterém je mastná kyselina zkrácena o dva uhlíky

za současného vzniku acetyl-CoA. Sled těchto čtyř reakcí se opakuje, dokud se celá mastná kyselina neodbourá na jednotlivé acetyl-CoA.

#### 2.6.5 Zapojení jednotlivých metabolických mechanizmů při zátěži

Zapojení jednotlivých mechanizmů obnovy ATP řídí několik faktorů. Hlavními faktory jsou délka probíhající zátěže a velikost zátěže vůči maximálně možnému výkonu dané osoby.

Jestliže se soustředíme na časovou závislost metabolických pochodů, tak v prvních sekundách zátěže se začne rozpadat ATP. Tento pokles začne ihned vyrovnávat PCr. Po několika desítkách sekund začne úbytek ATP dorovnávat anaerobní glykolýza. Aerobní fosforylace se rozbíhá několik minut podle toho, jak roste průtok krve svalem a jeho zásobení kyslíkem. Lipolýza začne tvořit významný zdroj ATP až po několika desítkách minut. Po zátěži by měla probíhat pouze aerobní fosforylace, která dorovnává počátečný pokles PCr (tzv. kyslíkový dluh), přesto anaerobní glykolýza může pár sekund po skončení námahy přispívat k tvorbě ATP.

Druhým důležitým faktorem je zmíněná celková velikost svalové zátěže [26]. Pro ni existují dvě významné meze. První mez je přibližně zátěž 60% maximálně možného výkonu (tzv. anaerobní práh), do ní je sval schopen pokrývat svůj metabolismus takřka výhradně oxidativní fosforylací. Do hodnoty této zátěže také dochází po počátečních změnách PCr, Pi a pH k jejich stabilizaci a sval je schopen vykonávat zátěž po dlouhou dobu. Po překročení 60% maximální možné zátěže se začne podílet na výrobě ATP i anaerobní glykolýza. Druhou významnou mezí je zátěž 100% maximálně možného výkonu, kdy po jejím překročení dochází k selhání svalových kontrakcí.

Přesné načasování a podíl jednotlivých mechanizmů výroby ATP pak záleží na individuálních vlastnostech každého jedince – trénovanost, aktuální kondice, fenotyp a zdravotní stav, poměr rychlých a pomalých svalových vláken, množství mitochondriálních enzymů.

Zapojení jednotlivých mechanizmů lze odhadnout ze změny pH ve svalu. Na začátku námahy pH mírně vzrůstá z důvodu rozpadu PCr až k hodnotám kolem 7,10. Poté pH klesá z důvodu přísunu  $H^+$  z anaerobní glykolýzy a po dostatečné aktivaci oxidativní fosforylace zůstává na konstantní hodnotě za podmínky maximálně 60 % maximální zátěže. Po skončení zátěže se pH vrací na klidové hodnoty (okolo 7,03). Navíc pufrovací kapacita jednotlivých buněk a stav mikrovaskulárního oběhu moduluje vývoj hodnoty pH.

#### 2.7 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM - lidově tzv. cukrovka) je chronická metabolická porucha charakterizována vysokou glykemií, která je způsobena nedostatkem nebo neúčinností hormonu inzulinu. Dvě nejčastější formy diabetu jsou tzv. diabetes prvního typu (DM1) a diabetes mellitus druhého typu (DM2). DM2 tvoří 85 % až 95 % případů z celkového počtu pacientů, přičemž vyšší zastoupení mají vyspělejší země. DM2 se stává pomalu pandemickou chorobou, kterou na světě trpí přibližně čtvrt miliardy lidí [33] a v České republice kolem 800 tisíc pacientů (v roce 2011 - 758 tisíc DM2 a 56 tisíc s DM1 [34]). Navíc se dá předpokládat, že výskyt nemoci se bude dále zvyšovat v důsledku nezdravého životního stylu (málo pohybu, nevhodná skladba a nadměrný přísun potravin) a prodlužováním lidského života (ve stáří vyšší výskyt diabetu).

Pacienti s DM1 trpí úplným nedostatkem inzulinu v důsledku zhoršené funkce a ztráty  $\beta$  buněk v Langerhansových ostrůvcích ve slinivce břišní, které ho produkují.  $\beta$  buňky jsou poškozovány autoimunitně vzniklým zánětem slinivky břišní inzulitidy. Léčba pacientů s DM1 spočívá v substitučním podávání inzulinu a transplantaci slinivky. V některých případech se provádí transplantace Langerhansových ostrůvků do jater. Neléčený DM1 končí hyperglykemickým komatem a smrtí.

V případě pacientů s DM2 je situace komplikovanější. Základem je snížená citlivost zejména periferních tkání (hlavně svalů a jater) na účinek inzulinu a především nižší schopnost  $\beta$  buněk v Langerhansových ostrůvcích produkovat inzulin [35]. U pacientů s DM2 snížená citlivost periferních tkání souvisí s nadváhou. Pro vysvětlení snížené produkce inzulinu existuje několik teorií, které počítají s vyčerpáním  $\beta$  buněk, s glukózovou toxicitou, postižením proinzulinové syntézy, lipotoxicitou, glykolipotoxicitou, postižením inkretinového efektu nebo mitochondriálním defektem [36].

Biochemickým důsledkem diabetu je zvýšené uvolňování glukózy z jater (při diabetu se objevuje i zvýšená sekrece glukagonu a není tlumena glykogeneze v játrech), její hromadění v krvi a naopak její nedostatek uvnitř buněk, pro které je glukóza hlavní zdrojem energie. Z těchto důsledků pak vyplývají akutní

38

a chronické komplikace diabetu. Akutními komplikacemi jsou hypo- nebo hyperglykemické koma, jenž je následkem vysoké, nebo nízké glykemie.

Chronické komplikace DM pocházejí z vyšší glykémie, kdy se glykolyzují proteiny a jiné látky v krvi a receptory na buňkách. To vede např. k ateroskleróze, ischemické chorobě dolní končetiny, retinopatii, diabetické nefropatii nebo vysokému tlaku krve. Vysoká glykemie také způsobuje vysokou osmolaritu krve, přítomnost radikálů, hromadění sorbitolu a nižší podíl myoinozitolu [37].

Poslední dva zmiňované činitelé spolu se snížením aktivity Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dependentní ATPázy a ischémií poškozují nervové buňky. Poškození nervstva se může projevit řadou i život ohrožujících obtíží.

Kombinací kardiovaskulárních a neuropatických problémů vzniká i syndrom tzv. diabetické nohy, vředovité onemocnění dolní končetiny, které může končit i její amputací.

Nedostatek glukózy v buňkách se projevuje na zvýšeném metabolismu tuků a proteinů. V případě spotřeby proteinů pak buňky tráví samy sebe. Navíc se tlumí opačný proces - proteosyntéza. Při katabolismu tuků je zase zahlcen citrátový cyklus acetyl-CoA a vznikají přebytečné ketolátky.

Nedostatek glukózy v buňkách také tlumí aktivitu centra sytosti a zvyšuje syntézu glukózy v játrech z glykogenu a z aminokyselin (tyto dva efekty ještě zhoršují glykemii). V neposlední řadě nedostatek inzulinu také způsobuje zvýšený podíl volných mastných kyselin v krvi, které vedou k ateroskleróze.

#### 2.7.1 Inzulin

Inzulin je anabolický hormon, který ovlivňuje řadu fyziologických pochodů. Vzniká v  $\beta$  buňkách v Langerhansových ostrůvcích. Z chemického hlediska se jedná o dva krátké peptidy (21 AMK řetězec *A* a 30 AMK řetězec *B*) spojené disulfidickými můstky mezi cysteiny. Samotná molekula inzulinu se syntetizuje na ribozomu ve formě tzv. preproinzulinu, ten pak putuje do endoplazmatického retikula, kde probíhá jeho sbalení a tvorba disulfidických můstků. Z preproinzulinu vznikne proinzulin. Proinzulin se následně přesouvá do Golgiho aparátu, kde je

zabalen do grana. V granech proběhne odštěpení spojovacího proteinu *C* mezi řetězci *A* a *B* a vznik inzulinu. Grana se nakonec spojí s buněčnou membránou buňky a inzulin je uvolněn do kapilárního řečiště [35].

Uvolňování gran je řízeno hladinou glukózy v krvi pomocí následujícího mechanismu. Při vysoké glykemii vstupuje do  $\beta$  buněk glukóza přes GLUT 3 transportér (není řízen hladinou inzulinu v krvi), mitochondrie začnou v $\beta$  buňkách tuto glukózu zpracovávat. Vytvoří se velké množství ATP, které uzavře ATP citlivé draselné kanály. Následný pokles odtoku  $K^+$  z buňky depolarizuje membránu buňky, což způsobí otevření napěťově senzitivního  $Ca^{2+}$  kanálu. V buňce vzroste hladina  $Ca^{2+}$ , která aktivuje  $Ca^{2+}$  dependentní proteinkinasu, která spouští exocytózu gran.

Vztah inzulinu a glukózy u buněk je zprostředkován receptory IRS 1 až 4 a růstovým receptorem IGF 1. Tyto receptory zahajují složitou kaskádu signálních drah [38] jejímž výsledkem je i aktivace GLUT 4 transportérů.

GLUT 4 transportér je transportér glukózy. Patří do širší skupiny GLUT transportérů, které usnadněnou difúzí umožňují vstup cukrů do buněk. GLUT 4 se nalézá v buňkách tukové a svalové tkáně, v níž je ve dvou stavech, aktivním a pasivním. Při pasivním stavu nepřenáší inzulin, jelikož se nalézá na membráně speciálních váčků uložených volně v cytoplazmě buňky. Inzulin reguluje navíc i syntézu glykogenu, vychytávání AMK a jejich proteosyntézu, glukogenezu, syntézu lipidů a ketogenezu, propustnost membrán pro ionty draslíku, hořčíku a fosfátu a další procesy probíhající v buňkách [35] v závislosti na typu tkáně, z které pocházejí.

### 2.7.2 Svalová tkáň a porucha mitochondrií

S tématem diplomové práce souvisí hlavně ovlivňování metabolizmu svalové tkáně diabetem. Špatně regulovaná hladina glukózy u obou dvou typů diabetu způsobuje degradaci cévní a nervové soustavy, což se projevuje na zásobení a funkci svalů. Dále je ve svalových buňkách u pacientů s DM2 porušena signální dráha inzulinu, která mimo transportu glukózy do buňky ovlivňuje řadu dalších procesů. Dále bylo zjištěno, že svalové buňky pacientů s DM2 vykazují útlum β oxidace hromaděním intracelulárního tuku, atrofii, celkově sníženou mitochondriální funkci

[39,40]. Tyto patologie se poté projevují u pacientů s DM2 na větším zastoupení rychlých svalových vláken [41].

Přesný mechanizmus snížené citlivosti buněk na inzulin u DM2 není znám. Za jeho původce se považují zejména genetické a environmentální faktory, stárnutí, obezita a nedostatek pohybu [42]. Z mikroskopického hlediska pravděpodobně způsobuje necitlivost inzulinu vyšší obsah volných mastných kyselin (FFA) v krvi a intracelulární tuk. Oba faktory by mohly negativně ovlivňovat signální dráhu inzulinu a aktivaci GLUT 4 transportérů. FFA mohou být u pacienta zvýšené v důsledku nadměrného přísunu potravy, stresu nebo lipodystrofie.

Hromadění intracelulárního tuku může být způsobeno několika vlivy. Uvažuje se metabolizovat mastné kyseliny v důsledku o poruše schopnosti defektu mitochondriálních funkcí. Mitochondriální funkce může být změněna v důsledku genetických faktorů, stárnutí, vysoké koncentrace FFA, oxidativního stresu, sedavého způsobu života, přítomností intracelulárního tuku, kdy se tvoří lipidové peroxidy, které oxidativně poškozují mitochondrie, nebo i jako adaptace na přílišné dávky glukózy a tuků z potravy jako ochrana proti zahlcení mitochondriemi NADH a FADH<sub>2</sub> [43,44]. Mitochondriální defekt může nastávat u  $\beta$  oxidace nebo v citrátovém cyklu případně v oxidativní fosforylaci, ať už důsledkem snížení celkového počtu mitochondrií, jejich morfologickými změnami, nebo sníženým celkovým počtem mitochondriálních enzymů. Takto by se staly mitochondrie hlavními viníky snížené citlivosti na inzulin. Mitochondriální porucha je zajímavá i z pohledu, že se samotné mitochondrie podílejí na uvolňování inzulinu z  $\beta$  buněk. Tak by jejich porucha vysvětlovala i sníženou produkci inzulinu u pacientů s DM2. Intracelulární tuk se hromadí i v důsledku příliš kalorické stravy. Z popisu problému vyplývá, že určení prvotní příčiny problémů není snadné, pravděpodobně se vytvářejí komplikované zpětnovazebné smyčky.

Provádění studie u pacientů s DM1 má sloužit k posouzení vlivu společných patologických prvků onemocnění DM1 na kvalitu energetického metabolismu ve svalu, a tím zjistit, zda změny v metabolismu svalu u pacientů s DM2 nejsou pouhým důsledkem špatně regulované hladiny glykemie.

#### 2.8 Určované veličiny

Z fosforových spekter lze určit řadu zajímavých parametrů. Ze statických fosforových spekter se určují poměry mezi jednotlivými signály. Z předpokládané koncentrace ATP ve svalu lze určit i absolutní koncentrace sledovaných metabolitů. Našimi technickými prostředky jsou věrohodně dosažitelné poměry PCr/ATP Pi/ATP a PDE/ATP. Dále je možno z chemického posunu mezi Pi a PCr vypočítat pH.

Vztah pro tento výpočet vychází z předpokladu, že ve svalových buňkách nastává rovnováha mezi dvěma rozdílně disociovanými formami kyseliny fosforečné:

$$HPO_4^{2-} + H^+ \leftrightarrows H_2 PO_4^-$$
 (2.43)

Jelikož dochází k rychlé chemické výměně, při které si obě dvě látky vyměňují proton, ani jedna z nich se ve spektru nebude projevovat samostatným signálem, ale pouze jedním celkovým signálem, jehož frekvence bude odpovídat váženému průměru Larmorových frekvencí obou dvou forem s váhami, které jsou úměrné jejich koncentracím ve svalových buňkách [19]:

$$\delta(P_i) = \frac{\delta(HPO_4^{2-})[HPO_4^{2-}] + \delta(H_2PO_4^{-})[H_2PO_4^{-}]}{[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^{-}]} .$$
(2.44)

Chemické posuny  $\delta(HPO_4^{2-})$  a  $\delta(H_2PO_4^{-})$  jsou známé veličiny, hranaté závorky vyjadřují koncentrace. Také je známa rovnovážná konstanta rovnice (2.43), která je dána rovnovážnými koncentracemi příslušných forem kyseliny fosforečné:

$$K_{rovn} = \frac{[H^+][HPO_4^{2^-}]}{[H_2PO_4^{-}]} .$$
 (2.45)

Spojením těchto dvou uvedených vztahů (2.44), (2.45) se obdrží vztah pro výslednou koncentraci protonů:

$$[H^+] = K_{rovn} \frac{\delta(H_2 P O_4^-) - \delta(P_i)}{\delta(P_i) - \delta(H P O_4^{2^-})} \quad .$$
(2.46)

Posledním důležitým vzorcem je dobře známý vztah mezi pH a koncentrací protonů:

$$pH = -\log c_H \ . \tag{2.47}$$

Jeho aplikací na vzorec (2.47) se dostává přímý vztah pro výpočet pH z posunů Pi a PCr:

$$pH = pK_{rovn} + \log \frac{\delta(H_2 P O_4^-) - \delta(P_i)}{\delta(P_i) - \delta(H P O_4^{2^-})} \quad .$$
(2.48)

Po dosazení jednotlivých konstant má uvedený vzorec (2.48) tvar [45]:

$$pH = 6,75 + log\left(\frac{\delta - 3,27}{5,63 - \delta}\right)$$
, (2.49)

kde  $\delta$  je chemický posun v ppm mezi Pi a PCr. Uvedený vztah je pouze jistou aproximací skutečného pH, protože v buňce se vyskytují další formy kyseliny fosforečné, které se ve výpočtu neuvažovaly.

Při zátěži se nebude významně měnit pouze pH, ale i koncentrace Pi, PCr, ADP, AMP. Tyto veličiny (vyjma pH) vykazují na počátku a po skončení cvičení exponenciální pokles nebo vzrůst. Pokud se však během cvičení překročí určitá mez námahy, mohou mít další složky poklesu (PCr má další lineární pokles – mluví se o dvou komponentách PCr [18]).

Na základě koncentrace ATP, PCr a protonů lze vypočítat koncentraci ADP, která je svou koncentrací pod měřitelným limitem [45]:

$$ADP = \left(\frac{[celk. \ kreatin]}{[PCr]} - 1\right) \cdot \frac{[ATP]}{K[H+]} . \tag{2.50}$$

Celkové množství kreatinu je vypočteno na základě předpokladu, že v klidu je 85% celkového množství kreatinu ve formě fosfokreatinu [46]. Rovnovážná konstanta kreatinkinázové reakce je K=1,66 $\cdot$ 10<sup>9</sup>M<sup>-1</sup> [45]. Koncentraci protonů lze určit z hodnoty pH vyjádřením ze vztahu (2.47).

Návrat na klidové koncentrace fosfokreatinu probíhá přes exponenciální závislost [47]:

$$[PCr](t) = [PCr]_{klid} + \Delta[Pcr]\left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{PCr}}}\right).$$
(2.51)

Pro určení celkové mitochondriální kapacity je třeba vypočítat počáteční rychlost syntézy ATP, respektive resyntézy PCr. Počáteční rychlost resyntézy fosfokreatinu odpovídá směrnici rovnice (2.51) v čase t = 0 (čas, kdy osoba přestane cvičit). Tu lze obdržet derivováním této rovnice (2.51) a dosažení času t = 0. Tímto postupem se získá vztah pro počáteční rychlost resyntézy  $V_{PCr}$ :

$$V_{PCr} = \frac{d \, [Pcr](t=0)}{dt} = \frac{\Delta [Pcr]}{\tau_{PCR \, recovery}} \quad , \tag{2.52}$$

kde  $\tau_{PCR}$  (relaxační konstanta PCr) získáme proložením naměřených hodnot signálu PCr rovnicí (2.51).

Směrnice rovnice) se může určit i z proložení prvních bodů klidové fáze po cvičení, tzv. "recovery" přímkou nebo z numerického derivování změřených dat. V několika prvních sekundách po skončení intenzivní zátěže může přispívat i anaerobní glykolýza, její odečítání je však problematické, a proto při méně usilovných cvičení se často zanedbává. Při vyšších intenzitách cvičení navíc může návrat PCr na klidové hodnoty vykazovat biexponenciální závislost [48]. Tato složitější závislost je pravděpodobně důsledkem složení svalu z různých typů svalových vláken ( $\tau_{PCR}$  závislá na hodnotě pH a jistě i na počtu mitochondrií v jednotlivých vláknech). Návrat na klidové koncentrace Pi probíhá také přes exponenciální závislost:

$$[Pi](t) = [Pi]_{klid} + \Delta[Pi]e^{-\frac{t}{\tau_{Pi}}} .$$
 (2.53)

kde  $\tau_{Pi}$  má význam relaxační konstanty (času) Pi. U zdravých jedinců lze i pozorovat to, že hodnoty PCr, Pi na konci "recovery" relaxují přes své klidové hodnoty.

Maximální mitochondriální kapacita (O<sub>max</sub>) se určí po vypočtení počáteční rychlosti resyntézy fosfokreatinu podle vzorce (2.54), kde  $K_m = \frac{30 \mu mol}{litr}$  [47] (vztah odvozen na základě Michaelis–Mentenové kinetiky).

$$O_{max} = V_{PCr} \left( 1 + \frac{\kappa_m}{ADP_{end}} \right)$$
(2.54)

Dále je možno ještě určit výpočtem koncentraci AMP (2.55) z adenylátcyklázové reakce (2.56) a Gibbsovu volnou energii  $\Delta G_{ATP}$  ATP (2.57) [30]. Z vývoje signálu PCr, Pi během cvičení lze dopočítat glykolytický tok, jehož určení je však náročné z důvodu potřeby přesného určení pH za cvičení a celkové <sup>1</sup>H pufrovací kapacity svalu [49]. Poněvadž nás zajímala především mitochondriální kapacita, glykolytickým tokem jsme se dále nezaobírali.

$$ADP + ADP \stackrel{K_{AK}}{\longleftrightarrow} ATP + AMP$$
 (2.55)

$$[AMP] = K_{AK} \frac{[ADP]^2}{[ATP]}$$
(2.56)

$$\Delta G_{ATP} = \Delta G_{ATP}^{0} + RT ln \left\{ \frac{[ADP][Pi]}{[ATP]} \right\}$$
(2.57)

# 3 Experimentální část

### 3.1 Dobrovolníci a pacienti

Všichni účastníci studie, jak dobrovolníci, tak i pacienti, byli informováni o cílech studie a podepsali informovaný souhlas s vyšetřením. Účastníci studie dostávali po vyšetření k vyplnění formulář, ve kterém byli dotazováni k průběhu a náročnosti vyšetření (příloha č. 4). Velká část otázek se také vztahovala k jejich způsobu života, aby se mohla posoudit jejich fyzická zdatnost. Formulář a z něho zpracované údaje jsou obsaženy v příloze.

Celkem bylo vyšetřeno 32 dobrovolníků a 21 pacientů. Pacienti s DM1 byli získáni ve spolupráci s Centrem diabetologie IKEM. Ne všechny měřené osoby prošly jednotným protokolem, zvláště na začátku měření fosforové spektroskopie v kombinaci s cvičením byli zdraví dobrovolníci využiti hlavně k nastavení optimálního protokolu měření. Všichni vyšetřovaní pacienti byli chodící, na první pohled v dobré kondici a trpěli DM1 (pouze u jednoho pacienta byla diagnostikována též nefropatie a retinopatie). Většina z nich byla spíše mladšího věku a postavou astenického typu. Výběr pacientů byl zvolen tak, aby pro ně vyšetření nepředstavovalo nadměrnou fyzickou nebo psychickou zátěž. Pro věrohodnost měření bylo také důležité, aby pacienti nebo dobrovolníci netrpěli dalšími onemocněními, která by ovlivňovala výsledek měření.

# 3.2 Experimentální vybavení

#### 3.2.1 Tomograf magnetické rezonance

Veškerá měření probíhala na MR tomografu Magnetom TRIO od firmy SIEMENS. Základním parametrem každého tomografu magnetické rezonance je velikost jeho statického magnetického pole. V tomto případě jsou to 3 Tesla. Obecně platí, že čím vyšší magnetické pole je k dispozici, tím budou mít měřená spektra a MR obrazy lepší rozlišení. Velikost magnetického pole ovlivňuje i  $T_1$  a  $T_2$  relaxační doby.

Z našeho experimentálního pohledu jsou důležitými parametry i velikost stolu a otvoru tomografu, jelikož měříme spektra v kombinaci s cvičením, které vyžaduje určitý prostor pro umístění ergometru (viz Obr. 14).



Obr. 14 Tomograf Magnetom TRIO s ergometrem.

### 3.2.2 Cívka pro měření <sup>31</sup>P spekter

Pro fosforová měření se používá duální povrchová cívka od firmy RAPID, která obsahuje dva magnetické obvody. Jeden obvod je určen pro měření <sup>1</sup>H (naladěn na frekvenci 123,1 MHz), druhý pro měření <sup>31</sup>P (naladěn na frekvenci 49,9 MHz). Obvod pro měření <sup>1</sup>H má tvar tzv. butterfly o rozměrech 240 mm x 180 mm. Obvod pro měření <sup>1</sup>P tvoří kruhový závit o průměru 110 mm. Schéma obvodu je vyobrazeno na Obr. 15. Magnetický obvod pro měření <sup>1</sup>H slouží hlavně k aplikaci sekvencí určených pro zobrazení.



Obr. 15 Fosforová cívka a její magnetický obvod.

# 3.2.3 Ergometr

Během <sup>31</sup>P MRS vyšetření se používá ergometr ke cvičení. Ergometr je určen pro vykonávání flexe kotníku tak, aby docházelo k zatížení lýtkového svalu. Ergometr je odnímatelný, ke stolu MR se upevňuje šesti hliníkovými šrouby. Ergometry byly sestaveny dva, jeden na levou, druhý na pravou nohu. Pro všechna měření v této práci byl použit ergometr určený pro pravou nohu. Většina částí ergometru je vyrobena z plastu, aby byl ergometr kompatibilní s magnetickým polem. Mnou vyrobené plány jsou součástí přílohy č. 1, jeho fotografie je na Obr. 16.



Obr. 16 Fotografie používaného ergometru.

Hlavními částmi ergometru je deska, kterou se upevňuje ergometr ke stolu, a šlapadlo.

Šlapadlo se skládá ze šlapky a z převodního kola, které jsou připevněné k hřídeli, kolem které se souběžně otáčejí. Šlapka je v současné verzi ergometru uchycena

k hřídeli ve své polovině, což není optimální řešení, protože má pak svou osu otáčení mimo rovinu kotníku. Změna pozice uchycení šlapky byla navržena jako úprava pro ergometr určený pro levou nohu.

K nastavení velikosti zátěže a k měření vykonané práce slouží konstrukce umístěná za tomografem. Tuto konstrukci tvoří závěs se závažím, potenciometr a převodní systém. K převodnímu kolu ergometru je upevněno lanko, které se po umístění pacienta do tomografu spojí pomocí přezky s druhým lankem, na kterém drží závěs se závažími. Pohyb lanka je přes převodní hřídel převáděn na pohyb lanka potenciometru. Stojan se závěsem je vyfotografován na Obr. 17 a na Obr. 18 je celkové zjednodušené schéma celého uspořádání.



Obr. 17 Fotografie stojanu na závaží s potenciometrem.



Obr. 18 Zjednodušené schéma experimentu.

Elektrický signál z potenciometru se převádí na optické pulzy, které jsou optickým kabelem vedeny ven z místnosti do počítače, kde se ukládá průběh cvičení (viz Obr. 19). Tímto způsobem provedené monitorované cvičení má však některé nedostatky, na jejichž odstranění se pracuje (viz kapitola 5.3).

Záznam z jednoho cvičení spolu s vyznačenými vadami je zobrazen na Obr. 19.



Obr. 19 Záznam cvičení 5,5 minuty. Výška křivek odpovídá výšce zdvihu závaží.

### 3.3 Použitý software

#### 3.3.1 Program na zpracování signálu z potenciometru

V potenciometru se měření změny polohy závaží převádí na určitou hodnotu elektrického napětí, která se zaznamenává programem WinATS (internetové stránky výrobce: http://sysma.fr/winats\_en.html). V programu lze uložit změřená data v txt formátu. Frekvence vzorkování je 50 Hz. Změřená data mají strukturu pravidelně se opakujícího signálu měnícího se napětí, jehož výška odpovídá zdvihu závaží. Pro výpočet celkové práce je nutné sečíst celkovou dráhu, jež závaží vykonala, přičemž je nutné se vypořádat se zmíněnými artefakty měření uvedenými v kapitole 3.2.3.

K oscilaci signálu dochází po prudkém spuštění závaží. Lanka mají sklon se protáčet spíše při vyšlápnutí, což se projevuje na občasném mírném poklesu základní čáry.

V rámci DP jsem vytvořil dva programy na výpočet zmíněné práce. První program nejprve spočítá celkový nárůst napětí bez uvážení všech možných efektů, poté přikročí k pokročilejšímu výpočtu. Pokročilejší určení práce je založeno na procházení dat pomocí průběžného okna, které sleduje nárůst napětí. Jestliže dojde k velkému nárůstu napětí, podívá se program na hodnotu napětí před začátek okna a pokračuje dál v procházení dat, přičemž si ukládá nejvyšší hodnotu, kterou prošel od nárůstu napětí. Průběžné okno také sleduje poklesy napětí, což je důležité k uložení a vynulování nejvyšší hodnoty v rámci jednoho zdvihu závaží. Přesnost programu záleží na nastavení mezí pro začátek a konec odečtu signálu tak, aby všechny signály byly správně sečteny bez příspěvků oscilací. S posunem základní čáry se tento skript vyrovnává sledováním hodnoty před nárůstem.

Druhý program byl vytvořen k ověření výsledků a správnosti nastavení mezí u prvního programu, nakonec byly oba programy integrovány do jednoho. Výhodou i nevýhodou druhého programu je, že vyžaduje vstupní posouzení změřených dat uživatelem. V tomto programu je záznam z potenciometru vynesen do grafu, přičemž se musí nastavit dvě přímky *a* a *b*. Přímka *a* definuje základní úroveň, od které se počítá výška signálu, a přímka *b* určuje spouštěcí mez, od které program změřená data hodnotí jako zdvih závaží. Přímky mohou mít různou směrnici, která se nastavuje udáním *y*-ové hodnoty přímky na počátku a na konci měření. Možnost nastavovat různý sklon spouštěcí meze (přímka *a*) slouží jako opatření proti chybě vzniklé v důsledku protáčení kola vůči lanku vedenému od ergometru k závaží.

Nastavování sklonu horní meze (přímka *b*) je implementováno kvůli klesajícímu rozsahu šlapání některých vyšetřovaných osob.

Zdrojový kód programu je součástí přílohy č. 2. Grafický výstup programu s přímkami *a* a *b* je na Obr. 20.



Obr. 20 Grafický výstup programu pro zpracování signálu zdvihání závaží (x osa: čas 0-98s, y napětí  $\approx$  zdvih závaží, červené křivky jsou přímky *a*, *b*).

### 3.3.2 jMRUI - program na zpracování spekter

jMRUI je speciální program na zpracování i modelování MR spekter. Umožňuje zpracovávat spektra jak fosforová, tak i protonová. Jeho výhodou je, že dokáže načíst všechna spektra z jednoho měření a na nich provést společně vybrané operace. To je velice výhodné, protože z ergometrického měření je výstupem sada 420 fosforových spekter (dle standardního protokolu) a provádění jednotlivých vyhodnocovacích operací na každém jednotlivém spektru zvlášť by bylo časově neúnosné. Aby však program načítal MR fosforová spektra správně podle časového sledu, jak byla měřena, bylo nutné naprogramovat kratší skript, který správně obdržené soubory seřadí (zdrojový kód skriptu tvoří přílohu č. 3). V jMRUI jsou se spektry v závislosti na jejich kvalitě provedeny potřebné operace (viz kap. 2.2.2) a je aplikován modul AMARES. Obvykle stačilo všechna spektra pouze stranově převrátit a postupně prohlédnout. Kontrolní prohlížení jednotlivých spekter se provádí z důvodu, aby se zjistilo, v jaké kvalitě jsou spektra změřena, zda nějaký signál nemá nápadně jinou velikost, nebo jestli ve spektru není přítomen artefakt. Také je důležité pro další vyhodnocení sledovat signál anorganického fosfátu, jelikož u některých pacientů bylo zaznamenáno jeho štěpení během cvičení. Modul AMARES pro každé jednotlivé spektrum provede optimální fázovou korekci a vypočítá integrály jednotlivých signálů.

Konečný výstup z AMARESu (Obr. 21) je dostupný pro každé změřené spektrum. Ukazuje se v něm jak originální spektrum a fitem nalezené komponenty signálů, tak i reziduální zbytek spektra po odečtení všech sledovaných signálů.

Výstup z celého modulu AMARES (Obr. 21) lze uložit do jednoho textového souboru. V textovém souboru se nacházejí informace získané z každého spektra. Jedná se o rezonanční frekvenci, integrální intenzitu, fázi a  $T_2^*$  jednotlivých metabolitů s uvedenými chybami. Také je zde v případě fosforových sloučenin uvedeno pH. Data jsou poté z textového souboru přenášena do tabulkového editoru a do programu MicroCal Origin (internetové stránky výrobce: http://www.originlab.com), kde probíhá jejich další zpracování.



Obr. 21 Výstup modulu AMARES.

#### 3.4 Průběh vyšetření

Vyšetření je prováděno na MR tomografu Magnetom Trio 3T. Pacient k vyšetření nepotřebuje žádnou zvláštní přípravu a vyšetření je bezbolestné a bezpečné. Vyšetření mohou podstoupit však pouze pacienti, kteří nemají v těle kardiostimulátor nebo jiné MR nekompatibilní implantáty.

Před vyšetřením je k MR tomografu připojena duální povrchová cívka a připevněn ergometr. Před ergometr poté pokládáme dvě menší podušky a molitan ve tvaru dutého válce. Podušky slouží k zvednutí nohy vůči ergometru a molitan má za úkol udávat konstantní tvar cívce mezi různými měřeními. Cívka je přikládána bezprostředně pod lýtkový sval. Vyšetřovaní lidé leží volně na zádech, nohama směrem k magnetu. Chodidlo se upevňuje do šlapadla několika suchými zipy (viz Obr. 14).

Měřená osoba je před zasunutím do tomografu instruována několika pokyny. Zejména se jedná o instrukce ke schématu cvičení, použití záchranného balónku a obecných zásad při měření (cvičit v co největším rozsahu, při náběru signálu mít nohu v klidu a ve stejné poloze). Při zasunování subjektu do tomografu se zaměřuje poloha středu cívky pomocí laserového paprsku. Po zasunutí subjektu do tomografu se musí za tomografem propojit lanko od ergometru s lankem od závaží, nastavit velikost zátěže a vyzkoušet několik kontrolních šlápnutí.

Vyšetření začíná zobrazením svalu sekvencí "localizer" a "localizer transverzal" (viz Tab. 1) pro ověření polohy cívky vůči svalům lýtka. Na Obr. 22 je zobrazen MR transverzální řez lýtkových svalů pomocí povrchové cívky, která se nachází bezprostředně pod svalem m. gastrocnemius (součást trojhlavého lýtkového svalu), což je jeden z hlavních svalů podílejících se na plantární extenzi. Taktéž lze na obrázku pozorovat ubývání intenzity signálu se vzdáleností od cívky.



Obr. 22 <sup>1</sup>H MR obraz lýtkových svalů. 53

Před samotným provedením spektroskopické části vyšetření je třeba nastavit potřebnou homogenitu magnetického pole (tzv. "shimming"). Pokud se toto neprovede, obdržená spektra nemají dostatečnou kvalitu, jednotlivé spektrální křivky sloučenin jsou příliš široké a metabolity s nižší koncentrací jsou ztraceny v šumu. Nastavení homogenity spektrální čáry je možné provést automaticky, ale v tomto případě často není dostačující a je nutné provést dostavení manuálně. Manuální nastavení je však časově náročné. Tato situace je nevýhodná s ohledem na existenci určité horní časové hranice pro vyšetření s ohledem na etický, technický (pacient se může pohnout a spektrum bude deformované) i praktický (časový úsek pro vyšetření je omezen) aspekt vyšetření. V tomto konkrétním případě se pohybuje délka vyšetření kolem 40 minut. Včetně uložení a přípravy celého vyšetření se nepřekračuje doba 50 minut.

V příslušném zobrazovacím okně se nejprve nastavuje excitační frekvence <sup>1</sup>H, excitační frekvence <sup>31</sup>P (na fosfokreatin), kontroluje se přijímací trasa signálu, provádí se automatické nastavení homogenity magnetického pole, poté se přechází na ruční "shim". Nastavení homogenity pole se provádí soustavou korekčních cívek, kterými se mění profil magnetického pole. Obvykle se provádí nastavení homogenity pro celý vyšetřovaný objem, při němž se dostáváme k hodnotám pološířky signálu vody pod 40-45 Hz.

Po nastavení homogenity přichází na řadu první spektroskopická sekvence. Jedná se o FID sekvenci, která má dlouhý TR čas (15 s), aby jednotlivé signály byly co nejméně ovlivněny  $T_1$  relaxací, respektive rozdílnou saturací magnetizace. Další parametry této sekvence jsou uvedeny v Tab. 2 – název sekvence FID1.

Další a nejdůležitější sekvence vyšetřovacího protokolu je sekvence pro náběr signálu FID při zátěži. Tato sekvence má tyto parametry: TR = 2 s, 1 akvizice, 420 měření (nejčastěji prováděný protokol, další parametry sekvence jsou shrnuty v Tab. 2 – název sekvence FID2). Celkově sekvence trvá 14 minut, první dvě minuty (60 spekter) jsou pacienti/dobrovolníci v klidu, poté zahájí na náš pokyn cvičení s frekvencí 2 sešlápnutí mezi MR pulzy. Zvuky, které vydává tomograf (zvuk podobný ťukání), jsou využity k udání frekvence šlapání. Po uplynutí 6 minut cvičení (180 spekter) subjekty dostávají pokyn k ukončení šlapání a měří se dalších 6 minut signál při odpočinku, tzv. recovery (180 spekter). Bohužel v průběhu této

měřicí sekvence není dostupné průběžné vyhodnocení integrálních velikostí jednotlivých signálů.

Současně s aktivací této druhé (a poslední) měřicí sekvence se zapíná nahrávání cvičení v programu WinATS, po skončení cvičení se nahrávání ukončí a záznam se uloží.

Před vysunutím pacienta z tomografu se musí nejdříve rozpojit lanka za tomografem, aby nedošlo k poškození ergometru. Subjekt je po vyšetření požádán o vyplnění informačního dotazníku vztahujícího se k jeho zdravotnímu stavu a k náročnosti prodělaného vyšetření (viz příloha č. 4).

Název sekvence	localiser	localiser transverzal
TR (ms)	20	20
sklápěcí úhel (°)	30	30
rozměr vrstvy (mm)	300	200
tloušťka vrstvy (mm)	10	6
počet vrstev	3+3+3	15

Tab. 1 Parametry použitých zobrazovacích sekvencí pro zobrazení svalu.

Tab. 2 Parametry použitých spektroskopických sekvencí při vyšetřování subjektů.

název sekvence	FID1	FID2	FID + decoupling
TR (s)	15	2	4
počet akvizic	16	1	2
počet měření	1	420	240
doba nabírání signálů (ms)	512	512	512
počet bodů	1024	1024	1024
sklápěcí úhel (°)	90	42	90
šířka pásma excitačních pulzů (kHz)	2	2	2
celková doba sekvence (minuty)	4	14	32

# 4 Výsledky

# 4.1 Klidová <sup>31</sup>P spektra

Pro měření klidových spekter byl zvolen náběr dat ze sekvence "FID", viz Tab. 2. Celkově bylo vyšetřeno 21 zdravých dobrovolníků (9 žen a 12 mužů) s průměrným věkem 37±13 let, indexem tělesné hmotnosti (BMI) 25±3. Klidová fosforová spektra byla změřena také u 19 nemocných s DM1 (14 mužů a 5 žen) s průměrným věkem 34±11 let a BMI 25±5. Jeden dobrovolník a dva pacienti byli kuřáci. Vyjma jednoho případu měla všechna klidová fosforová spektra dobrou kvalitu a byla věrohodně zpracovatelná a nebyl v nich pozorován žádný artefakt. Obdržené hodnoty jednotlivých veličin jsou uvedeny v Tab. 3 a Tab. 4.

Pro porovnání poměrů integrálních intenzit jednotlivých metabolitů mezi pacienty s DM1 a zdravými dobrovolníky byl použit t-test [50] s hladinou významnosti 5 % (výsledek testů ukazuje Tab. 5). Z testu vyplynula signifikantní diference pouze u poměru integrálních intenzit signálů PCr/βATP.

V Tab. 6 jsou vyneseny klidové poměry integrálních intenzit jednotlivých metabolitů u skupiny zdravých mužů a u skupiny zdravých žen.

dabravalník*		pon	signál	pН		
GOOLO VOIIIIK	PCr/βATP	Pi/BATP	PDE/βATP	PCr/Pi	βΑΤΡ	
1	4,29	0,50	0,21	8,5	1200	7,08
2	5,40	0,52	0,35	10,3	820	6,99
3	4,95	0,61	0,49	8,1	1060	7,04
4	5,42	0,57	0,94	9,5	870	6,98
5	5,17	0,51	0,44	10,1	780	7,03
6	5,68	0,71	0,64	8,0	710	6,99
7	5,35	0,86	0,72	6,2	800	neurčeno
8	5,43	0,63	0,66	8,6	650	7,00
9	5,04	0,49	0,25	10,4	1150	7,02
10	4,71	0,29	0,30	16,1	1340	7,07
11	5,21	0,83	0,63	6,3	780	7,06
12	4,39	0,62	0,59	7,1	960	6,99
13	5,47	0,66	0,64	8,3	1050	7,00
14	4,40	0,49	0,20	9,0	1270	7,10
15	4,70	0,82	0,41	5,7	860	7,03
16	4,31	0,55	0,52	7,9	1060	7,01
17	4,46	1,13	0,38	3,9	1110	7,01
18	4,59	0,60	0,48	7,6	1140	7,02
19	5,55	0,65	0,24	8,5	700	7,01
20	5,27	0,65	0,40	8,2	1020	7,00
21	5,23	0,58	0,67	9,1	990	7,04
průměr ± sm. odchylka	5,00±0,46	0,63±0,17	0,48±0,19	8,4±2,4	960±200	7,02±0,03
δ [%]	9	27	40	29	21	$\sim$

Tab. 3 Klidové poměry integrálních intenzit jednotlivých metabolitů u zdravých dobrovolníků.

\* tučně značeny ženy

pagiont*	poměry				signál	pН
puelent	PCr/βATP	Pi/βATP	PDE/βATP	PCr/Pi	βΑΤΡ	
1	4,02	1,52	0,55	2,6	560	7,04
2	4,43	0,56	0,19	7,9	1160	7,04
3	4,91	0,62	0,37	7,9	1200	7,04
4	4,45	0,68	0,59	6,5	1320	7,05
5	4,49	0,52	0,42	8,6	1220	7,04
6	4,26	0,43	0,46	10,0	1580	7,04
7	4,42	0,49	0,27	8,9	1210	7,05
8	4,23	0,61	0,47	7,0	1260	7,03
9	3,71	0,76	0,35	4,9	1400	7,03
10	4,27	0,59	0,31	7,2	990	7,04
11	3,92	0,53	0,40	7,3	940	7,06
12	4,67	0,60	0,68	7,8	1100	7,03
13	5,44	0,43	0,32	12,8	940	7,02
14	5,62	0,70	0,70	8,0	830	7,02
15	3,78	0,59	0,33	6,4	1050	7,01
16	4,91	0,47	0,70	10,4	1050	6,97
17	5,16	1,19	1,06	4,4	630	7,06
18	4,43	0,55	0,23	8,1	630	7,05
19	4,24	0,61	0,28	6,9	1050	7,04
průměr ± sm.odchvlka	4,49±0,52	0,63±0,27	0,44±0,27	7,3±2,2	1060±270	7,03±0,02
δ [%]	12	43	48	30	24	

Tab. 4 Klidové poměry integrálních intenzit jednotlivých metabolitů u pacientů s DM1.

\* tučně značeny ženy

	PCr/βATP	Pi/βATP	PDE/βATP	PCr/Pi
dobrovolníci	5,00±0,46	0,63±0,17	0,48±0,19	8,4±2,4
pacienti	4,49±0,52	0,63±0,27	0,44±0,27	7,3±2,2
t	3,3	0,3	0,4	1,2
Р	0,002	0,74	0,67	0,23
signifikantní rozdíl	ANO	NE	NE	NE

Tab. 5 Srovnání poměrů integrálních intenzit metabolitů mezi pacienty s DM1 a zdravými dobrovolníky pomocí t-testu.

Tab. 6 Průměrné poměry integrálních intenzit metabolitů u zdravých mužů a žen a a jejich srovnání t-testem.

	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP	PCr/Pi	Signál BATP	pН
					prin	
ženy	$5,25\pm0,26$	0,65±0,15	0,51±0,24	8,4±1,9	840±150	7,016±0,024
muži	4,81±0,49	0,61±0,20	0,46±0,16	8,5±2,6	1030±440	7,029±0,034
t	2,7	0,3	1,0	0,02	1,4	1,1
Р	0,01	0,71	0,29	0,98	0,17	0,27

# 4.2 Fosforová spektroskopie při zátěži

Zátěž a frekvence šlapání byla u ověřovacích měření několikrát navyšována, přičemž se ukazovalo efektivnější zvyšování frekvence šlapání, poněvadž v případě zvyšování zátěže měřené osoby následně omezovaly rozsah sešlápnutí šlapky. U většiny měření byla nakonec použita zátěž 7,3 kg.

#### 4.2.1 Výběr standardního protokolu-porovnání dvou protokolů

Pro porovnání vlivu intenzity cvičení a nastavení schématu měření byly vyzkoušeny dva rozdílné měřicí protokoly.

#### Protokol č. 1

Protokol č. 1 se skládal z dvouminutové klidové fáze, z 6-minutového cvičení (s intenzitou šlapání 2 krát za 2 sekundy, viz Obr. č. 23) a 6 minut odpočinku, tzv. "recovery". Pro měření spekter byl použit protokol FID1 s TR = 2 s, 1 akvizice (viz Tab. 2). Frekvence šlapání u tohoto protokolu měření v podstatě odpovídala kontinuálnímu šlapání. Kvalita spekter byla vyhovující, vyjma několika spekter při cvičení, kdy měřené osoby sešlápnutím zasáhly dobu akvizice (před zahájením měření byly vyšetřované osoby instruovány, aby nohu při akvizici držely v klidu, avšak řada z nich nebyla schopna dodržovat frekvenci a velikost šlapání).



Obr. č. 23 Znázornění schématu cvičení 1. protokolu.

#### Protokol č. 2

Protokol č. 2 se skládal z dvouminutové klidové fáze, desetiminutového cvičení (s intenzitou šlapání 3 krát za 4 sekundy). Po ukončení šlapání subjekty 20 minut odpočívaly. Pro měření spekter byla použita sekvence FID s decouplingem s TR = 4 s, 2 akvizice (viz Tab. 2). Frekvence šlapání u tohoto protokolu měření dovolovala krátký odpočinek po 3. šlápnutí. Kvalita spekter obdržená

z protokolu byla poměrně dobrá, což bylo důsledkem jednak navýšením počtů akvizic na dvě, ale také i delším repetičním časem, který snížil saturaci magnetizace jednotlivých sloučenin ve svalu během sekvence. V případě, že oba protokoly byly měřeny u jedné osoby během jednoho vyšetření, následoval protokol č. 2 několik minut po protokolu č. 1.



Obr. č. 24 Znázornění schématu cvičení 2. protokolu.

#### Změřené závislosti během cvičení

Nejdůležitější závislost, kterou během měření lze získat, je vývoj intenzity signálu PCr na čase, respektive na cvičení. U všech subjektů měla tato závislost typický průběh shodující se s publikovanými výsledky [45,46,47], tzn. na začátku fyzické zátěže docházelo k exponenciálnímu poklesu signálu PCr. Tento pokles se během 2 až 3 minut zastavil a hladina PCr se do konce fyzické zátěže držela na přibližně stejné úrovni s možným kladným nebo záporným přírůstkem. Záporný přírůstek lze vysvětlit větší spotřebou ATP při cvičení, než byla schopnost produkce ATP z oxidativní fosforylace a anaerobní glykolýzy. Avšak při srovnání grafu vývoje signálu PCr s grafem konané práce plyne, že tyto přírůstky jsou spíše důsledkem toho, že subjekty mají sklon během cvičení měnit velikost sešlápnutí (část z nich ke konci už nezvládá udržet stejnou intenzitu cvičení jako na začátku, nebo někteří z nich naopak na začátku cvičí s menší intenzitou cvičení v obavě, že výkon nezvládnou, a ke konci vyšetření přidávají na intenzitě sešlápnutí - viz Obr. 25).



Obr. 25 Ukázka citlivosti intenzity signálu PCr na intenzitě cvičení. Modré přímky v horním grafu odpovídají průměrné výšce zdvihu závaží ve vymezeném čase.

V klidové fázi dochází k exponenciálnímu návratu intenzity signálu PCr na hodnoty, které byly měřeny před cvičením (dle rovnice (2.51), viz Obr. 26).



Obr. 26 Vývoj signálu PCr při cvičení.

Vývoj signálu anorganického fosfátu byl komplementární k vývoji signálu PCr (viz Obr. 27). Na počátku cvičení docházelo k jeho exponenciálnímu nárůstu. Tento nárůst dosahoval až několika set procent, protože klidová koncentrace fosfátu je poměrně nízká. Podobně jako u PCr po 2 až 3 minutách dosáhl tento nárůst vrcholu a hodnota signálu Pi se již držela do konce cvičení přibližně na konstantní úrovni, i když s možnými variacemi tvaru píku anorganického fosfátu (štěpení, rozšíření). Po cvičení docházelo k exponenciálnímu návratu signálu Pi na hodnoty, které byly změřeny před cvičením.


Obr. 27 Graf vývoje signálu jednotlivých metabolitů při zátěži.

Signál ATP (viz obr. 28) ani dalších minoritních metabolitů se během všech měření příliš neměnil. Vývoj pH dále komentuji v podkapitole v 4.2.



obr. 28 Graf vývoje signálu β ATP při zátěži.

#### Výsledky srovnání protokolu č. 1 a 2

Protokol č. 1 a č. 2 byl porovnáván u 13 osob (věk 36±14 let, BMI 25,6±4,0; 7 zdravých osob a 5 pacientů s DM1). Jednotlivé hodnoty dosažené z obou protokolů jsou uvedeny v Tab. 7 a Tab. 8, průměrné hodnoty jsou pak pro přehlednost shrnuty v Tab. 9).

Pro porovnání  $V_{PCr}$  a  $O_{max}$  obdržených v rámci těchto dvou protokolů byl proveden párový t-test s hladinu významnosti 5% (výsledek testů zaznamenán v Tab. 10). Z testu vyplynula signifikantní diference pouze u  $V_{PCr}$ , avšak ne u  $O_{max}$ . Tento výsledek je poměrně příznivý s ohledem na to, že z něho vyplývá, že  $O_{max}$  lze brát jako výsledný nezávislý parametr vůči schématu cvičení nebo nastavené zátěže. Ačkoliv mezi mitochondriálními kapacitami obdrženými z obou protokolů není signifikantní rozdíl, je protokol č. 1 výhodnější z hlediska zpracování, protože dosahuje vyšších poklesů a je u něj i 4x vyšší časové rozlišení (viz Obr. 29). Dobré časové rozlišení je zvláště důležité na počátku části "recovery", kdy dochází k rychlým změnám v koncentraci PCr, které se musí správně vyhodnotit.

dabravalníli/	relaxační konstanta τ [s] pokles PCr a vzrůst Pi						1	
nacient	p. č. 1	p. č. 2	p. č. 1	p. č. 2	p. č. 1	p. č. 2	p. č. 1	p. č. 2
pueteni	$\tau_{PCr}[s]$	$\tau_{PCr}[s]$	$\tau_{\rm Pi}[s]$	$\tau_{\rm Pi}[s]$	PCr [%]	PCr [%]	Pi [%]	Pi [%]
1	43	35	54	40	25	18	130	70
2	38	161	54	79	22	8	160	20
3	70	58	49	51	15	13	90	100
4	33	62	34	28	19	11	140	130
5	33	33	56	34	37	19	350	140
6	30	37	32	23	40	30	270	210
7	33	90	35	190	16	12	290	140
8	51	48	42	42	52	33	230	80
9	16	39	58	44	6	8	40	90
10	68	38	77	60	47	31	370	140
11	30	120	33	126	13	7	110	60
12	52	66	72	54	43	22	170	90
13	97	45	122	78	29	6	10	30
průměr ± sm.odchylka	46±22	64±38	55±25	65±46	28±14	17±9	180±110	100±50

Tab. 7 Relaxační konstanty PCr, Pi a relativní změny PCr a Pi v porovnání obou protokolů.

debrovelník/	p	rotokol č.1		protokol č.2			
nacient	V <sub>PCr</sub>	O <sub>max</sub>	P [W]	V <sub>PCr</sub>	O <sub>max</sub>	P [W]	
pucieni	(mmol/s)	(mmol/s)		(mmol/s)	(mmol/s)		
1	0,21	0,38	2,8	0,20	0,45	2,5	
2	0,27	0,49	1,5	0,03	0,07	0,7	
3	0,09	0,22	1,2	0,23	0,38	1,9	
4	0,18	0,40	1,2	0,09	0,23	2,4	
5	0,35	0,59	2,0	0,12	0,28	0,7	
6	0,60	0,91	2,5	0,40	0,74	2,1	
7	0,20	0,45	2,5	0,14	0,26	2,1	
8	0,44	0,61	2,4	0,29	0,48	2,3	
9	0,10	0,32	0,8	0,20	0,55	0,8	
10	0,29	0,43	3,1	0,20	0,55	2,5	
11	0,16	0,40	2,1	0,05	0,14	1,6	
12	0,28	0,45	3,6	0,13	0,27	3,3	
13	0,10	0,19	1,2	0,06	0,17	0,9	
průměr ± sm. odchylka	0,25±0,15	0,45±0,19	2,0±0,8	0,16±0,10	0,35±0,19	1,9±0,8	
δ [%]	60	42	40	63	54	42	

Tab. 8  $V_{PCr},\,O_{max}$  a průměrný výkon v porovnání obou protokolů.

pozn. uvedené číslování je shodné s Tab. 7

	protokol č. 1	protokol č. 2
průměrný % pokles signálu PCr o	(28±14) %	(17±9) %
průměrný % vzrůst Pi o	(180±110) %	(180±110) %
průměrná relaxační konstanta $\tau_{PCr}$ [s]	46±22	64±38
průměrný dosažený výkon [W]	2,0±0,8	1,9±0,8
mitochondriální kapacita [mM/s]	0,45±0,19	0,35±0,19
V <sub>PCr</sub> [mM/s]	0,25±0,15	0,16±0,10

Tab. 9 Porovnání protokolu č. 1 a č. 2 – průměrné hodnoty

Tab. 10 Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu u protokolu č. 1 a 2

	V <sub>PCr</sub>	O <sub>max</sub>
protokol č. 1	0,25±0,15 mmol/s	0,45±0,19 mmol/s
protokol č. 2	0,16±0,10 mmol/s	0,35±0,19 mmol/s
t	2,72	1,81
Р	0,02	0,10
signifikantní rozdíl	ANO	NE



Obr. 29 Porovnání vývoje signálu PCr a Pi z protokolu č. 1 a č. 2.

## 4.3 Porovnání zdravých osob a pacientů s DM1

Celkově bylo protokolem č. 1 úspěšně vyšetřeno 20 z 21 zdravých dobrovolníků a 18 z 19 pacientů s DM1, u kterých byla změřena klidová <sup>31</sup>P MR spektra (pacient č. 5 a dobrovolník č. 6 byli vyloučeni z technických důvodů).

Obdržené výsledky jsou uvedeny v Tab. 11 a Tab. 12, průměrné hodnoty jsou pak pro přehlednost shrnuty v Tab. 13).

Pro porovnání V<sub>PCr</sub> a O<sub>max</sub> mezi pacienty a dobrovolníky byl proveden t-test s testovanou hladinu významnosti testu 5 % (výsledek testů zaznamenán v Tab. 14). Z t-testu vyplynula signifikantní diference jak u O<sub>max</sub> tak i u V<sub>PCr</sub> (na úrovni 99%) – pacienti dosahovali nižších (horších) hodnot.

dobrovolník	$\tau_{PCr}[s]$	$\tau_{pi}[s]$	PCr [%]	Pi [%]	pacient	$\tau_{PCr}[s]$	$\tau_{pi}[s]$	PCr [%]	Pi [%]
1	35	37	26	170	1	81	45	36	110
2	28	37	26	170	2	16	58	6	40
3	70	49	15	90	3	68	77	47	370
4	33	34	19	140	4	30	33	13	110
5	33	56	37	350	5*	-	-	-	-
6*	-	-	-	-	6	62	26	45	290
7	60	47	63	230	7	52	72	43	170
8	30	32	40	270	8	126	104	75	500
9	53	50	36	200	9	43	27	5	70
10	33	35	16	290	10	44	62	52	320
11	51	42	52	230	11	97	122	29	10
12	54	54	37	310	12	97	69	53	230
13	97	108	53	390	13	50	50	45	510
14	30	41	30	200	14	72	71	65	390
15	39	52	54	300	15	80	67	70	410
16	31	27	26	420	16	22	20	15	180
17	66	101	40	130	17	57	56	23	80
18	90	60	81	680	18	36	48	16	160
19	44	39	44	360	19	36	24	37	260
20	22	24	14	90					
21	39	47	36	290					
průměr ± sm.odchylka	47±21	49±21	37±17	270±140	průměr ± sm.odch.	59±29	57±27	38±22	230±160

Tab. 11 Relaxační konstanty PCr, Pi a relativní změny PCr a Pi u zdravých dobrovolníků a pacientů s DM1.

\* experimentální neúspěch, tučně značeny osoby ženského pohlaví

dobrovolník	V <sub>PCr</sub> (mmol/s)	O <sub>max</sub> (mmol/s)	P [W]	pacient	V <sub>PCr</sub> (mmol/s)	O <sub>max</sub> (mmol/s)	P [W]
1	0,37	0,70	3,7	1	0,15	0,24	2,9
2	0,27	0,49	1,4	2	0,10	0,32	0,8
3	0,09	0,22	1,2	3	0,29	0,43	3,0
4	0,18	0,40	1,2	4	0,16	0,40	2,1
5	0,35	0,59	2,0	5*	-	-	_
6*	-	-	-	6	0,25	0,36	2,9
7	0,46	0,61	3,4	7	0,28	0,45	3,6
8	0,60	0,91	2,5	8	0,21	0,25	3,8
9	0,20	0,36	2,1	9	0,02	0,06	1,9
10	0,20	0,45	2,6	10	0,38	0,61	_*
11	0,44	0,61	2,3	11	0,10	0,19	1,2
12	0,26	0,46	2,3	12	0,21	0,30	3,0
13	0,25	0,35	3,0	13	0,30	0,50	1,9
14	0,32	0,62	1,3	14	0,43	0,58	2,1
15	0,54	0,80	3,6	15	0,27	0,49	2,1
16	0,24	0,48	2,4	16	0,27	0,65	2,5
17	0,28	0,48	1,9	17	0,15	0,31	2,5
18	0,34	0,40	2,8	18	0,15	0,52	_*
19	0,40	0,70	2,2	19	0,36	0,65	2,0
20	0,29	0,72	0,9				
21	0,41	0,70	3,6				
průměr ± sm.odchvlka	0,32±0,13	0,55±0,27	2,3±0,9	průměr ± sm.odch.	0,23±0,11	0,41±0,17	2,4±0,8
δ [%]	41	31	39	δ [%]	48	41	33

Tab. 12  $V_{PCr}$  a  $O_{max}$  a průměrný výkon u zdravých dobrovolníků a pacientů s DM1.

\* experimentální neúspěch, tučně značeny osoby ženského pohlaví

	zdravý dobrovolníci	Pacienti s DM1
průměrný % pokles signálu PCr o	(37±17) %	(38±22) %
průměrný % vzrůst Pi o	(270±140) %	(230±160) %
průměrná relaxační konstanta $\tau_{PCr}$ [s]	47±21	59±29
průměrný dosažený výkon [W]	2,3±0,9	2,4±0,8
mitochondriální kapacita [mM/s]	0,55±0,17	0,41±0,17
V <sub>PCr</sub> [mM/s]	0,32±0,13	0,23±11

|--|

Tab. 14 Dvouvýběrový t-test na střední hodnotu u zdravých dobrovolníků a pacientů s DM1.

	V <sub>PCr</sub>	O <sub>max</sub>
dobrovolníci	0,32±13 mmol/s	0,55±27 mmol/s
pacienti	0,23±11 mmol/s	0,41±17 mmol/s
t	2,56	2,67
Р	0,015	0,011
signifikantní rozdíl	ANO	ANO

# 4.4 Opakovatelnost a reprodukovatelnost klidových <sup>31</sup>P MR spekter

Sledování opakovatelnost měření je proces, při kterém se hodnotí rozdíly mezi výsledky z měření, která byla provedena krátce po sobě s totožnými parametry bez změny polohy subjektů mezi měřeními. Rozdíly mohou plynout hlavně z fyziologických příčin (neúmyslný pohyb, metabolická změna) nebo z přítomnosti šumu v signálu.

Celkem byla provedena opakovatelnost klidových spekter u 6 subjektů. Měření bylo provedeno třikrát po sobě sekvencí "FID1" (viz Tab. 2). Integrální hodnoty signálů PCr, Pi a ATP a pH jsou vyneseny v Tab. 15. Výsledné průměrné relativní odchylky jsou uvedeny v Tab. 16. Průměrná standardní chyba pH byla 0,006.

Reprodukovatelnost klidových spekter má za úkol posoudit změny, které nastávají u nezávislých měření a souvisí s kompletní přípravou měření. Provedl jsem měření reprodukovatelností klidových spekter u dobrovolníků v rámci jedné návštěvy, kdy byli vysunuti z tomografu a kompletně znovu připraveni k vyšetření. Z tohoto postupu vyplývá, že v našem případě reprodukovatelnost měření zohledňuje tři vlivy. Prvním vlivem je různé nastavení homogenity magnetického pole. Druhým vlivem je umístění cívky vůči svalu. Třetím vlivem je možná změna tvaru cívky v důsledku jejího upevnění ke svalu.

Poměry integrálních signálů jednotlivých signálů jsou zaznamenány v Tab. 17. Výsledné směrodatné a relativní odchylky jsou uvedeny v Tab. 18. Vyšší hodnota poměrů signálu  $\gamma/\beta$ ATP a  $\alpha/\beta$ ATP než jedna je pravděpodobně důsledkem, toho že signál  $\gamma$ ATP a  $\alpha$ ATP se kryje se signálem dalších minoritních metabolitů [2].

dobrovolník X	γΑΤΡ	αΑΤΡ	βΑΤΡ	PCr	Pi	PDE	pН
1. měření	1770	1490	1180	5140	601	68	7,082
2. měření	1790	1530	1190	5120	600	67	7,08
3. měření	1800	1480	1210	5130	597	68	7,081
průměr	1790	1500	1190	5130	599	67	7,081
sm. odch.	10	30	10	10	2	1	0,001
dobrovolník Y	γATP	αATP	βΑΤΡ	PCr	Pi	PDE	pН
1. měření	1150	1206	1061	4580	510	158	7,003
2. měření	1130	1216	1069	4550	530	152	7,007
3. měření	1150	1214	1060	4560	540	149	7,011
průměr	1140	1212	1063	4560	530	153	7,007
sm. odch.	10	5	5	20	10	4	0,004
dobrovolník Z	γATP	αATP	βΑΤΡ	PCr	Pi	PDE	pН
1. měření	1670	1584	1347	6270	390	72	7,064
2. měření	1650	1589	1336	6300	390	73	7,068
3. měření	1660	1596	1340	6260	410	63	7,066
průměr	1660	1590	1341	6270	400	69	7,066
sm. odch.	10	6	6	20	10	6	0,002
dobrovolník V	γATP	αΑΤΡ	βΑΤΡ	PCr	Pi	PDE	pН
dobrovolník V 1. měření	γATP 1380	αATP 1170	βATP 960	PCr 4810	Pi 700	PDE 350	рН 6,992
dobrovolník V 1. měření 2. měření	γATP 1380 1230	αATP 1170 1130	βΑΤΡ 960 940	PCr 4810 5110	Pi 700 400	PDE 350 290	рН 6,992 7,007
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření	<ul><li>γATP</li><li>1380</li><li>1230</li><li>1210</li></ul>	αATP 1170 1130 1140	βATP 960 940 940	PCr 4810 5110 5130	Pi 700 400 400	PDE 350 290 280	pH 6,992 7,007 7,017
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr	<ul><li>γATP</li><li>1380</li><li>1230</li><li>1210</li><li>1270</li></ul>	αATP 1170 1130 1140 1150	βATP 960 940 940 950	PCr 4810 5110 5130 5010	Pi 700 400 400 500	PDE 350 290 280 310	pH 6,992 7,007 7,017 7,005
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch.	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> </ul>	αATP 1170 1130 1140 1150 20	βATP 960 940 940 950 10	PCr 4810 5110 5130 5010 180	Pi 700 400 400 500 100	PDE 350 290 280 310 40	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr	Pi 700 400 400 500 100 Pi	PDE 350 290 280 310 40 PDE	рН 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 рН
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120	Pi 700 400 400 500 100 Pi 650	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105           1104	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120	Pi 700 400 500 100 Pi 650 644	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024 7,028
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105           1104           1103	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5150	Pi 700 400 500 100 Pi 650 644 662	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024 7,028 7,03
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření 3. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105           1104           1103	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5150	Pi 700 400 500 100 Pi 650 644 662 652	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024 7,028 7,03 7,028
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření 5. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> <li>30</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>10</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105           1104           1104           1	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5150 5130 20	Pi 700 400 500 100 Pi 650 644 662 652 9	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210 20	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024 7,028 7,03 7,028 0,003
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření průměr Sm. odch. dobrovolník U	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> <li>30</li> <li>γATP</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>10</li> <li>αATP</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105           1104           1103           1104           1           βATP	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5150 5130 20 PCr	Pi 700 400 400 500 100 Pi 650 644 662 652 9 Pi	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210 20 PDE	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024 7,028 7,03 7,028 0,003 pH
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření 3. měření 4. měření 1. měření 1. měření 1. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> <li>30</li> <li>γATP</li> <li>1770</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>10</li> <li>αATP</li> <li>1490</li> </ul>	βATP           960           940           940           950           10           βATP           1105           1104           1103           1104           1           βATP           1150	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5150 5130 20 PCr 4580	Pi         700         400         400         500         100         Pi         650         644         662         9         Pi         673	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210 20 20 PDE 601	рН 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 рН 7,024 7,028 7,03 7,028 0,003 рН 7,029
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření průměr Sm. odch. dobrovolník U 1. měření 2. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> <li>30</li> <li>γATP</li> <li>1770</li> <li>1790</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>10</li> <li>αATP</li> <li>1490</li> <li>1530</li> </ul>	βATP96094094095010βATP11051104110311041βATP11501130	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5120 5150 5130 20 PCr 4580 4550	Pi         700         400         400         500         100         Pi         650         644         662         9         Pi         673         681	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210 20 PDE 601 600	рН 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 рН 7,024 7,028 7,03 7,028 0,003 рН 7,029 7,042
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření 5m. odch. dobrovolník U 1. měření 3. měření 3. měření 3. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> <li>30</li> <li>γATP</li> <li>1770</li> <li>1790</li> <li>1800</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>10</li> <li>αATP</li> <li>1490</li> <li>1530</li> <li>1480</li> </ul>	βATP96094094095010βATP11051104110311041βATP115011301150	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5150 5130 20 PCr 4580 4550 4560	Pi         700         400         400         500         100         Pi         650         644         662         9         Pi         673         681         688	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210 20 PDE 601 600 597	pH 6,992 7,007 7,017 7,005 0,013 pH 7,024 7,028 7,03 7,028 0,003 pH 7,029 7,042 7,049
dobrovolník V 1. měření 2. měření 3. měření průměr sm. odch. dobrovolník W 1. měření 2. měření 3. měření průměr Sm. odch. dobrovolník U 1. měření 2. měření 3. měření 3. měření 3. měření	<ul> <li>γATP</li> <li>1380</li> <li>1230</li> <li>1210</li> <li>1270</li> <li>90</li> <li>γATP</li> <li>1140</li> <li>1160</li> <li>1190</li> <li>1160</li> <li>30</li> <li>γATP</li> <li>1770</li> <li>1790</li> <li>1800</li> <li>1790</li> </ul>	<ul> <li>αATP</li> <li>1170</li> <li>1130</li> <li>1140</li> <li>1150</li> <li>20</li> <li>αATP</li> <li>1260</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>1270</li> <li>10</li> <li>αATP</li> <li>1490</li> <li>1530</li> <li>1480</li> <li>1500</li> </ul>	βATP96094094095010βATP11051104110311041βATP1150113011501140	PCr 4810 5110 5130 5010 180 PCr 5120 5120 5120 5120 5130 20 PCr 4580 4550 4560	Pi         700         400         400         500         100         Pi         650         644         662         652         9         Pi         673         681         688         681	PDE 350 290 280 310 40 PDE 220 210 190 210 20 PDE 601 600 597 599	pH6,9927,0077,0177,0050,013pH7,0247,0287,037,0280,003pH7,0297,0427,04

Tab. 15 Opakovatelnost klidových <sup>31</sup>P MR spekter.

Tab. 16 Průměrná opakovatelnost klidových <sup>31</sup>P MR spekter.

	γΑΤΡ	αΑΤΡ	βΑΤΡ	PCr	Pi	PDE
δ[%]	2	1	0,6	0,9	4	5

dobrovolník A	γ/βΑΤΡ	α/βΑΤΡ	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP
1. měření	1,09	1,16	4,50	0,64	0,29
2. měření	1,19	1,19	4,89	0,69	0,26
3. měření	1,16	1,20	4,70	0,82	0,35
průměr	1,15	1,18	4,7	0,7	0,30
sm. odch.	0,05	0,02	0,2	0,1	0,05
dobrovolník B	γ/βΑΤΡ	α/βΑΤΡ	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP
1. měření	1,07	1,14	4,39	0,52	0,27
2. měření	1,19	1,21	4,62	0,56	0,29
3. měření	1,21	1,19	4,40	0,49	0,16
průměr	1,16	1,18	4,5	0,52	0,24
sm. odch.	0,07	0,03	0,1	0,04	0,07
dobrovolník C	γ/βΑΤΡ	α/βΑΤΡ	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP
1. měření	1,11	1,16	4,71	0,58	0,15
2. měření	1,36	1,17	5,91	0,71	0,04
3. měření	1,28	1,31	5,47	0,66	0,07
průměr	1,2	1,21	5,4	0,65	0,09
sm. odch.	0,1	0,09	0,6	0,07	0,06
dobrovolník D	γ/βΑΤΡ	α/βΑΤΡ	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP
1. měření	1,02	1,13	4,54	0,58	0,35
2. měření	1,17	1,17	4,71	0,43	0,16
průměr	1,09	1,15	4,63	0,5	0,3
sm. odch.	0,11	0,03	0,12	0,1	0,1
dobrovolník E	γ/βΑΤΡ	α/βΑΤΡ	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP
1. měření	1,08	1,16	4,55	0,65	0,25
2. měření	1,17	1,21	4,79	0,51	0,25
3. měření	1,18	1,21	4,74	0,50	0,19
průměr	1,15	1,19	4,7	0,55	0,23
sm. odch.	0,05	0,03	0,1	0,09	0,03

Tab. 17 Reprodukovatelnost klidových <sup>31</sup>P MR spekter.

Tab. 18 Průměrná reprodukovatelnost klidových <sup>31</sup>P MR spekter.

	γ/βΑΤΡ	α/βΑΤΡ	PCr/βATP	Ρί/βΑΤΡ	PDE/βATP
δ [%]	7	3	5	1	2

#### 4.5 Reprodukovatelnost dynamického měření

Bylo provedeno také měření reprodukovatelnosti fosforové spektroskopie při zátěži u dvou zdravých osob (osoba č. 12: 65 let, BMI 26, sportovně spíše neaktivní osoba; osoba č. 1: 24 let, BMI 25, pravidelný rekreační sportovec) s časovým odstupem alespoň jeden týden od každého měření. Výsledná zaokrouhlená relativní odchylka mitochondriální kapacity byla obou dvou dobrovolníků 10 %. Jednotlivé dosažené hodnoty v rámci každého vyšetření jsou uvedeny v Tab. 19 a Tab. 20.

měření č.	$\tau_{PCr}[s]$	$\tau_{pi}[s]$	PCr [%]	Pi [%]	$V_{PCr}$	$O_{max}$	P [W]
					(1111101/8)	(1111101/8)	
1	43	35	12	140	0,20	0,44	_*
2	50	49	35	320	0,27	0,47	1,7
3	44	39	44	360	0,27	0,50	1,9
4	72	87	44	330	0,24	0,39	2,2
5	59	59	50	410	0,33	0,49	3,5
průměr ±	54±14	54±24	37±17	310±110	0,26±0,05	0,46±0,06	2,3±0,8
sm.odchylka							
δ [%]	26	44	46	35	19	13	35

Tab. 19 Mitochondriální kapacita u osoby č. 12.

\* technický neúspěch

měření č.	$\tau_{PCr}[s]$	τ <sub>pi</sub> [s]	PCr [%]	Pi [%]	V <sub>PCr</sub>	O <sub>max</sub>	P [W]
					(mmol/s)	(mmol/s)	
1	43	22	18	150	0,34	0,74	3,9
2	33	41	25	140	0,31	0,63	3,9
3	30	47	34	230	0,45	0,72	3,3
průměr ±	35±7	37±13	26±8	170±50	0,37±0,08	0,70±0,06	3,7±0,3
sm.odchylka							
δ [%]	20	35	31	29	22	9	8

Tab. 20 Mitochondriální kapacita u osoby č. 1.

## 5 Diskuze

#### 5.1 Výběr protokolu

Na počátku měření jsme stáli před volbou celkového schématu měření. Jelikož nemůžeme přesně regulovat vykonanou práci, není pro nás výhodné určovat pouze veličiny, které z velké části závisejí na vykonané práci - typicky závislými veličinami je pokles signálu PCr a vzrůst signálu Pi. Z tohoto důvodu je pro nás zajímavé určovat mitochondriální kapacitu svalu, kterou lze považovat za nezávislý parametr dobře vystihující oxidativní metabolismus svalu (viz kapitola 4.2.1 porovnání protokolů).

Zvolili jsme ve většině případů jednotnou zátěž 7,3 kg a v případě příliš malého rozsahu šlapání (zjištění sledováním dat z potenciometru) pacienty/dobrovolníky slovně motivovat. Mimo dvou případů jsme docílili dostatečně velkých poklesů signálu PCr, které bylo možné vyhodnotit. Většině dobrovolníků i pacientů se vyšetření nezdálo příliš namáhavé a po vyšetření nepociťovali žádnou nebo jenom malou únavu. Nejčastěji uváděným problémem při cvičení byla pouhá obava z křeče, která se ani v jednom případě nenaplnila. V jednom případě nemocný uváděl pocit pálení lýtkového svalu a v jednom bolest. V obou případech došlo u pacientů ke štěpení signálu anorganického fosfátu Pi, které ukazuje acidózu, a k velkým poklesům PCr. Předcházet těmto stavům zcela nelze, neboť v reálném čase nám naše zařízení neumožňuje měřit aktuální velikost poklesu PCr a narůst Pi.



Obr. 30 Znázornění poklesu signálu PCr a rozštěpení signálu Pi (extrémní změny a štěpení Pi). Vlevo klidové spektrum, vpravo spektrum po 3,5 minutách cvičení.

Nejčastěji se mitochondriální kapacita svalu určuje z rozboru jednoho středně dlouhého cvičení o stejné intenzitě po celou dobu trvání [51,52]. Jsou však i možné jiné varianty, kdy pacienti opakovaně krátkodobě cvičí a odpočívají [53]. Tyto varianty jsme nevolili, protože jsou méně časté a zvláště pro pacienta náročnější.

Další volba, kterou jsme museli učinit, byl výběr typu sekvence - zda měřit lokalizovaně, nebo z celého objemu svalu [54,55]. Lokalizovaná spektroskopie umožňuje hodnotit jednotlivé velikosti signálů z přesné skupiny svalů, které cvičí. Avšak má nevýhodu v nízké intenzitě celkového signálu, kterou je možné kompenzovat sčítáním jednotlivých akvizic. Sčítat jednotlivé akvizice u dynamických měření však není zcela správné. Navíc náš ergometr má poměrně nevhodně umístěnou osu otáčení šlapadla vůči ose kotníku, takže nelze příliš pevně fixovat nohu, tak aby byla zachována možnost šlapání. Z tohoto důvodu by nešlo vyloučit posunutí měřeného voxelu při cvičení, a proto byla lokalizace MR spekter provedena pouze umístěním a použitím povrchové cívky.

Intenzita, zátěž a délka cvičení byla volena tak, aby poklesy jednotlivých veličin byly dostatečné a byly docíleny stacionární hladiny metabolitů na konci cvičení. Délka cvičení by měla být dostatečně dlouhá, aby se plně rozeběhla oxidativní fosforylace. Naše cvičení trvalo 6, případně 10 minut, což je ve srovnání s obdobnými studiemi spíše delší doba trvání cvičení [51,52,56,57].

Velikost sešlápnutí šlapky je volný parametr, který jednak závisí na správném upevnění nohy k ergometru, ale hlavně na samotných vyšetřovaných osobách (pohyblivost kotníku a poté i ochota se unavit). Ideální intenzita cvičení je taková, kdy během cvičení dochází k poklesu PCr o 25 - 40 %. Při menších poklesech PCr, má vyhodnocení větší chybovost a při vyšších hodnotách dochází k acidóze, k rozvoji nepříjemné únavy a subjekty mají sklon zmenšovat intenzitu cvičení ke konci vyšetření. Navíc je i  $V_{PCr}$  závislé na pH, takže velká acidóza svalu by mohla zkreslit obdrženou hodnotu  $O_{max}$ . Intenzita cvičení je relativní veličina i vůči samotným svalovým proporcím jednotlivých dobrovolníků. V některých studiích se velikost zátěže určuje od maximální vyvinutelné síly [54,55,56,57,58] - obvykle se poté nastavuje zátěž o hodnotě 50 až 60 % maximální hodnoty (mez, kdy dochází při déletrvajícím cvičení k zapojení anaerobní glykolýzy).

Z hlediska nastíněných problémů a zkušeností z měření jsou v plánu technické úpravy ergometru, které by měly vylepšit jeho vlastnosti. První změnou je posunutí osy otáčení šlapky ergometru níže ke stolu. Tato změna by měla pomoci k pohodlnějšímu šlapání a umožnit lepší fixaci nohy, aby pacient cvičil pouze skupinou svalů, které bezprostředně sousedí s cívkou. Druhou změnou je umístění zarážek pro regulaci velikosti sešlápnutí šlapky.

#### 5.2 Signál anorganického fosfátu

Zajímavý problém představuje při vyšších intenzitách cvičení chování signálu anorganického fosfátu a následné určení pH svalu. Signál anorganického fosfátu se v případech intenzivnějšího cvičení rozšiřuje a někdy i štěpí. Rozšíření a štěpení jeho signálu je pravděpodobně důsledkem toho, že detekovaný signál anorganického fosfátu je součtem signálů z různých svalů nebo toho, že každý sval je složen z několika typů vláken, u kterých převažuje buď anaerobní, nebo oxidativní metabolismus. Určení pH z posunu takového signálu vystihuje pouze určitou střední hodnotu pH ve svalu. Navíc program jMRUI má s fitováním rozšířeného signálu problémy, které ještě komplikuje zhoršená kvalita spekter z důvodu pohybu při cvičení, proto byla při zjištění štěpení použita speciální báze doplněná o další signál. Z výčtu experimentálních problémů vyplývá, že ne vždy se podaří obdržet hladké závislosti pH.

Obecně u každého jedince pH na začátku cvičení vzroste v důsledku kreatinkinázové reakce (prvních 30 vteřin, typický průměrný vzrůst ze 7,03 na 7,10). Další vývoj pH závisí na intenzitě cvičení, při malých intenzitách cvičení se drží pH zvýšené, při střední intenzitě cvičení klesne přibližně na úroveň před cvičením a při vysokých intenzitách cvičení se u některých jedinců objeví štěpení signálu anorganického fosfátu, přičemž signál fosfátu, jež je v kyselejším prostředí, se dostává až k hodnotám pH 6,5. Celkově došlo k štěpení signálu anorganického fosfátu u 6 osob (4 pacienti s DM1, 2 zdraví dobrovolníci), přičemž signál fosfátu v kyselejším prostředí se v klidové fázi po cvičení zmenšoval pomaleji.

#### 5.3 Záznam práce

V průběhu řešení diplomového úkolu byly zjištěny dvě okolnosti, které mohou nepříznivě ovlivňovat měření vykonané práce, jejichž vliv pak byl pro dané zařízení částečně korigován/eliminován.

První vadou našeho technického řešení měření vykonané práce je odskok závaží a pružení celé aparatury po prudkém vyšlápnutí šlapky a následném rychlém spuštění závaží. Druhou vadou je prokluzování lanka vůči převodnímu systému ergometru. Tento defekt se špatně zahrnuje do celkového vyhodnocení práce. Do značné míry mu bylo zabráněno použitím těsnění na zdrsněném povrchu kladky, přesto v záznamu cvičení lze pozorovat posun úrovně základní čáry. Další neoptimální skutečností je pracné nastavování nejlepší délky lanka po zasunutí pacienta do tomografu a nezbytná kontrola vedení lanka přes převodní systém. Tato situace je nežádoucí hlavně z časového důvodu, jelikož dochází k prodlužování vyšetření.

K vyhodnocení práce ze záznamu zvedání závaží, byly vytvořeny dva popsané programy (viz kapitola 3.3.1).

Programy se u většiny měření shodují v určení práce do 1 %. K odlišným výsledkům dochází při velmi malém sešlápnutí. V těchto případech jsou v prvním programu limity pro vyhodnocení signálů nastaveny příliš velké. Naopak vyskytly se i případy, kdy měřené osoby cvičily ve velkém rozsahu a závaží pouštěly dolů tak rychle, že program vyhodnocoval oscilace signálu jako šlápnutí. V těchto zmíněných případech je hodnota práce vzata z druhého programu. Naopak první verze programu se ukázala jako užitečná v těch případech, kdy vyšetřovaní nespouštěli závaží úplně dolů, ale jen napůl (určitá forma ulehčení cvičení).

#### 5.4 Klinické závěry a porovnání s literaturou

Z analýzy změřených klidových <sup>31</sup>P MR spekter u pacientů s DM1 a zdravých dobrovolníků vyšel signifikantní rozdíl v poměru signálu PCr/ $\beta$ ATP. Pacienti měli tento poměr v průměru o 10 % snížený vůči zdravým dobrovolníkům. Je zajímavé, že signifikantní rozdíl vyšel pouze u tohoto poměru, protože klinicky se často využívá i poměr PCr/Pi, u kterého se uvádí, že jeho pokles souvisí s patologickými stavy ve svalu [59]. Proto jsem navíc provedl srovnání klidových poměrů u pacientů vůči jejich později zjištěné mitochondriální kapacitě (viz Tab. 21) Pearsonovým korelačním koeficientem (viz Obr. 31) a vyšší hodnoty korelace opravdu dosahoval poměr PCr/Pi než poměr PCr/ $\beta$ ATP (0,49 vs 0,44). To, že nevyšel t-test signifikantně u poměru PCr/Pi, je pravděpodobně zaviněno vyšším rozptylem hodnot u tohoto poměru.

Změřená průměrná hodnota klidového pH a její rozptyl byl u diabetiků jen nepatrně vyšší než u zdravých osob. Z toho vyplývá, že z hlediska acidobazické rovnováhy svalu byla skupina pacientů srovnatelná se skupinou zdravých dobrovolníků.

Jestliže porovnáme námi určené průměrné hodnoty poměrů jednotlivých signálů s hodnotami uváděnými v literatuře (viz Tab. 22), jsou naše hodnoty srovnatelné. Hodnoty uváděné v citovaných pracích se mohou od našich hodnot mírně lišit z důvodu použití jiných parametrů MR sekvence, metodikou vyhodnocení jednotlivých signálů v MR spektru apod.

Je zajímavé také porovnat klidové velikosti signálů a poměry jednotlivých metabolitů mezi skupinou mužů a žen. To je provedeno v Tab. 6.

Poněvadž intenzity signálů v MR spektru souvisejí s objemem svalové hmoty, jejich velikost byla větší u mužů (viz signál  $\beta$ ATP u mužů v Tab. 6). Vypovídající hodnotu mají spíše poměry integrálních intenzit jednotlivých metabolitů, avšak i poměr PCr/ $\beta$ ATP se liší mezi skupinou zdravých mužů a žen (t=2,7; P=0,013).

pacient č.	PCr/ATP	Pi/PCr	V <sub>PCr</sub> (mmol/s)	O <sub>max</sub> (mmol/s)	Ga <sub>TP</sub> [kJ/mol]	ADP [mmol/l]
1*	4,0	2,6	0,15	0,24	-58,9	0,021
2	4,4	7,9	0,10	0,32	-63,1	0,010
3	4,9	7,9	0,29	0,43	-62,3	0,011
4	4,4	6,5	0,16	0,40	-62,5	0,010
5	4,5	8,6	-	-	-	-
6	4,3	10,0	0,25	0,36	-63,2	0,012
7	4,4	8,9	0,28	0,45	-62,3	0,019
8	4,2	7,0	0,21	0,25	-62,8	0,010
9	3,7	4,9	0,02	0,06	-62,2	0,010
10	4,3	7,2	0,38	0,61	-64,2	0,012
11	3,9	7,3	0,10	0,19	-63,0	0,010
12	4,7	7,8	0,21	0,30	-62,9	0,010
13	5,4	12,8	0,30	0,50	-63,8	0,010
14	5,6	8,0	0,43	0,58	-62,7	0,009
15	3,8	6,4	0,27	0,49	-63,2	0,009
16	4,9	10,4	0,27	0,65	-63,8	0,009
17	5,2	4,4	0,15	0,31	-61,0	0,010
18	4,4	8,1	0,15	0,52	-63,3	0,009
19	4,2	6,9	0,36	0,65	-63,1	0,009
průměr ± sm odchylka	4,5±0,5	7,6±2,2	0,23±0,1	0,41±0,16	-62,7±1,1	0,011±0,003
δ [%]	11	29	43	39	2	27

Tab. 21 Hodnoty klidových poměrů signálu PCr/ATP, Pi/PCr, koncentrace ADP, G<sub>ATP</sub> a mitochondriální kapacity.

\* tučně značeno ženské pohlaví



Obr. 31 Korelace Omax na klidovém poměru signálu PCr/Pi.

zdravé	tibialis	Quadri-	tibialis	lýtkový	lýtkový	lýtkový	naše
osoby	anterior	ceps m.	anterior	sval	sval	sval	změřené
	<i>m</i> .[60]	[61]	<i>m</i> .[57]	[62]	[22]	[63]	hodnoty
PCr/Pi	9,1±0,5	7,7±0,6	6,0±0,6	10,1±0,6	7,8±0,8	8,8±0,9	8,0±2,0
PCr/ATP	4,2±0,1	4,7±1,9		5,0±1,0		4,2±0,3	5,0±0,5
Pi/ATP	$0,40\pm0,05$	0,6±0,3		$0,49\pm0,08$		0,5±0,1	0,6±0,2
pН	7,02±0,02	7,05±0,02	7,00±0,01	7,04±0,05	7,03±0,01	7,02±0,02	7,02±0,03
pacienti	DM1	DM2					DM1
PCr/Pi	10,4±0,2	6,3±0,8					7,0±2,0
PCr/ATP	4,1±0,1	4,3±1,2					4,5±0,5
Pi/ATP	0,40±0,02	0,7±0,2					0,6±0,3
pН	6,96±0,01	7,06±0,02					7,03±0,02

Tab. 22 Poměry metabolitů uváděné v odborné literatuře.

Zjištěná průměrná mitochondriální kapacita pacientů s DM1 byla signifikantně menší než zdravých dobrovolníků. Zmenšení hodnoty mitochondriální kapacity odpovídá snížení maximální míry oxidativního metabolismu svalů u pacientů s DM1. Zda má toto snížení vliv na převahu anaerobního metabolismu při mírné svalové činnosti, jíž jsou svaly vystaveny při běžné denní činnosti, je však otázkou vzhledem

k totožné klidové hodnotě pH mezi skupinami (anaerobní metabolismus zvyšuje kyselost svalů). Avšak samo zmenšení mitochondriální kapacity a redukce klidového poměru PCr/βATP již vypovídá o pravděpodobných patologických metabolických změnách odehrávajících se ve svalech u pacientů s DM1. Zjištěné snížení mitochondriální kapacity u pacientů s relativně dobře kompenzovaným DM1 má význam i vzhledem k onemocnění DM2. V případě pacientů s DM2 byl v literatuře [61,64,65] také detekován snížený oxidativní metabolismus, avšak tento pokles byl často spojován s možnou primární patologií mitochondrií, tedy ne jako důsledek samotného onemocnění diabetem.

Nabízí se otázka, z jaké příčiny je snížená mitochondriální kapacita. Zda je to důsledek poklesu celkového počtu mitochondrií, nebo důsledek zvětšeného podílu rychlých svalových vláken, anebo pouze špatnou produkcí ATP v rámci mitochondrií v důsledku špatné signalizace nebo poškození mitochondriálních enzymů a membrán.

Do studie byli záměrně vybráni pacienti s DM1 bez jiných onemocnění tak, aby bylo prokázáno, zda dochází k metabolickým změnám již v raných stadiích této choroby, kdy ještě nejsou patrné jiné chronické příznaky onemocnění. Z důvodu, že neznáme přesný původ snížené mitochondriální kapacity, a také proto, že pacienti netrpěli žádným zjevným chronickým problémem, nelze vyvodit závěr, zda mitochondriální kapacita je změněna v důsledku počátečního stadia konkrétní chronické komplikace diabetu, nebo zda se jedná o přizpůsobení organizmu situacím, kdy je vystaven různé hladině glykemie a přísunu glukózy do buněk.

Obdržené průměrné mitochondriální kapacity zdravých dobrovolníků a pacientů s DM1 považuji za navzájem porovnatelné z důvodu podobnosti skupin. Skupina pacientů měla stejné průměrné BMI a podobný průměrný věk (dokonce v průměru o 3 roky mladší) jako skupina zdravých dobrovolníků. Jediné, v čem se skupiny odlišovaly, byl větší podíl žen ve skupině dobrovolníků (45 % vůči 28 %).

Je zajímavé, že z hlediska průměrného výkonu pacienti dosahovali lepších výsledků než zdravé kontroly, což může být pouze důsledek snahy pacientů vykonat vyšetření co nejlépe.

Výsledné průměrné mitochondriální kapacity,  $V_{PCr}$ ,  $\tau_{PCr}$  jsou porovnány s publikovanými hodnotami v Tab. 23.

zdravé	tibialis anterior	lýtkový sval [66]	vastus lateralis	Srdce	quadri-	tibialis	lýtkový sval [62]	lýtkový sval [22]	lýtkový sval [63]	naše změřené
osoby	m.[60]	3vai [00]	[45]	[07]	<i>ceps m</i> .[01]	m.[57]	svai [02]	5vai [22]	5vai [05]	hodnot
$\tau_{PCr}[s]$	40±5	33±7	"podobné	32±3		39,3±7,5	43±6			50±20
V <sub>PCr</sub> (mmol/s)			hodnoty jako u pacientů"	0,33±0,03	8,95±3,52*			0,65±0,08	0,55±0,23	0,3±0,1
O <sub>max</sub>	0,8±0,07		-			0,36±0,05	0,51±0,09	1,1±0,11	0,75±0,18	0,6±0,2
(mmol/s)										
(										
	DM1	DM1	DM2	DM2	DM2					DM1
pacienti	DM1 (muži)	DM1 (ženy)	DM2	DM2	DM2					DM1
pacienti $\tau_{PCr}[s]$	DM1 (muži) 59±7	DM1 (ženy) 32±4	DM2 49,4±5,5	DM2 52±7	DM2					DM1 60±30
pacienti $\tau_{PCr}[s]$ $V_{PCr}$ (mmol/s)	DM1 (muži) 59±7	DM1 (ženy) 32±4	DM2 49,4±5,5 0,37±0,03	DM2 52±7 0,25±0,03	DM2 4,74±2,36*					DM1 60±30 0,2±0,1

Tab. 23 Přehled publikovaných hodnot mitochondriální kapacity.

\* nápadně odlišné hodnoty, pravděpodobně chyba jednotek v článku

Z této Tab. 23 vyplývá, že námi obdržené hodnoty mitochondriální kapacity jsou v rozmezí publikovaných hodnot, avšak  $\tau_{PCr}$  nám vychází spíše delší než v ostatních publikovaných pracích. Tento nesoulad možná plyne z toho, že pro výpočet  $\tau_{PCr}$  byl uvažován vždy celý změřený návrat signálu PCr na klidové hodnoty. Vyšší hodnoty námi získaných směrodatných odchylek u  $\tau_{PCr}$ ,  $V_{PCr}$  a  $O_{max}$  mohou být důsledkem toho, že vyjma dvou měření jsme zahrnuli do zpracování výsledky všech měřených osob bez ohledu na vykonanou práci.

Z hlediska problematiky DM1 jsou výsledky diplomové práce nejblíže studiím uvedeným v článcích [60] a [66]. Ve studii [60] je porovnávána mitochondriální kapacita mezi skupinou zdravých mužů a mužů s DM1, ve studii uvedené v [66] je mitochondriální kapacita naopak porovnávaná mezi zdravými ženami a pacientkami s DM1. V prvé uvedené studii došli k závěru, že mitochondriální kapacita signifikantně klesla u mužů trpících DM1 a naopak ve druhé studii nebyla naměřena žádná signifikantní změna mitochondriální kapacity mezi zdravými a nemocnými ženami. Takovýto odlišný výsledek v závislosti na pohlaví je zajímavý a vybízí ke kontrole, bohužel v případě skupiny pacientů s DM1 zatím máme k dispozici pouze 5 osob ženského pohlaví, což je k vytvoření samostatné skupiny pacientek s DM1 příliš málo.

Z hodnocení vztahu tělesné kondice k určené mitochondriální kapacitě plyne, že nejlepších výsledků dosahovali rekreační sportovci věnující se pravidelně tělesné zátěži. Srovnatelně stejně dobrých výsledků dosahovaly i osoby, které tráví převážnou část dne chůzí.

#### 5.5 Opakovatelnost a reprodukovatelnost měření

Z provedeného testu opakovatelnosti měření vyplynulo, že největší relativní chybu má signál anorganického fosfátu a signál PDE, což je pravděpodobně důsledkem jejich nejmenší poměrné velikosti vůči šumu. Z reprodukovatelnosti klidových poměrů dosahoval nejmenší chyby překvapivě poměr signálu Pi/βATP a dále poměr signálu PDE/βATP. Avšak žádný poměr nepřesahoval relativní chybu 10 %, a tudíž jednotlivé chyby daných poměrů jsou pod statistickou chybou poměrů měřených skupin (pouze chyba poměru signálu PCr/βATP se k ní blíží).

Při vyhodnocení mitochondriální kapacity představuje největší problém již zmíněné správné určení pH svalu a zvolení rozsahu fitování signálu PCr. Provedená reprodukovatelnost měření zcela tyto jevy nepostihuje, poněvadž u osoby č. 1 ani č. 12 nedocházelo k rozvoji velké acidóze a byl u nich vždy fitován celý změřený návrat PCr na klidové hodnoty.

#### 6 Závěr

Práce na diplomovém úkolu se uskutečnila na pracovišti magnetické rezonance ZRIR IKEM. Během diplomové práce jsem zvládnul techniku vyšetřování MR spektroskopií na dobrovolnicích a pacientech s onemocněním diabetes mellitus I.

V rámci diplomové práce byl zprovozněn ergometr domácí konstrukce, který umožnil vyšetřování pomocí <sup>31</sup>P MR spektroskopie při fyzické zátěži. S použitím daného ergometru byla spojena optimalizace vyšetřovacího protokolu pro <sup>31</sup>P MR spektroskopické vyšetřování při zátěži a zavedení postupu pro vyhodnocení vykonané práce během měření.

Byla porovnána dvě měřicí schémata s odlišným tempem cvičení. Na základě zkušeností z měření s ergometrem byly navrženy konstrukční změny na ergometru, které by měly vyšetřování zkvalitnit.

Vyšetřování <sup>31</sup>P MR spektroskopií při zátěži bylo využito ke klinickému výzkumu onemocnění DM1. Ekvivalentním protokolem bylo vyšetřeno devatenáct pacientů s tímto onemocněním a jednadvacet zdravých dobrovolníků.

Vyhodnocení jednotlivých signálů v klidových fosforových ukázalo signifikantní rozdíly v poměru metabolitů PCr/ATP. Z vyhodnocení <sup>31</sup>P MR spektroskopie při zátěži byly obdrženy hodnoty  $O_{max}$  a  $V_{PCr}$ , jejichž hodnota byla signifikantně snížená u pacientů s DM1. Z toho vyplývá, že onemocnění DM1 má nepříznivý vliv na oxidativní metabolismus svalů pacientů s tímto onemocněním.

## Seznam použité literatury

[1] Weis J., Bořuta P.: Úvod do magnetickej rezonancie. Tlač Datex, Bratislava, 1998

[2]de Graaf. R A.: In vivo NMR spectroscopy: Principles and techniques. John Wiley & Sons, Chichester, 1998

[3] Škoch A., Jiru F., Bunke J.: Spectroscopic imaging: basic principles. *Eur J Radiol*. 2008 Aug;67(2):230-9.

[4] Prosser V. a kol.: Experimentální metody biofyziky. Academia, Praha, 1989

[5] Klose U.: Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol.* 2008 Aug;67(2):194-201

[6] Jirů F.: Diplomová práce. MFF UK, Praha, 2000

[7] Wagnerová D.: Diplomová práce. MFF UK, Praha, 2007

[8] Tošner Z.: Diplomová práce. MFF UK, Praha, 1999

[9] Levitt M. H. Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance. John Wiley & Sons, Chichester, 2001

[10] Jiru F.: Introduction to post-processing techniques. *Eur J Radiol.* 2008 Aug;67(2):202-17

[11] Helms G.: The principles of quantification applied to in vivo proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol*. 2008 Aug;67(2):218-29.

[12] Kemp GJ., Meyerspeer M., Moser E.: Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by <sup>31</sup>P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed*. 2007; 20: 555–565

[13] Hájek M., Horská A., Belan A.: Využití <sup>31</sup>P MR spektroskopie při studiu kosterního svalstva člověka. *Praktický lékař*. 1990, Roč. 70, č. 14, S. 538-544.

[14] Bogner W., Chmelik M., Schmid AI., Moser E., Trattnig S., Gruber S.: Assessment of <sup>31</sup>P relaxation times in the human calf muscle: a comparison between 3 T and 7 T in vivo. *Magn Reson Med.* 2009 Sep;62(3):574-82.

[15] Meyerspeer M., Robinson S., Nabuurs C., Scheenen T., Schoisengeier A., Unger E., Kemp G., Moser E.: Comparing localized and nonlocalized dynamic <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in exercising muscle at 7 T. *Magn Reson Med.* 2012 Dec;68(6):1713-23.

[16] Hájek M., Dezortova M.: Introduction to clinical in vivo MR spectroscopy. *Eur J Radiol*. 2008 Aug;67(2):185-93

[17] Voet D.: Biochemie. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995

[18] Jones A., Wilkerson D., DiMenna F., Fulford J., Poole D.: Muscle metabolic responses to exercise above and below the "critical power" assessed using <sup>31</sup>P-MRS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Feb;294(2):R585-93.

[19] Kořínek M.: Diplomová práce. MFF UK, Praha, 1997

[20] Rossiter H., Ward S., Howe F., Kowalchuk J., Griffiths J., Whipp B.: Dynamics of intramuscular <sup>31</sup>P-MRS Pi peak splitting and the slow components of PCr and O<sub>2</sub> uptake during exercise. *J Appl Physiol*. 2002 Dec;93(6):2059-69.

[21] Wylezinska M., Cobbold J., Fitzpatrick J., McPhail M., Crossey M., Thomas H., Hajnal J., Vennart W., Cox I., Taylor-Robinson S.: A comparison of single-voxel clinical in vivo hepatic <sup>31</sup>P MR spectra acquired at 1.5 and 3.0 Tesla in health and diseased states. *NMR Biomed.* 2011 Apr;24(3):231-7.

[22] Lodi R., Kemp G., Muntoni F., Thompson CH., Rae C., Taylor J., Styles P., Taylor DJ.: Reduced cytosolic acidification during exercise suggests defective glycolytic activity in skeletal muscle of patients with Becker muscular dystrophy. An in vivo <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy study.*Brain*. 1999 Jan;122 ( Pt 1):121-30.

[23] Škoch A., Jírů F., Dezortová M., Krusinová E., Kratochvílová S., Pelikánová T., Grodd W., Hájek M.: Intramyocellular lipid quantification from <sup>1</sup>H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCModel technique. *J Magn Reson Imaging*. 2006 May;23(5):728-35.

[24] Murray, Robert K.: Harperova biochemie. 4. čes. vyd. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H H, 2002

[25] Mescher, Anthony L.: Junqueira's basic histology: text and atlas. 12th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2010

[26] Havlíčková L.: Fyziologie tělesné zátěže 1: obecná část. Dotisk. Praha: Univerzita Karlova - Vydavatelství Karolinum, 1994

[27] Trappe S., Costill D., Gallagher P., Creer A., Peters JR., Evans H., Riley DA., Fitts R.: Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1159-68.

[28] Vikne H., Gundersen K., Liestol K., Maelen J., Vollestad N.: Intermuscular relationship of human muscle fiber type proportions: slow leg muscles predict slow neck muscles. *Muscle Nerve*. 2012 Apr;45(4):527-35.

[29] Kittnar O.: Lékařská fyziologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2011

[30] Kemp GJ., Roussel M., Bendahan D., Le Fur Y., Cozzone PJ.: Interrelations of ATP synthesis and proton handling in ischaemically exercising human forearm muscle studied by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. *J Physiol*. 2001, pp.901–928.

[31] Kolář D.: Bakalářská práce. PřF UK, Praha, 2011

[32] Lehninger A. L.: Principles of Biochemistry. 2nd Ed. New York: Worth Publishers, 1993

[33] Bilous R., Donnelly R.: Handbook of Diabetes. John Wiley & Sons, Singapore, 2010

[34] Ústav zdravotnických informací a statistiky české republiky. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2011. Praha, 2012. Dostupné z: www.uzis.cz/system/files/39\_12.pdf

[35] Ganong W. F.: Přehled lékařské fyziologie. 20. vyd. Praha: Galén, 2005.

[36] Feinglos, Mark N., Bethel M.: Type 2 diabetes mellitus: an evidence-based approach to practical management. Totowa, NJ: Humana Press, 2008.

[37] Klener P.: Vnitřní lékařství. 4., přeprac. a doplň. vyd. Praha: Galén, 2011

[38] Kyoto university bioinformatics center. GenomeNet Database Resources [online]. [cit. 2013-03-07]. Dostupné z: http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04910.html

[39] Simoneau JA., Kelley DE.: Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in type 2 diabetes. *J Appl Physiol.* 83:166–171, 1997

[40] He J., Watkins S., Kelley DE.: Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diab*. 50:817–823, 2001

[41] Oberbach A., Bossenz Y., Lehmann S., Niebauer J., Adams V., Paschke R., Schön MR., Blüher M., Punkt K.: Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diab Care*. 2006 Apr;29(4):895-900.

[42] Parish R, Petersen KF.: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.*Curr Diab Rep.* 2005 Jun;5(3):177-83.

[43] Pagel-Langenickel I., Bao J., Pang L., Sack MN.: The Role of Mitochondria in the Pathophysiology of Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Endocr Rev.* 2010 Feb;31(1):25-51.

[44] Kim JA., Wei Y., Sowers JR.: Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res.* 2008 Feb 29;102(4):401-14.

[45] Praet SF., De Feyter HM., Jonkers RA., Nicolay K., van Pul C., Kuipers H., van Loon LJ., Prompers JJ.: <sup>31</sup>P MR spectroscopy and in vitro markers of oxidative capacity in type 2 diabetes patiens. *Magn Reson Mater Phy.* (2006) 19: 321–331

[46] Wackerhage H., Hoffmann U., Essfeld D., Leyk D., Mueller K., Zange J.: Recovery of free ADP, Pi, and free energy of ATP hydrolysis in human skeletal muscle hydrolysis in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1998; 85:2140-2145.

[47] Lodi R., Kemp GJ., Iotti S., Radda GK., Barbiroli B. Radda and Bruno Barbiroli.: Influence of cytosolic pH on in vivo assessment of human muscle mitochondrial respiration by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Mater Phy.* (1997) 5, 165-171

[48] Forbes SC., Paganini AT., Slade JM., Towse TF., Meyer RA.: Phosphocreatine recovery kinetics following low- and high-intensity exercise in human triceps surae

and rat posterior hindlimb muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Jan;296(1):R161-70.

[49] Tonson A., Ratel S., Le Fur Y., Vilmen C, Cozzone PJ., Bendahan D.: Muscle energetics changes throughout maturation: a quantitative <sup>31</sup>P-MRS analysis. *J App Physiol*. 2010-12-09, roč. 109, č. 6, s. 1769-1778

[50] Zvárová Jana.: Základy statistiky pro biomedicínské obory. 2., dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2011

[51] Wray DW., Nishiyama SK., Monnet A., Wary C., Duteil S., Carlier PG., Richardson RS.: Multiparametric NMR-based assessment of skeletal muscle perfusion and metabolism during exercise in elderly persons: preliminary findings. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009 Sep;64(9):968-74

[52] Haseler LJ., Hogan MC., Richardson RS.: Skeletal muscle phosphocreatine recovery in exercise-trained humans is dependent on  $O_2$  availability. *J Appl Physiol*. 1999 Jun;86(6):2013-8.

[53] Slade JM., Towse TF., Delano MC., Wiseman RW., Meyer RA.: A gated 31P NMR method for the estimation of phosphocreatine recovery time and contractile ATP cost in human muscle. *NMR Biomed.* 2006 Aug;19(5):573-80.

[54] Meyerspeer M., Krssák M., Kemp GJ., Roden M., Moser E.: Dynamic interleaved  ${}^{1}\text{H}/{}^{31}\text{P}$  STEAM MRS at 3 Tesla using a pneumatic force-controlled plantar flexion exercise rig. *Magn Reson Mater Phys Med.* 2005 Nov;18(5):257-62

[55] Meyerspeer M., Scheenen T., Schmid AI., Mandl T., Unger E., Moser E.: Semi-LASER localized dynamic <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in exercising muscle at ultra-high magnetic field. *Magn Reson Med.* 2011 May;65(5):1207-15

[56] Jubrias SA., Crowther GJ., Shankland EG., Gronka RK., Conley KE.: Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J Physiol*. 2003 Dec 1;553(Pt 2):589-99.

[57] Jeppesen TD., Quistorff B., Wibrand F., Vissing J.: <sup>31</sup>P-MRS of skeletal muscle is not a sensitive diagnostic test for mitochondrial myopathy. *J Neurol.* 2007 Jan;254(1):29-37

[58] Pipinos II, Shepard AD., Anagnostopoulos PV., Katsamouris A., Boska MD.: Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg*. 2000 May;31(5):944-52

[59] Mattei JP., Bendahan D., Cozzone P.: P-31 Magnetic Resonance Spectroscopy. A tool for diagnostic purposes and pathophysiological insights in muscle. *Reumatismo*. 2004 Jan-Mar;56(1):9-14

[60] Crowther GJ., Milstein JM., Jubrias SA., Kushmerick MJ., Gronka RK., Conley KE.: Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin-dependent (type 1) diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Apr;284(4):E655-62.

[61] Wu FY., Tu HJ., Qin B., Chen T., Xu HF., Qi J., Wang DH.: Value of dynamic <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy technique in in vivo assessment of the skeletal muscle mitochondrial function in type 2 diabetes. *Chine Med J.* 2012;125(2):281-286

[62] Ko SF., Huang CC., Hsieh MJ., Ng SH., Lee CC., Lee CC., Lin TK., Chen MC., Lee L.: <sup>31</sup>P MR Spectroscopic Assessment of Muscle in Patients with Myasthenia Gravis before and after Thymectomy: *Radiology*: Volume 247: Number 1 April 2008

[63] Lodi R., Taylor DJ., Tabrizi SJ., Hilton-Jones D., Squier MV., Seller A., Styles P., Schapira AH.: Normal in vivo skeletal muscle oxidative metabolism in sporadic inclusion body myositis assessed by <sup>31</sup>P-magnetic resonance spectroscopy.*Brain*. 1998 Nov;121 (Pt 11):2119-26.

[64] Petersen KF., Dufour S., Befroy D., Garcia R., Shulman GI.: Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350: 664–671.

[65] Petersen KF., Dufour S., Shulman GI.: Decreased Insulin-Stimulated ATP Synthesis and Phosphate Transport in Muscle of Insulin-Resistant Offspring of Type 2 Diabetic Parents. *PLoS Med.* 2005 Sep;2(9):e233. Epub 2005 Aug 16.

[66] Item F., Heinzer-Schweizer S., Wyss M., Fontana P., Lehmann R., Henning A., Weber M., Boesiger P., Boutellier U., Toigo M.: Mitochondrial capacity is affected by glycemic status in young untrained women with type 1 diabetes but is not impaired relative to healthy untrained women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Jul;301(1):R60-6.

[67] Scheuermann-Freestone M., Madsen PL., Manners D., Blamire AM., Buckingham RE., Styles P., Radda GK., Neubauer S., Clarke K.: Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003 Jun 24;107(24):3040-6.

# Seznam tabulek

Tab. 1 Parametry použitých zobrazovacích sekvencí pro zobrazení svalu	.55
Tab. 2 Parametry použitých spektroskopických sekvencí při vyšetřování subjektů	.55
Tab. 3 Klidové poměry integrálních intenzit jednotlivých metabolitů u zdravých	
dobrovolníků	. 57
Tab. 4 Klidové poměry integrálních intenzit jednotlivých metabolitů u pacientů	
s DM1	. 58
Tab. 5 Srovnání poměrů integrálních intenzit metabolitů mezi pacienty s DM1	
a zdravými dobrovolníky pomocí t-testu	. 59
Tab. 6 Srovnání průměrných poměrů integrálních intenzit metabolitů u zdravých	
mužů a žen pomocí t-testu	. 59
Tab. 7 Relaxační konstanty PCr, Pi a relativní změny PCr a Pi v porovnání obou	
protokolů	. 66
Tab. 8 V <sub>PCr</sub> , O <sub>max</sub> a průměrný výkon v porovnání obou protokolů	. 67
Tab. 9 Porovnání protokolu č. 1 a č. 2 – průměrné hodnoty	. 68
Tab. 10 Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu u protokolu č. 1 a 2	. 68
Tab. 11 Relaxační konstanty PCr, Pi a relativní změny PCr a Pi u zdravých	
dobrovolníků a pacientů s DM1	.71
Tab. 12 $V_{PCr}$ a $O_{max}$ a průměrný výkon u zdravých dobrovolníků a pacientů s DM	1.
	. 72
Tab. 13 Porovnání skupiny zdravých osob a pacientů s DM1	.73
Tab. 14 Dvouvýběrový t-test na střední hodnotu u zdravých dobrovolníků a pacien	ıtů
s DM1	.73
Tab. 15 Opakovatelnost klidových <sup>31</sup> P MR spekter	.75
Tab. 16 Průměrná opakovatelnost klidových <sup>31</sup> P MR spekter	. 75
Tab. 17 Reprodukovatelnost klidových <sup>31</sup> P MR spekter	.76
Tab. 18 Průměrná reprodukovatelnost klidových <sup>31</sup> P MR spekter	.76
Tab. 19 Mitochondriální kapacita u osoby č. 12	. 77
Tab. 20 Mitochondriální kapacita u osoby č. 1	. 77
Tab. 21 Hodnoty klidových poměrů signálu PCr/ATP, Pi/PCr, koncentrace ADP,	
G <sub>ATP</sub> a mitochondriální kapacity	. 84
Tab. 22 Poměry metabolitů uváděné v odborné literatuře	. 85
Tab. 23 Přehled publikovaných hodnot mitochondriální kapacity	. 87

# Přílohy

# Příloha č. 1 Schéma ergometru

# Pohled shora



# Pohled z boku



# Pohled zepředu




Pohled shora, zepředu a z boku na dolní desku ergometru.

### Příloha č. 2 Program potenciometr

#### Zdrojový kód programu pro vyhodnocení dat z potenciometru.

```
<? echo
          "Soubory, které chcete zpracovávat, musí být ve stejném adresáři."; ?>
<FORM ACTION="<?echo $ SERVER["PHP SELF"]?>"
                                                             METHOD="post"
ENCTYPE="multipart/form-data">
<INPUT TYPE="file" NAME="soubor" SIZE="30"> <br><br>
horní mez mez do<input type="text" name="horniod"> <br>
horní mez mez od<input type="text" name="hornido"> <br>
dolní mez od<input type="text" name="dolniod"> <br>
dolní mez do<input type="text" name="dolnido"> <br>
<input type="hidden" name="odeslano" value="1">
<INPUT TYPE="submit" NAME="akce" VALUE="zpracovat">
</FORM>
<?
if ($_REQUEST["odeslano"]==1) {
echo "zpracováno".$soubor_name;
$adresar = opendir(".");
while ($ssr = readdir($adresar)){
if($ssr == "zp".$soubor_name){
unlink("zp".$soubor_name); } }
c = 0;
$aaa = "./".$soubor_name ;
$soubor = fopen($aaa, "r");
$zaznamy=file($aaa);
$id=count($zaznamy);
echo $id."pocet<br>";
$c=1;
do {
$prvni=fgets($soubor);
$c++;
}while($c<20);
$c=1; $drfth=0;
do {
if(c>20)
$prvni=fgets($soubor);
$pole = Explode (",", $prvni);
If (0 = round(pole["0"], -5)) {
$poletax["$drfth"]=$pole["0"];
$poletax["$drfth"]=round($poletax["$drfth"], 2);
 $poletay[$drfth] =$pole["1"];
$poletay[$drfth]=round($poletay["$drfth"], 3);
$drfth++; }
$000[$c] =$pole["1"]; }
 $c++;
} while($c<$id);
$upInynarust=0;
$pckopec=0;
$c=40:
```

```
while($c<$id) {
$pred=0;
for ($cz=1; $cz<5; $cz++){
$pred=$000[($c-$cz-8)]+$pred ;
}$pred=$pred/4;
if (($000[$c]-$000[($c-8)])>0.1) {
$konecintervalu=0;
$narust=0;
do {
if ($000[$c]>$narust) {
narust=000[c]; 
dsfvdsv = \\sooo[$c]-\\sooo[($c-10)];
if (($dsfvdsv)<-0.1) { $konecintervalu=1;}
c = c+1;
while (($konecintervalu==0) and ($c<$id));
$celknarust= $narust- $pred ;
$upInynarust=$upInynarust+ $celknarust;
$pckopec=$pckopec+1;
$celknarust=0; }
$c++; }
echo "Celková práce dle programu č.1 - <br>".$uplnynarust." počet jednotlivých
signálů - ".$pckopec." <br>"; }
include 'aaaa.php';
$koncecpole= count($poletax)-20 ;
$posledni= $poletax[$koncecpole] ;
GenGraph
($poletay,$poletax,$_POST["dolniod"],$_POST["dolnido"],$_POST["horniod"],$_P
OST["hornido"], $poletax[1], $posledni, $poletay[1]);
$index=1:
$nacitaniprace=0;
$a=0; $kjhbj=0;
$pocetkopcu=0;
$navrch=0;
$maxkopecku=0;
$nko=0;
do {
$prubmezdolni=$ POST["dolniod"]+($ POST["dolnido"]-
$_POST["dolniod"])/$posledni*$poletax[$index];
$prubmezhorni=$_POST["horniod"]+($_POST["hornido"]-
$_POST["horniod"])/$posledni*$poletax[$index];
if ($poletay[$index]>$prubmezhorni){
if ($poletay[$index]>$maxkopecku){
$maxkopecku=$poletay[$index]; }
$index++;
$a=1; }
else {
if ($nko<50) {$kjhbj= $kjhbj + $poletay[$index];
$nko++; }
if (\$nko=50) \{\$navrch = \$kjhbj / 50 ;
echo "Navrhovaná dolní mez: <br>".$navrch ; $nko++; }
```

102

```
if ( $a==1) { $nacitaniprace = $maxkopecku - $prubmezdolni+ $nacitaniprace ;
$pocetkopcu=$pocetkopcu+1;}
$a=0;
$index++; $maxkopecku= $prubmezhorni ;} }
while ((count($poletax))>$index) ;
echo "<br> Celková práce podle prog:<br>".$nacitaniprace." <br> počet kopců
".$pocetkopcu." "; ?>
<img src="obraaa.jpg" />
</div>
```

#### Grafický interface

```
<?php
function GenGraph
($dcvsdfv,$dsvds,$odmin,$domin,$odmax,$domax,$od,$do,$min) {
include ("../jpgraph.php");
include ("../jpgraph_scatter.php");
include ("../jpgraph_line.php");
 ob start();
$min=$min-0.3;
$graph = new Graph(8000,600,"auto");
$graph->SetScale('linlin',$min,4);
// Set major tick dist to 40 and minor to 20
$graph->yaxis->scale->ticks->Set(0.1,0.01);
$graph->img->SetMargin(40,40,40,40);
$graph->SetShadow();
$graph->title->Set("A simple scatter plot");
$graph->title->SetFont(FF_FONT1,FS_BOLD);
$sp1 = new ScatterPlot($dcvsdfv,$dsvds);
$graph->Add($sp1);
data2y[0] = $odmin;
data2y[1] = domin;
$data2x =array($od,$do);
$p2 = new LinePlot($data2y,$data2x);
$p2->mark->SetType(MARK STAR);
$p2->mark->SetFillColor("red");
$p2->mark->SetWidth(4);
$p2->SetColor("red");
$p2->SetCenter();
$graph->Add($p2);
data3y[0] = data3y[0]
data3y[1] = domax;
data3x = array(0,0);
$p3 = new LinePlot($data3y,$data3x);
$p3->mark->SetType(MARK STAR);
$p3->mark->SetFillColor("red");
$p3->mark->SetWidth(4);
$p3->SetColor("red");
$p3->SetCenter();
$graph->Add($p3);
$graph->Stroke("obraaa.jpg"); }
                                 ?>
```

## Příloha č. 3 Program na řazení spekter

```
<? $cc =1;
$slozka = dir("C:\ComplexWebServer\http_docs\programprejmenovani\a");
while($soubor=$slozka->read()) {
if ($soubor=="." || $soubor=="..") continue;
{ echo "<a href=\"29/soubor\">".soubor."</a><br>\n";
$polecko1[$cc] =$soubor ;
$pole = Explode (".", $soubor );
$polecko11[$cc] = $pole[4];}
$cc++; }
$slozka->close();
array_multisort($polecko11,$polecko1);
for (\$i = 0; \$i < count(\$polecko1); ++\$i) 
$dsvdfdf = "prejmenovani.php";
$dfvdfvd = $polecko1[$i];
if ($i<10) $ccs= "00".$i.".IMA";
if (($i<100) and ($i>9)) $ccs= "0".$i.".IMA";
if ($i>99) $ccs = $i.".IMA";
if ($dfvdfvd == $dsvdfdf);
else {rename($polecko1[$i], $ccs);
echo $polecko1[$i].">>". $ccs ."<br>\n"; };
```

# Příloha č. 4 Formulář

# Formulář k ergometrickému vyšetření

Koureni: ano	ne 📕
Aktivně provozo	vaný/é sport/y (v závorce napište, kolik hodin mu týdně věnujete):
Tem Wašaha zam	Retadati fandard XdataXaS va atain anld va atain y blida
ve stoje a převaž	aje chûze,):
Kolik za den nac	hodíte kilometrů (stačí hrubý odhad)? 📃 km
Kdy jste proděla	/a naposledy větší svalovou zátěž?
Jak se momentál	ně fyzicky cítíte? výborně 📕 dobře 📕 průměrně 📕 špatně 📕
Dovožnioto co zo	
rovazujete se za.	
antisportovce	běžného človéka 💼 rekreačního sportovce 💼 aktivního sportovce
Máte raději: krát	ké a intenzivní cvičení 📕 nebo mírnou, ale déle trvající zátěž 📕
Máte v přímé pří	buzenské linii osobu s diabetem?
Máte speciální st	ravovací návyky nebo požíváte svalové stimulanty? ne – ano (specifikujte)
Máte nějaké spec	iální problémy se svaly nebo s dolní končetinou?
Trpíte závažnou	chorobou (srdeční onemocnění, diabetes, )?

Jak dlouho před vyšetřením jste naposledy pil/a nápoj s vyšším obsahem kofeinu (káva): \_\_\_\_\_ hod

#### Otázky vztahující se k prodělanému vyšetření

malá přiměřená velká, ale k zvládnutí příliš velká Odhadněte jak dlouho, byste ještě vydržel/a cvičit: nevydržel/a bych déle do 2 až 3 min do 15 min déle než 15 min Byl/a jste po cvičení unaven/á?
Odhadněte jak dlouho, byste ještě vydržel/a cvičit: nevydržel/a bych déle 📕 do 2 až 3 min 📕 do 15 min 📕 déle než 15 min 📕 Byl/a jste po cvičení unaven/á?
nevydržel/a bych déle 📕 do 2 až 3 min 📕 do 15 min 📕 déle než 15 min 📕 Byl/a jste po cvičení unaven/á?
Byl/a jste po cvičení unaven/á?
ani ne 🔳 mírně 📕 dost 📕 velice 📕
Měl/a jste při cvičení nějaké problémy?