



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra přírodovědných oborů**

Částečná orientace molekul kreatinu ve svalu: in vitro model

Partial orientation of creatine molecules in muscle: in vitro model

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Vedoucí práce: RNDr. Jan Lang, Ph.D.

Bc. Karel Bernášek

Kladno 2010

Z a d á n í d i p l o m o v é p r á c e

Student: **Bc. Karel Bernášek**
Program: Biomedicínská a klinická technika
Obor: Přístroje a metody pro biomedicínu
Název tématu: Částečná orientace molekul kreatinu ve svalu: in vitro model
Název tématu anglicky: Partial orientation of creatine molecules in muscle: in vitro model

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

1. Literární rešerše problematiky pozorování residuálního dipolárního couplingu v molekule kreatinu ve svalu.
2. Seznámení se s technikou přípravy stlačených poly-akrylamidových gelů.
3. Osvojení si základů ovládání spektrometru nukleární magnetické rezonance.
4. Experimentální práce - příprava gelů s různou koncentrací, stupněm zesíťování a mírou stlačení.
5. Naměření ^1H NMR spekter kreatinu rozpuštěného v připravených vzorcích gelu.
6. Vyhodnocení naměřených spekter.
7. Sepsání diplomové práce.

Seznam odborné literatury:

1. Levitt, M. H. : Spin Dynamics; Basics of Nuclear Magnetic Resonance, John Wiley & Sons, Chichester, 2001.(vybrané kapitoly)
2. Kramer, F., Deshmukh, M.V., Kessler, H., Glaser, S.J.: Residual Dipolar Coupling Constants: An Elementary Derivation of Key Equations; Concepts in Magnetic Resonance Part A, Vol. 21A(1) 10?21 (2004).
3. Brunner, E.: Residual Dipolar Couplings in Protein NMR, Concepts in Magnetic Resonance, Vol. 13(4) 238-259 (2001).
4. Boesch, C., Kreis, R.: Dipolar Coupling and ordering effects observed in magnetic resonance spectra of skeletal muscle; NMR in Biomedicine, Vol. 14, 140-148 (2001).

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Lang, Ph.D. (MFF UK)

Konzultant: MUDr. Antonín Škoch, Ph.D: (IKEM Praha)

Datum zadání diplomové práce: 12.10.2009

Termín odevzdání diplomové práce: 4.6.2010 (20.8.2010)

L.S.

.....
vedoucí katedry

.....
děkan

V Kladně dne

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem

Částečná orientace molekul kreatinu ve svalu: in vitro model

vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne **4. 6. 2010**

Karel Bernášek

Poděkování

Rád bych poděkoval za odborný dohled vedoucímu práce RNDr. Janu Langovi, Ph.D. Děkuji MUDr. Antonínu Škochovi, Ph.D. za konzultace z oblasti medicíny. Děkuji také Mgr. Mariánu Grockému a Mgr. Pavlu Srbovi, Ph.D. za rady a pomoc při měření. V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům za podporu při vypracovávání diplomové práce.

Abstrakt

In vivo spektroskopie magnetické rezonance poskytuje řadu informací využitelných pro diagnostické účely jako například indentifikace a stanovení koncentrace významných metabolitů v měkkých tkáních. Dosud málo prozkoumaným jevem je pozorování štěpení signálů v ^1H spektru kosterního svalu v důsledku reziduální dipolární vazby, které se projevuje zejména na signálech kreatinu, karnosinu a taurinu. Diplomová práce se zaměřila na vytvoření podmínek in vitro pro částečnou orientaci molekul metabolitů, podobnou jako ve svalové tkáni, použitím radiálně stlačeného polyakrylamidového gelu jako orientujícího média. Práce s gelem zahrnovala nalezení vhodného chemického složení, upřesnění protokolu přípravy a výběr vhodné techniky pro stlačení gelu. Pomocí spektroskopie magnetické rezonance vysokého rozlišení byla detekována částečná orientace studovaných molekul zejména kreatinu a karnosinu ve formě štěpení signálů geminálních vodíků methylenových skupin, které je důsledkem reziduální dipolární vazby. Výsledky poslouží k vytvoření zjednodušeného modelu svalu a konstrukci fantomu, kalibračního a testovacího vzorku pro MR tomografii.

Klíčová slova: Nukleární magnetická rezonance, Reziduální dipolární vazba, Částečná orientace, Polyakrylamidový gel, Kreatin, Karnosin

Abstract

In vivo magnetic resonance spectroscopy provides great amount of information applicable for diagnostic purposes such as identification of major metabolites present in soft tissues and determination of their concentration. The splitting observable in ^1H spectrum of skeletal muscle as a consequence of residual dipolar coupling has been unsufficiently explored phenomenon yet. Especially the signals of creatine, carnosine and taurine were affected. This Diploma thesis focus on finding an optimal in vitro conditions leading to the partial orientation of the metabolites with properties similar to those occurring in the muscle tissue. Radially stretched polyacrylamide gel was used as the orienting medium. The work with the gel involved the search for optimal chemical composition, preparation procedure details and selection of the most suitable technique for the gel stretching. The partial orientation of carnosine molecules was detected as additional splitting of resonances of geminal hydrogens of methylene groups by means of high resolution magnetic resonance spectroscopy. The results of this work will be utilized for a development of a simplified model of the muscle and design of a novel phantom, as a calibration and testing sample for MR tomograph.

Key words: Nuclear magnetic resonance, Residual dipolar coupling, Partial orientation, Polyacrylamide gel, Creatine, Carnosine

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	12
2.1. Úvod do nukleární magnetické rezonance	12
2.1.1. Spektroskopická metoda NMR	12
2.1.2. Fyzikální princip NMR	13
2.1.3. Interakce s externím magnetickým polem	14
2.1.4. Pulzní metody	16
2.1.5. Interní interakce	17
2.1.6. Zobrazování pomocí magnetické rezonance	18
2.1.7. Residuální dipolární štěpení	19
2.1.8. Použité pulzní sekvence	20
2.2. Orientující média	22
2.2.1. Obecně o orientujících médiích	22
2.2.2. Kapalné krystaly	23
2.2.3. Metoda stačeného polymerového gelu	24
2.3. Informace o svalu a metabolitech	25
2.3.1. Svalová tkáň	25
2.3.2. MRS spektrum svalů	27
2.3.3. Informace o kreatinu	29
2.3.4. Informace o karnosinu	32
3. Experimentální část	33
3.1. Měření pomocí nukleární magnetické rezonance	33
3.1.1. Popis spektrometru	33
3.1.2. Popis přípravy k měření	33
3.2. Příprava vzorků	35
3.2.1. Metoda natahovací hadičky	35
3.2.2. Metoda dle Baxe	36
3.2.3. Příprava gelu	37
3.3. Výsledky	40
3.3.1. První etapa měření – metoda natahovací hadičky	40
3.3.2. Druhá etapa měření – metoda dle Baxe	43
3.3.3. Třetí etapa měření – od metabolitů zpět ke kreatinu	43

3.3.4.	Čtvrtá etapa měření – karnosin	44
3.3.5.	Pátá etapa měření – získání štěpení ve spektru karnosinu	45
3.4.	Diskuse výsledků	52
3.4.1.	Metody přípravy gelů.....	52
3.4.2.	Měření gelů	54
3.4.3.	Naměřené výsledky.....	55
4.	Závěr.....	57
	Seznam použité literatury	58

Seznam použitých zkratek a symbolů

APS	Peroxidisíran amonný (Ammonium persulfate)
Bisakrylamid	N,N'-methylenbisakrylamid (Bisakrylamid)
Cr	Kreatin
Cs	Karnosin
FID	Signál volné precese (Free Induction Decay)
MAS	Rotace pod magickým úhlem (Magic Angle Spinning)
MRI	Zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging)
MRS	Spektroskopie magnetické rezonance (Magnetic Resonance Spectroscopy)
MRSI	Spektroskopické zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
RDC	Residuální dipolární vazba (Residual Dipolar Coupling)
RQC	Residuální kvadrupólová vazba (Residual Quadrupolar Coupling)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

1. Úvod

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jev, jehož základem je rezonanční chování atomových jader s nenulovým spinem v magnetickém poli. Základními aplikacemi jsou NMR spektroskopie a zobrazování (MR tomografie). Spektroskopie nachází hlavní využití jako analytická metoda v chemii a strukturní biologii, která umožňuje stanovit strukturu a dynamiku molekul na různých úrovních, od topologie a typu chemických vazeb až po třídimenzionální prostorovou strukturu. MR tomografie je dnes jednou z nejdůležitějších neinvazivních diagnostických technik používaných v medicíně. Tato metoda využívá toho, že intenzita signálu jader ^1H vody je ve většině měkkých tkání o několik řádů vyšší než signál z jiných látek. S využitím kontrolovaných gradientů externího magnetického pole je možné z odezvy jader ^1H vody získat prostorově rozlišený obraz. Vedle obrazu je ale možné změřit i prostorově lokalizovaná in vivo MR spektra. Tato spektra přinášejí neinvazivní cestou rozsáhlou informaci, jako například identifikaci hlavních metabolitů přítomných ve zkoumané látce, jejich koncentraci, relaxační vlastnosti jaderných spinů těchto metabolitů často závislé na míře okysličení tkáně. Lze stanovit koeficient translační difuze vody v dané tkáni. Novým a dosud velmi málo využitým spektrálním parametrem je štěpení některých píků v ^1H spektru v důsledku reziduální dipolární vazby (RDC). Tento jev byl pozorován na signálech některých důležitých metabolitů, jako jsou kreatin, karnosin a taurin v kosterním svalu. Přítomnost reziduální dipolární vazby svědčí o částečné preferované orientaci molekul v tkáni, například v důsledku interakce se svalovými vlákny. Uměle vyvolané reziduální dipolární vazby se dnes využívá in vitro ke stanovení prostorové struktury biomakromolekul, jako jsou proteiny nebo nukleové kyseliny. Zkoumaná látka je rozpuštěná ve speciálním médiu, které má tendenci se orientovat v důsledku vnější síly, ať již mechanické, magnetické, případně elektrické a za těchto podmínek je měřeno NMR spektrum.

Tato diplomová práce klade za cíl pokusit se vyvolat preferenční orientaci některého z významných metabolitů ve svalu za in vitro podmínek, a to za pomoci mechanicky stlačeného gelu na bázi akrylamidu. Tato metoda je dobře popsána pro aplikace na proteinech. Indukovat preferenční orientace na výše uvedených svalových metabolitech je však mnohem obtížnější kvůli podstatně menší velikosti a vnitřní flexibilitě jejich molekul. Použití radiálně stlačeného gelu nabízí paralelu s mechanickým působením vláken aktinu a myozinu ve svalu. Ověření této hypotézy je ale již mimo rámec této práce. Výsledky této práce by též měly být podkladem pro konstrukci kalibračního vzorku, takzvaného fantomu

pro MR tomografii, který by zjednodušil optimalizaci měřicích metod a umožnil testovací měření např. závislosti štěpení na orientaci vzhledem k magnetickému poli. Informace o mechanismu částečné orientaci molekul metabolitů by následně mohly být použity pro diagnostiku svalové tkáně. Postmortální studie na zvířatech ukazují patobiochemické změny ve svalu, které se projevují jako změna charakteru RDC kreatinu a taurinu. Je pravděpodobné, že podobné změny mohou být pozorovány i u různých typů nervosvalových onemocnění, u kterých dochází k narušení buněčné struktury, příkladem mohou být svalové dystrofie.

Práce je členěna na teoretickou a experimentální část. V teoretické části jsou uvedeny základy magnetické rezonance, poznatky o reziduálním dipolárním štěpení, informace o orientujících médiích, úvod do anatomie svalové tkáně a základní poznatky o kreatinu a karnosinu. V experimentální části je popsáno měření pomocí spektrometru nukleární magnetické rezonance, metody použité k získání částečné orientace molekul, postup přípravy gelů a výsledky měření s vyhodnocením. Experimentální část diplomové práce probíhala na pracovišti Oddělení radiofrekvenční spektroskopie Katedry fyziky nízkých teplot Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. V rámci diplomové práce jsem se zúčastnil semináře Moderní problémy NMR spektroskopie, který shrnuje poznatky o magnetické rezonanci a umožňuje pochopit a osvojit si základní principy a možnosti měření.

2. Teoretická část

2.1. Úvod do nukleární magnetické rezonance

2.1.1. Spektroskopická metoda NMR

Historie nukleární magnetické rezonance (NMR) začíná ve druhé polovině 40 let minulého století, kdy se uskutečnilo první měření signálu NMR kapalného a pevného vzorku. Vývoj měření pomocí magnetické rezonance je v zásadě stejně jako vývoj většiny ostatních měřicích metod spojen s technologickými poznatky pro výrobu vlastního měřicího zařízení. Zásadními milníky jsou měření pevných vzorků pomocí metody MAS (Magic Angle Spinning), zavedení pulzní metodiky ve spojení se zpracováním signálu pomocí Fourierovy transformace, vyvinutí metodiky měření vícedimenzionálních spekter a v neposlední řadě zobrazování makroskopických biologických struktur pomocí MRI. Magnetická rezonance našla nejdříve své uplatnění ve fyzice materiálů, následně využívali výhody měření NMR chemici a později biologové při zkoumání struktury molekul a nejnověji se začala využívat NMR v medicíně pro účely zobrazování měkkých tkání. Zásadní výhodou magnetické rezonance je její neinvazivnost, při měření se nepoškodí vzorek, který může být dále upraven a znovu změřen. Bližší informace o historii NMR viz [1], [2] nebo [3].

Spektroskopii magnetické rezonance lze rozdělit do dvou hlavních oborů, měření kapalných vzorků a měření pevných vzorků. Spektra kapalin se většinou vyznačují píky s malou pološířkou, která je způsobena pohybovým středováním některých interakcí, jako je dipól-dipólová interakce či chemické stínění. V pevné látce naopak k pohybovému středování vesměs nedochází a pro zvýšení rozlišení spektra a citlivosti je nutné užít speciální techniky jako například metodu MAS.

Za objevy spojené s magnetickou rezonancí bylo uděleno několik Nobelových cen. První Nobelova cena za fyziku byla udělena F. Blochovi a E. M. Purcellovi v roce 1952 za vývoj nových metod pro měření nukleární magnetické precese a s nimi spojené objevy. V roce 1991 obdržel R. R. Ernst Nobelovu cenu za chemii za příspěvky k vývoji metodiky spektroskopie NMR vysokého rozlišení. Kurt Wüthrich získal v roce 2002 Nobelovu cenu za chemii za rozvoj spektroskopie NMR ke stanovení prostorové struktury biologických makromolekul v roztoku. Poslední Nobelova cena za medicínu byla udělena P. C. Lauterburovi a Siru P. Mansfieldovi v roce 2003 za objevy spojené s MRI. [4].

2.1.2. Fyzikální princip NMR

Nukleární magnetická rezonance je důsledkem magnetických vlastností atomového jádra a jeho chování ve statickém magnetickém poli. Základní charakteristikou jádra je celkový moment hybnosti označovaný jako jaderný spin (I). Spinový moment hybnosti jádra je dán vektorovým součtem momentů hybnosti jednotlivých elementárních částí jádra, tedy protonů a neutronů. Nejběžněji se používají jádra se spinovým kvantovým číslem $I = \frac{1}{2}$, například ^1H , ^{13}C , ^{15}N a ^{31}P , přitom většina prvků má alespoň jeden izotop, který má nenulový spin. S jaderným spinem je spojen magnetický dipolární moment μ pomocí gyromagnetického poměru γ , tento poměr je charakteristikou daného jádra.

$$\mu = \gamma I \quad (1)$$

Hodnota jaderného spinu I je vyjádřena pomocí spinového kvantového čísla I a redukované Planckovy konstanty $\hbar$:

$$|I| = \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (2)$$

Průmět jaderného spinu do osy z může nabývat $2n + 1$ hodnot:

$$I_z = \hbar m_I \quad (3)$$

kde magnetické kvantové číslo $m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$. Jádra se spinem $I > \frac{1}{2}$ nesou vedle magnetického dipólového momentu ještě elektrický kvadrupólový moment, jehož důsledkem je často značné rozšíření čar v NMR spektru ve srovnání se spektry jader se spinem $\frac{1}{2}$. Bližší informace o základních principech NMR viz [5], [6] nebo [7].

2.1.3. Interakce s externím magnetickým polem

Interakce působící na jaderný spin rozlišujeme na externí a interní. Externí interakce zahrnují vliv statického magnetického poli a dále působení na vzorek pomocí radiofrekvenčního elektromagnetického pole. V externím magnetickém poli dochází k magnetizaci souboru spinů vlivem Zeemanovy interakce. Energie magnetického dipólu za přítomnosti vnějšího magnetického pole B je dána vztahem:

$$E = -\mu B \quad (4)$$

Po vložení částice s magnetickým momentem do homogenního statického magnetického pole dojde vlivem interakce elektronů s magnetickým polem ke štěpení hladin energetického spektra v Zeemanův multiplet na $2I + 1$ ekvidistantních hladin s rozdílem energie:

$$\Delta E = \gamma \hbar B \quad (5)$$

Tento rozdíl je přímo úměrný velikosti statického magnetického pole.

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (6)$$

Frekvenci fotonu ν schopného vyvolat přechod mezi sousedními energetickými hladinami označujeme jako rezonanční frekvenci rovnice (6), v případě NMR leží tato frekvence v radiofrekvenční oblasti spektra elektromagnetického záření. Ve statickém magnetickém poli dochází k precesi spinu kolem osy externího magnetického pole, tuto precesi nazýváme Larmorova precese, její rychlost odpovídá rezonanční frekvenci. Úhlová rychlost precese je dána vztahem:

$$\omega = \gamma B \quad (7)$$

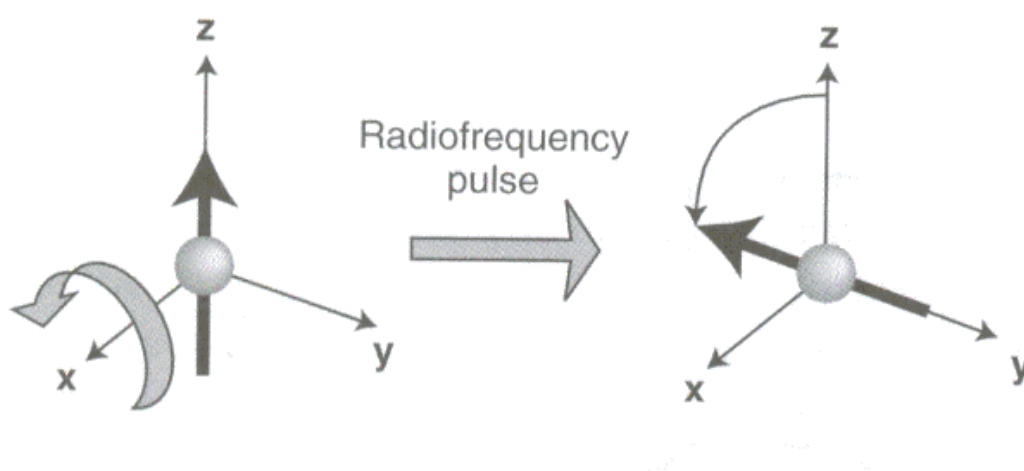
Rezonanční frekvence se též označuje jako Larmorova frekvence nebo frekvence Larmorovy precese.

S precesí spinu v magnetickém poli je spojena relaxace, proces návratu spinového systému po excitaci do rovnovážného stavu. Relaxaci můžeme fenomenologicky popsat pomocí Blochových rovnic, jejichž řešením jsou rovnice (8), (9). Pro longitudeální a transverzální rovinu průmětu vektoru magnetizace platí:

$$M_L(t) = M_z \cdot \left(1 - 2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right) \quad (8)$$

$$M_T(t) = M_T \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (9)$$

T_1 označuje podélnou relaxační dobu, označovanou také jako spin-mřížková relaxační doba. Spin-mřížková relaxační doba charakterizuje předávání energie excitovaných spinů okolí. T_2 označuje příčnou relaxační dobu, označovanou jako spin-spinová relaxační doba. Znalost relaxací je jedním ze základních požadavků pro měření.



Obr. 2.1: Znáznornění spinu precedujícího kolem vektoru magnetizace (vlevo) a překlopení precedujícího spinu pomocí $\frac{\pi}{2}$ pulzu (vpravo) [5]

2.1.4. Pulzní metody

Pulzní metody nahradily dříve používané metody kontinuální, které byly založeny na měření absorpce vzorku na rezonanční frekvenci. Základem pulzních metod jsou pulzní sekvence, které umožňují manipulaci se spinovými systémy pomocí pulzů kruhově polarizovaného záření na frekvenci Larmorovy precese. Pro stanovení parametrů excitačních pulzů využíváme pulzní řešení Blochových rovnic. Výsledkem použití pulzní sekvence je získání signálu volné precese (FID), který následně zpracujeme s pomocí Fourierovy transformace, kterou převedeme signál z časové domény do frekvenční. Pulzní sekvence se skládají z radiofrekvenčních pulzů, časových prodlev a pulzů gradientních polí. Mezi základní excitační pulzy patří $\frac{\pi}{2}$ pulz, který sklápí spin ze směru osy z do roviny xy kolmé na směr magnetického pole, a π pulz, který sklápí spin do antiparalelního směru. Časové prodlevy umožňují vývoj spinových interakcí a též uplatnění spinové relaxace. Pulzy gradientního pole umožňují měřit difuze částic ve vzorku a s jejich pomocí také můžeme ve spektru selektivně potlačit nechtěné signály.

2.1.5. Interní interakce

V NMR rozlišujeme čtyři základní interní interakce přímou dipól-dipólovou interakci, nepřímou dipól-dipólovou interakci, chemický posuv a kvadrupólovou interakci. V izotropním prostředí kde molekuly rychle mění orientaci, je možné pozorovat nepřímou dipól-dipólovou interakci a chemický posuv, zatímco přímá dipól-dipólová interakce společně s kvadrupólovou interakcí se vystředuje a ve spektru není již dále pozorovatelná. Kvadrupólová interakce se objevuje jen u jader se spinem $I > \frac{1}{2}$.

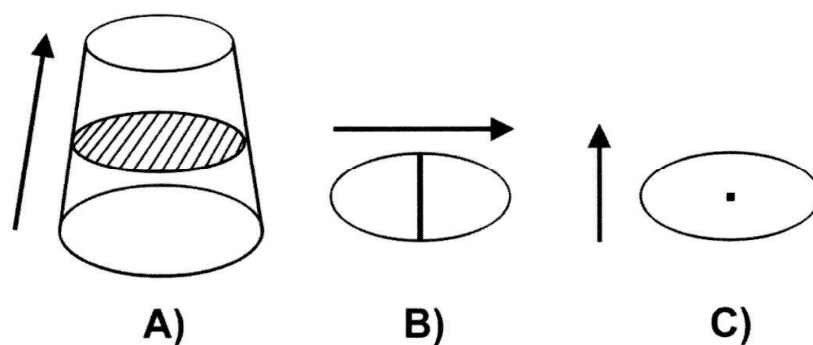
Přímá dipól-dipólová interakce vyjadřuje vazbu jader v prostoru, kterou lze v rámci klasické fyziky aproximovat vzájemným působením dvou tyčových magnetů. Stanovení jaderné dipól-dipólové interakce poskytuje možnosti pro určení struktury molekuly, protože její efektivní dosah je zhruba 0,8 nm a navíc je závislá na orientaci spojnice obou jader vůči externímu magnetickému poli. Dipolární interakce je přenesena přímo prostorem nezávisle na kovalentní struktuře molekuly. Dipolární interakce je nejdůležitější relaxační mechanismus ve spektrech diamagnetických roztoků, kde je tato interakce modulována náhodnými změnami orientace molekul, neboli Brownovým pohybem. Pomocí přímé dipól-dipólové interakce můžeme pozorovat rotační dynamiku molekul.

Nepřímá dipól-dipólová interakce se označuje také jako J-vazba, je zprostředkována vazebnými elektrony. Vede ke štěpení signálu ve spektru pozorovaného typu jádra na multiplet v závislosti na počtu jader spojených se sledovaným jádrem chemickými vazbami. Nejčastěji působí mezi jádry spojenými 1 až 3 chemickými vazbami. Pomocí J-vazby přes 3 chemické vazby a Karplusovy rovnice můžeme určit dihedrální úhel sevřený příslušnými chemickými vazbami. Velikost konstanty nepřímé dipól-dipólové interakce se uvádí v Hz, protože nezáleží na velikosti statického magnetického pole.

Rozlišení frekvencí různých jader téhož izotopu vázaných v různých místech molekuly způsobuje chemický posuv, který je důsledkem tzv. chemického stínění, které poskytuje informace o chemickém okolí, ve kterém se jádro nachází, prostřednictvím polarizace elektronů v obalu atomu. Chemický posuv se udává v ppm (parts per million). Bližší informace o základních interakcích v NMR viz [5], [6] nebo [7].

2.1.6. Zobrazování pomocí magnetické rezonance

Nejprogresivnější aplikací NMR je zobrazování makroskopických struktur v medicíně. Zobrazování pomocí magnetické rezonance (MRI) umožňuje neinvazivně diagnostikovat měkké tkáně. Principem MRI je prostorové zobrazování hustoty protonů ve tkáni s možností využití relaxačních dob T_1 a T_2 pro rozlišení tkání. Pro zobrazování magnetickou rezonancí je nutné využití gradientních magnetických polí (Obr. 2.2). Nejprve si vybereme vrstvu (A), ve které chceme signál snímat. Pro výběr vrstvy se použijeme při aplikaci selektivního excitačního pulzu lineární gradient magnetického pole G_z , budeme tak excitovat pouze řez o určité šířce. Pro získání informací z jednotlivých řezů se používá frekvenční a fázové kódování. Frekvenční kódování (B) se obvykle provádí v ose x aplikací gradientu magnetického pole G_x při snímání signálu. Působením gradientu budou jednotlivé spiny precedovat s mírně odlišnými frekvencemi v závislosti na ose x. Echo signál tak bude tvořen součtem harmonických signálů různých frekvencí, jejichž amplitudy budou odpovídat sumaci signálu od pixelů jednotlivých sloupců. Aplikace gradientu v ose y těsně po excitačním RF pulzu způsobí rozfázování jednotlivých spinů podél osy y (C). Sumační signál z daného sloupce tak bude vážen harmonickým signálem, jehož frekvence bude závislá na velikosti gradientu G_y . Naměřená data z MR tomografu tvoří takzvaný K-prostor. Dvojitou Fourierovou transformací získáme obrazy jednotlivých měřených vrstev. V souvislosti s MRI je také vhodné uvést několik omezení použití této metody. Problémy jsou zejména spojeny s nehomogenitou magnetického pole, která vzniká přítomností vzduchové mezery v dutině magnetu nebo přítomností kostí, například v oblasti pánve. Částečnou kompenzací problémů s nehomogenitou magnetického pole je použití povrchových popřípadě intrakavitálních cívek.



Obr. 2.2: Princip zobrazování pomocí MRI [8]

Pomocí MR tomografu můžeme při použití speciálních pulzních sekvencí získat spektroskopický signál in vivo vypovídající o výskytu látek v dané oblasti. Pomocí MRS můžeme získat spektroskopické informace z 1,5 až 4 cm³ tkáně, proto musí být měřené tkáně dostatečně velké a homogenní. Metabolity v daných tkáních navíc musí být v dostatečně izotropním prostředí, musí se volně v prostoru pohybovat, aby je vůbec bylo možno ve spektru pozorovat. Vhodnou tkání pro získání spektroskopického signálu je například sval nebo mozek. [9]

2.1.7. Residuální dipolární štěpení

I velmi malá preference orientace molekul vede ke vzniku reziduální dipolární vazby (RDC) v NMR spektru. Používá se zejména pro určení prostorové struktury biomolekul, protože jeho velikost souvisí se vzdáleností dvou interagujících jader a úhlem internukleárního vektoru vzhledem k orientaci vnějšího magnetického pole. Výhodou RDC je snadná detekce a vyhodnocení ze spektra NMR porovnáním spektra molekuly v izotropním prostředí a v orientujícím médium. Velikost dipolární vazby signálu v pevné látce je v řádu kHz. V izotropním roztoku se dipolární vazba vystředuje na nulu. Cílem měření pomocí RDC je získat z dipolární vazby v řádu kHz, vazbu v řádu Hz.

Reziduální dipolární štěpení využíváme zejména při určení prostorové struktury molekul. Pomocí RDC můžeme určit sekundární, terciární a případně i kvartérní strukturu makromolekul. RDC vzniká vlivem přímé dipól-dipólové interakce, která nám umožňuje změřit interakce jader až na vzdálenost 0,8 nm. Dalšími prostředky pro určování prostorové struktury jsou měření NOE (Nuclear Overhauser Effect), který nám umožňuje změřit interakci dvou jader, které jsou od sebe vzdáleny 0,6 nm, popřípadě měření nepřímé dipól-dipólové interakce, která má dosah pouze přes 3 chemické vazby. RDC lze také použít ke zjištění poměru enantiomérů ve vzorku, k tomuto účelu ovšem potřebujeme chirální orientující médium, jako je například želatina.

Velikost RDC ve spektru $\langle D \rangle$ lze určit ze vztahu (10) z celkové konstanty štěpení T , od které odečteme velikost štěpení vlivem nepřímé dipól-dipólové interakce J , pokud se ve spektru objevuje. Existuje možnost využití numerické simulace RDC k určení prostorové struktury molekuly například pomocí programu PALES [10].

$$T = J + 2 \cdot \langle D \rangle \quad (10)$$

$$D_{IS} = -\frac{\hbar \gamma_I \gamma_S \mu_0}{16 \pi^2} \left\langle \frac{1}{2 r_{IS}^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \right\rangle \quad (11)$$

$$D_{II} = -\frac{3 \hbar \gamma^2 \mu_0}{2 \cdot 16 \pi^2} \left\langle \frac{1}{2 r_{II}^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \right\rangle \quad (12)$$

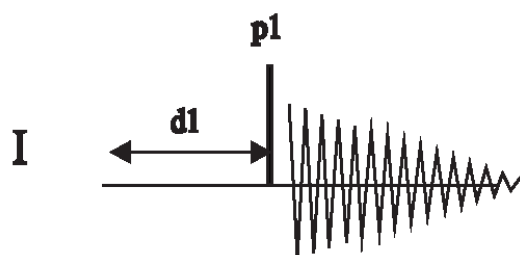
Rozlišujeme dva typy RDC, heteronukleární a homonukleární. Heteronukleární štěpení D_{IS} je mezi dvěma odlišnými jádry viz vztah (11), kde γ_1 a γ_2 jsou příslušné gyromagnetické poměry, μ_0 je permeabilita vakua, $\hbar$ je redukovaná Planckova konstanta, r_{IS} je vzdálenost jader, θ je úhel mezi internukleárním vektorem a osou externího magnetického pole a závorka $\langle \rangle$ odpovídá středování přes všechny možné orientace. Pro měření heteronukleárního dipolárního štěpení se většinou využívá přenos magnetizace, kdy pomocí excitace jader ^1H a snímání spektra jader ^{13}C můžeme získat daleko silnější signál jader ^{13}C dle poměru gyromagnetických konstant. V případě heteronukleární RDC dvou přímo vázaných jader je možné použití znalost velikosti vzdálenosti chemické vazby. Pro měření heteronukleárního štěpení používáme například pulzní techniku HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation) nebo HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation).

Druhým typem měření je homonukleární RDC D_{II} dle vztahu (12), kterou pozorujeme mezi jádry stejného typu. Příkladem je využití RDC mezi geminálními vodíky. Další informace o RDC lze nalézt v [11], [12], [13] nebo [14].

2.1.8. Použité pulzní sekvence

Pro měření homonukleárního RDC lze použít $\frac{\pi}{2}$ pulz s následným zpracováním signálu volné precese dle Obr. 2.3, kde I označuje kanál naladěný na frekvenci příslušného jádra, $p1$ označuje délku pulzu a $d1$ označuje časovou prodlevu mezi jednotlivými opakováními pulzní sekvence v souvislosti s relaxačními dobami. Délku $\frac{\pi}{2}$ pulz lze experimentálně určit před každým měřením. V případě kdy použijeme nedeuterované rozpouštědlo, bude ve spektru signál rozpouštědla zcela dominantní, potřebujeme proto tento signál co nejvíce potlačit. Pro tento účel lze použít blok určený k potlačení vody v ^1H spektru vzorku (takzvaný WATERGATE), který používá sekvenci DPFGE pro selektivní inverzi. V následujícím odstavci jsem pouze stručně shrnul popis použitých sekvencí pro potlačení signálu rozpouštědla, podrobnější informace o pulzních sekvencích lze nalézt v [15].

Sekvence WATERGATE (WATER supression by GrAdient Tailored Excitation) využívá selektivních pulzů a pulzů gradientních polí k potlačení signálu v oblasti spektra, kde se nachází signálu z protonů vody. Sekvence Water Supression by Excitation Sculpting (Obr. 2.4). Tato sekvence bývá také označována jako DPFGESE (Double Pulse Field Gradient Spin Echo), která zajišťuje inverzi signálů ve spektru, které chceme zachovat. I označuje kanál naladěný na frekvenci daného jádra, G_z označuje použití gradientních pulzů, $d1$ je délka doby mezi jednotlivými opakováními pulzní sekvence, δ označuje časovou prodlevu u selektivních pulzů. Vlastní selektivní pulz je tvořen binomickou pulzní sekvencí, která se skládá z pulzů určených k excitaci celého spektra, kromě oblasti definovaného chemického posuvu, která je určena prodlevou mezi jednotlivými pulzy binomické sekvence. $G1$ a $G2$ jsou dva pulzní gradienty sinusového tvaru s délkou trvání 1 ms, které způsobí rozfázování spinů v daném selektivním výběru.



Obr. 2.3: Pulzní sekvence $\frac{\pi}{2}$ pulzu [16]



Obr. 2.4: Pulzní sekvence DPFGESE [16]

2.2. Orientující média

2.2.1. Obecně o orientujících médiích

K vytvoření částečné orientace molekul je potřebné zvolit vhodné orientující médium. Používají se především tři metody, orientace pomocí kapalných krystalů, orientace pomocí stlačených gelů a orientace pomocí paramagnetických iontů. Orientující médium má vytvářet částečnou orientaci molekul ve vzorku pomocí omezení pohyblivosti molekul v určitém směru. Orientující médium by v zásadě nemělo specificky interagovat s pozorovanou molekulou. Ve spektru je signál z orientujícího média nechtěná informace, která se může překrývat se sledovaným signálem. Pro speciální účely se dají použít deuterovaná orientující média, jejich výroba je ovšem značně nákladná. V následujících podkapitolách se budeme blíže zabývat charakteristikou orientace molekul pomocí kapalných krystalů a stlačených gelů, metoda orientace pomocí paramagnetických iontů není příliš výhodná, protože dochází ke značnému rozšíření signálu v důsledku paramagnetické relaxace. Pomocí částečné orientace a tím vytvoření anizotropního prostředí můžeme pozorování přímou dipól-dipólovou interakci a kvadrupólovou interakce, které by se jinak ve spektru vystředovaly. Literatura viz [12], [13] nebo [17].

2.2.2. Kapaln  krystaly

Kapaln  krystaly vyu ivaj  k vytvoření orientovan  f ze závislost uspořádání molekul na změně teploty nebo zm n  koncentrace. V p r pad  závislosti na teplotě jde o termotropn  kapaln  krystaly, při závislosti na koncentraci jde o lyotropní kapaln  krystaly. U kapalných krystalů se vyu iv  vytvoření siln  orientovan  nematické f ze lyotropn ch kapalných krystalů nebo přechodů do této fáze, kter  mohou poskytovat částečnou orientaci molekul. Díky vysokému stupni orientace dochází k velkému št pen  signálu v řádu až několik kHz. P r prava orientujícího média z kapalných krystalů trvá pouze několik hodin. Nevýhodou kapalných krystalů je nemožnost získání   ste n  orientace v řádu Hz, protože minim ln  pot ebn  koncentrace kapalných krystalů pro vytvoření   ste n  orientace ve vzorku vytvoří siln  orientovanou strukturu. Další informace o orientujících médiích typu kapalných krystalů viz [18].



Obr. 2.5: Představa smectick  A a C (vlevo) a nematické f ze (vpravo) kapalných krystalů [19]

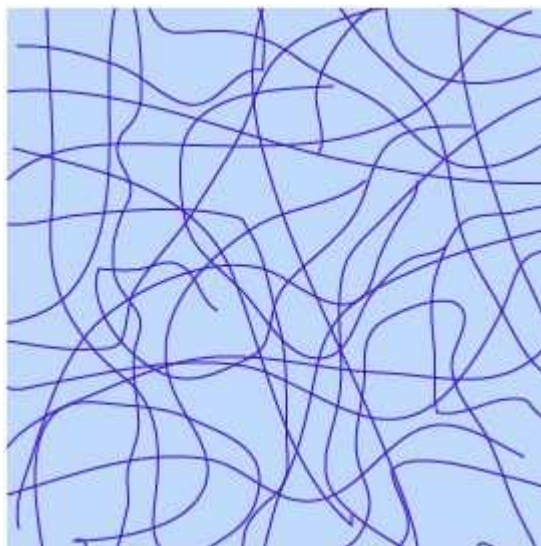
2.2.3. Metoda stačeného polymerového gelu

Tato metoda je také známa pod zkratkou SAG (Strain-induced Alignment in Gel). V zásadě jde o vytvoření orientujícího média pomocí stlačení homogenního gelu s póry. Póry si lze představit jako prostory v síti gelu, do kterých se dostane zásobní roztok s rozpuštěnou sledovanou látkou. Pro představu je na Obr. 2.6 je zobrazena síť gelu, kde dochází k vytvoření vazeb mezi jednotlivými řetězci pomocí síťování gelu, popřípadě vznikají volné konce. V současné době se používají dva způsoby stlačení gelu, nejčastěji se používá radiální stlačení pomocí umístění gelu většího průměru do kyvety, druhou metodou je stlačení gelu v kyvetě pomocí pístu. V obou případech jde o stlačení gelu pomocí mechanické síly. Základní myšlenkou této metody je vytvoření eliptických pórů pomocí stlačení původně kulovitých pórů. Existuje několik typů gelů, které se používají jako orientační média, každý gel má své určité specifikace a rozpouštědla pro dané použití. Metoda stačeného gelu je používána ke snížení velikosti přímé dipól-dipólové interakce z řádu kHz na velikost několika Hz. Pro účely dosažení částečné orientace malých molekul jsem použil polyarkylamidový gel.

U gelů je několik parametrů ovlivňující vytvoření částečné orientace, konkrétně jde o hmotnostní zlomek akrylamidu v gelu, množství síťovadla v gelu, míru stlačení gelu v kyvetě, použité rozpouštědlo, koncentraci sledované látky a velikost zkoumané molekuly. Hmotnostní zlomek akrylamidu gelu společně s množstvím síťovadla určuje velikost kulovitých pórů v gelu, zatímco tlak, respektive změna poloměru vytvořeného gelu určuje, do jaké míry jsou jednotlivé póry eliptické, tedy jak budou ovlivňovat částečnou orientaci rozpuštěné molekuly. Určení přibližné velikosti pórů v gelu umožní zjistit optimální parametry přípravy gelu v závislosti na látce, kterou chceme orientovat. Měření velikosti pórů lze provést pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Přehled poznatků o vlastnostech gelu a parametrech je zpracován například v [20].

Hlavní výhodou gelů jako orientujících médií je možnost získání slabé částečné orientace molekul v gelu. Pokud máme pouze slabou částečnou orientaci velikost pozorované RDC by měla být v řádu Hz. Hlavním problémem gelů je časová náročnost přípravy tohoto orientujícího média. Zatímco vzorek z kapalných krystalů lze připravit do několika hodin, gel se připravuje několik dní. Příprava gelu začíná smícháním chemikálií potřebných pro přípravu, hned poté následuje polymerizace. Dalším krokem je čištění gelu od nezreagovaných chemikálií, kde dojde k difuzi volných částí z gelu. Po čištění následuje sušení, kdy se z gelu odstraňuje nepotřebná voda, aby se po optimálním

vyschnutí mohl ke gelu přidat zásobní roztok zkoumané molekuly. Poslední a nejvíce na čas náročnou fází je nasáknutí zásobního roztoku a vytvoření rovnováhy v gelu. Gely samotné jsou předmětem výzkumu. Další informace lze získat v [11], [12], [20], [21], [22].

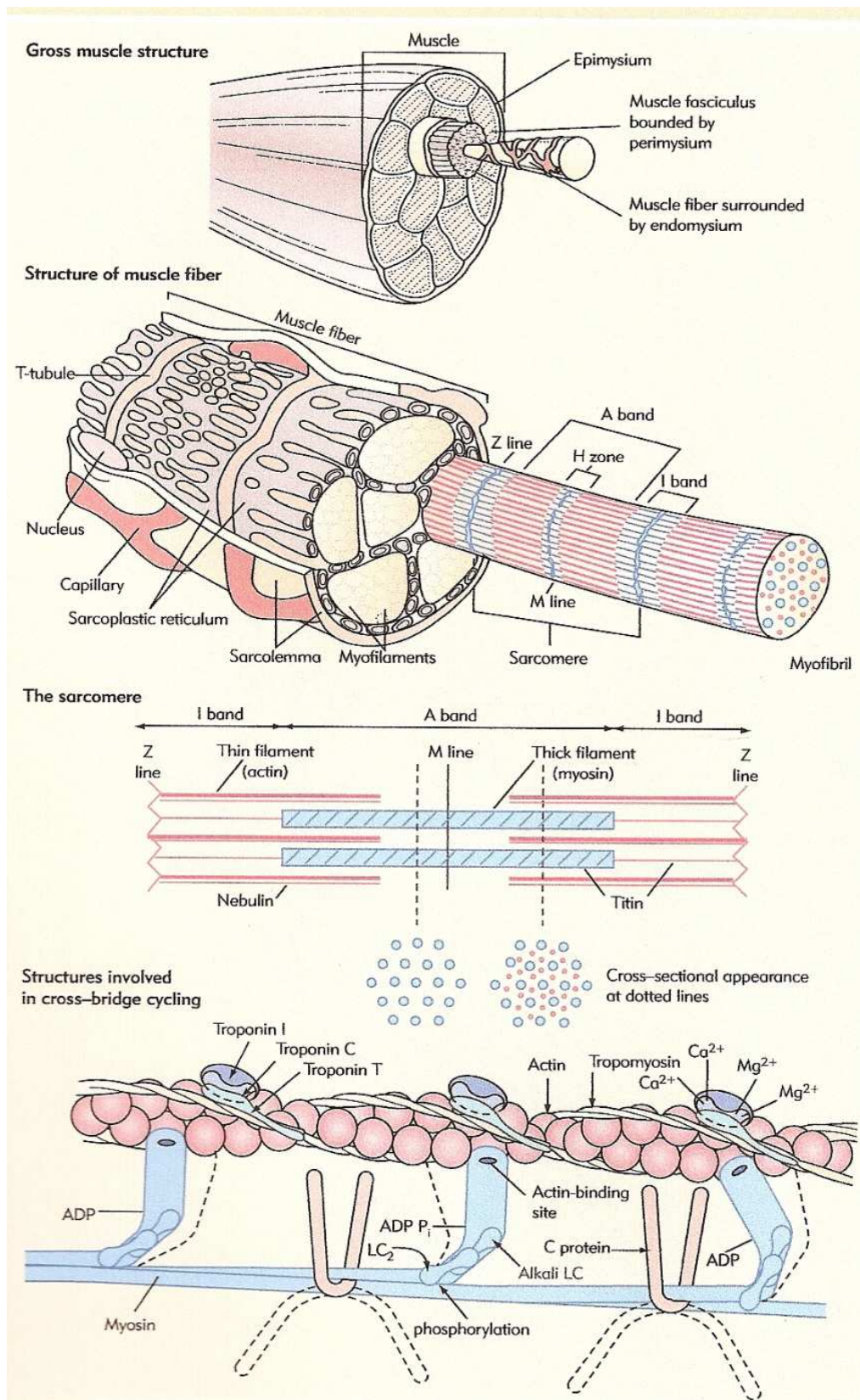


Obr. 2.6: Znárodnění síť polymerového gelu [23]

2.3. Informace o svalu a metabolitech

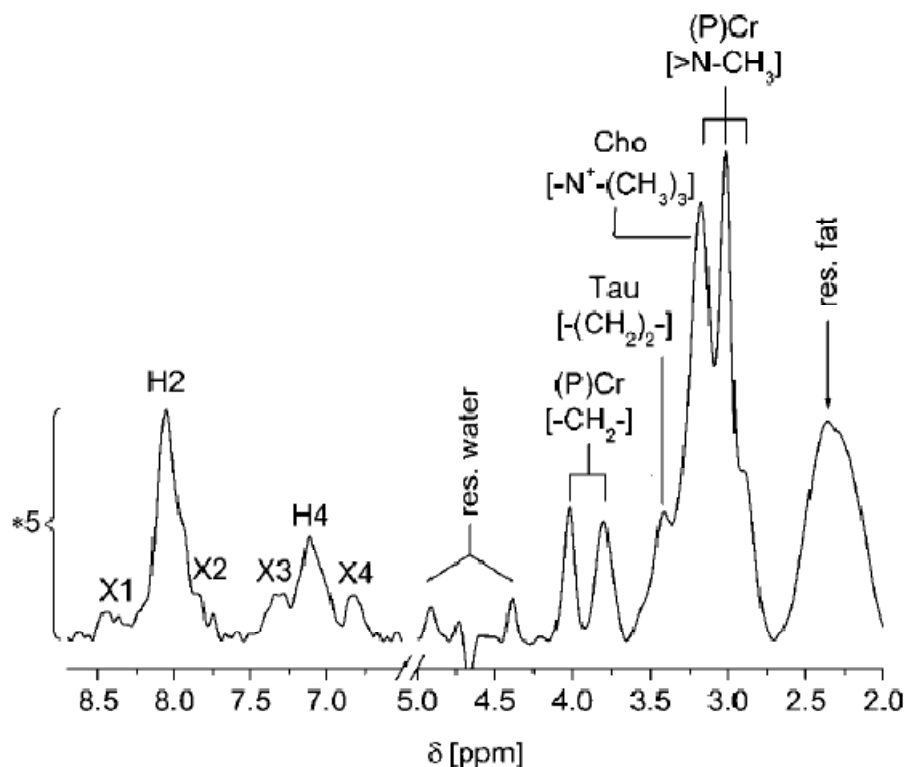
2.3.1. Svalová tkáň

Svalová tkáň je tvořena jednotlivými svalovými vlákny. Svalové vlákno je mnohoaderné soubuní o průměru 0,01 až 0,1 mm a délce 1 mm až několik centimetrů. Základní strukturu svalové buňky tvoří vlákna aktinu a myozinu, které se nacházejí ve svazcích, označovaných jako myofibrily. Svalová tkáň je charakterizována vysokým stupněm kompartmentace, dochází k vytvoření makroskopické struktury složené z jednotlivých mikroskopických vláken viz Obr. 2.7. Základní funkcí svalového vlákna je kontrakce na základě nervového podnětu. Buňky svalu jsou plně přizpůsobeny k přeměně energie chemických vazeb na energii mechanickou.



Obr. 2.7: Struktura svalů [24]

2.3.2. MRS spektrum svalu



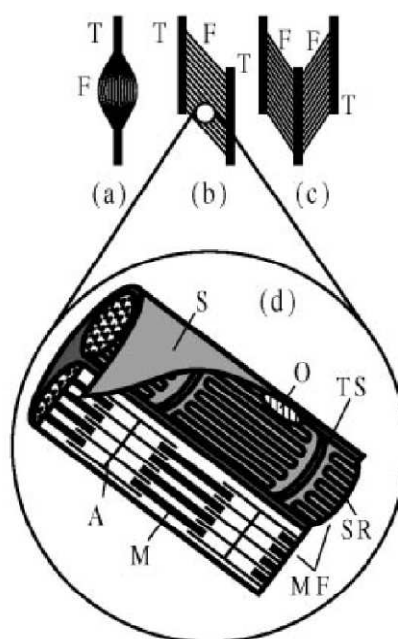
Obr. 2.8: Spektrum ^1H MRS kosterního svalu [25]

In vivo MR spektroskopické měření umožňuje neinvazivně získat diagnostická data vypovídající o zastoupení určitých metabolitů ve svalové tkáni. Pomocí MRS můžeme získat spektra ^1H , ^{31}P nebo ^{13}C .

Ve spektru ^1H MRS lze pozorovat signály kreatinu, taurinu, trimethylamonia, laktátu, cholinu, aromatických protonů karnosinu a signál tuků. Ve spektru je rezonance CH_2 skupiny kreatinu na $\delta = 3,93$ ppm a CH_3 skupiny na $\delta = 3,0$ ppm. Signál taurinu na $\delta = 3,45$ ppm. Trimethylamonium má signál na $\delta = 3,2$ ppm. Signál cholinu na $\delta = 3,2$ ppm. Karnosin má signál na $\delta = 7$ ppm a $\delta = 8$ ppm. Ve spektru ^1H MRS je možné pozorovat dva druhy lipidů, extramyocelulární lipidy (EMCL) a intramyocelulární lipidy (IMCL). Extramyocelulární lipidy (EMCL) vytváří makroskopické pláty podél svalových vláken, zatímco intramyocelulární lipidy (IMCL) vytváří malé kapičky v cytoplazmě. Tento efekt vede k různé susceptibilitě tuků a k možnosti oddělení signálů EMCL a IMCL.

U píků některých metabolitů dochází ke štěpení nad rámec běžné J-vazby. Toto dodatkové štěpení bylo identifikováno jako reziduální dipolární vazba v důsledku nedokonalého vystředování přímé dipól-dipólové interakce mezi vodíky blízkými v prostoru. Tento efekt je patrný v signálu některých metabolitů, například kreatinu, karnosinu, laktátu, taurinu, TMA (trimethylamonium) a dalších. Obecně se uvažují tři základní teorie projevu RDC ve svalu. První je orientace molekul podle aktinových a myozinových vláken, druhá je částečná orientace navázáním molekul na makromolekuly, které jsou rozmístěny ve svalové buňce, a třetí teorie vysvětluje částečnou orientaci jako vazbu s molekulami trvale zakotvenými ve struktuře, která má pohyblivé řetězce.

Bylo zjištěno, že pozorovaný RDC poskytuje informace o prostorové orientaci svalových vláken vzhledem k externímu magnetickému poli. Rozlišujeme několik uspořádání svalů dle orientace osy svalu a orientace svalových vláken, která tento sval vytvářejí. Úhel osy svalu a svalových vláken se označuje jako „pennation“ úhel. Svazky svalových vláken mohou být orientovány shodně se svalem („fusiform“) nebo pod určitým „pennation“ úhlem mezi osou svalu a jednotlivými vlákny („unipennate“ popřípadě „bipennate“). Jednotlivá uspořádání jsou uvedena na Obr. 2.9. Při pozorováních je důležité počítat s tímto úhlem, protože se RDC projevuje ve směru svalových vláken. Studie se zatím především zaměřují na dostatečně velké svaly s jednoduše určitelnou orientací, příkladem je lýtkový sval. Dle měření spekter a difuzí společně s poznatky z anatomie se předpokládá, že molekuly metabolitů jsou v prostorově orientovaných makromolekulárních strukturách, jako jsou například vlákna aktinu a myozinu, nebo sarkoplazmatické retikulum, popřípadě mitochondrie.



Obr. 2,9: Struktura svalového vlákna a možná uspořádání svalů [26]

2.3.3. Informace o kreatinu

Kreatin slouží v podobě fosfokreatinu jako zásobárna energie pro svaly, jeho funkcí je při nedostatku energie ve formě ATP rozpad na kreatin a fosfát, který se váže na ADP za vzniku ATP. Kreatin na sebe ve vodném prostředí navazuje molekulu vody za vzniku kreatinmonohydrátu. Signál kreatin byl identifikován v NMR spektru pomocí studie, kdy byl v čisté formě pravidelně podáván dobrovolníkům ústy a následně bylo ve spektru magnetické rezonance zjištěno navýšení signálu [27]. Kreatin společně s fosfokreatinem a kreatinkinázou jsou intenzivně zkoumány, vzhledem k jejich působení v metabolických drahách.

V ^1H spektru pozorujeme rezonance CH_2 skupiny kreatinu na $\delta = 3,93$ ppm a CH_3 skupiny na $\delta = 3,0$ ppm (Obr. 2.11). Ve studii [28], [29] je doloženo, že signál CH_2 se během cvičení vytrácí, proto se nejspíše jedná o fosfokreatin, který ve svalu mizí vlivem spotřeby energie. Vzhled CH_2 a CH_3 skupin ve spektru se mění s cvičením. Zátěž vede k poklesu signálu CH_2 a změně v signálu CH_3 . Potvrzuje se, že signál CH_2 představuje vázaný fosfokreatin a signál CH_3 je celkový součet kreatinu a fosfokreatinu. Difúzně vážená ^{31}P NMR spektroskopie ukazuje omezenou difuzi fosfokreatinu, z čehož můžeme vyvodit, že se fosfokreatin nepohybuje volně ve svalové buňce, popřípadě alespoň že se

v části buňky nevyskytuje. Omezená rotace může vysvětlit rozdíly ve viditelnosti kreatinu a fosfokreatinu.

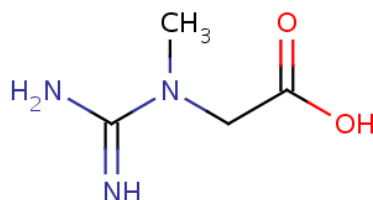
Existují tři výklady pozorované reziduální dipolární vazby. Prvním je prostorové omezení, molekuly mohou být umístěny v malých protáhlých prostorech mezi aktinovými a myozinovými vlákny, v sarkoplasmatickém retikulu nebo mitochondriích. Další možností je dočasná vazba na makromolekuly, které jsou přesně umístěny ve svalové buňce. Velice pravděpodobná je vazba na polární části molekul. Třetí možností by byla vazba na kreatinkinázu. Nejvíce pravděpodobným vysvětlením zůstává vytvoření hydratační sféry kreatinu a fosfokreatinu, které jsou natolik velké, aby byly ovlivněny prostorovým omezením biologických struktur.

Transfer magnetizace [31] a [32] dokazuje, že ve svalu jsou protony vody pohybově omezené, vyměňují se s volným kreatinem, což představuje důkaz solvatačního obalu kreatinu. Omezený pohyb kreatinu je důležitý pro odhad množství ADP z ^{31}P spektra. Přídavné efekty magnetizačního transferu mohou upravit intenzitu signálu kreatinu v ^1H spektru. Při potlačení signálu vody může dojít k transferu magnetizace, který může vyvolat pokles intenzity signálu kreatinu v závislosti na použité sekvenci.

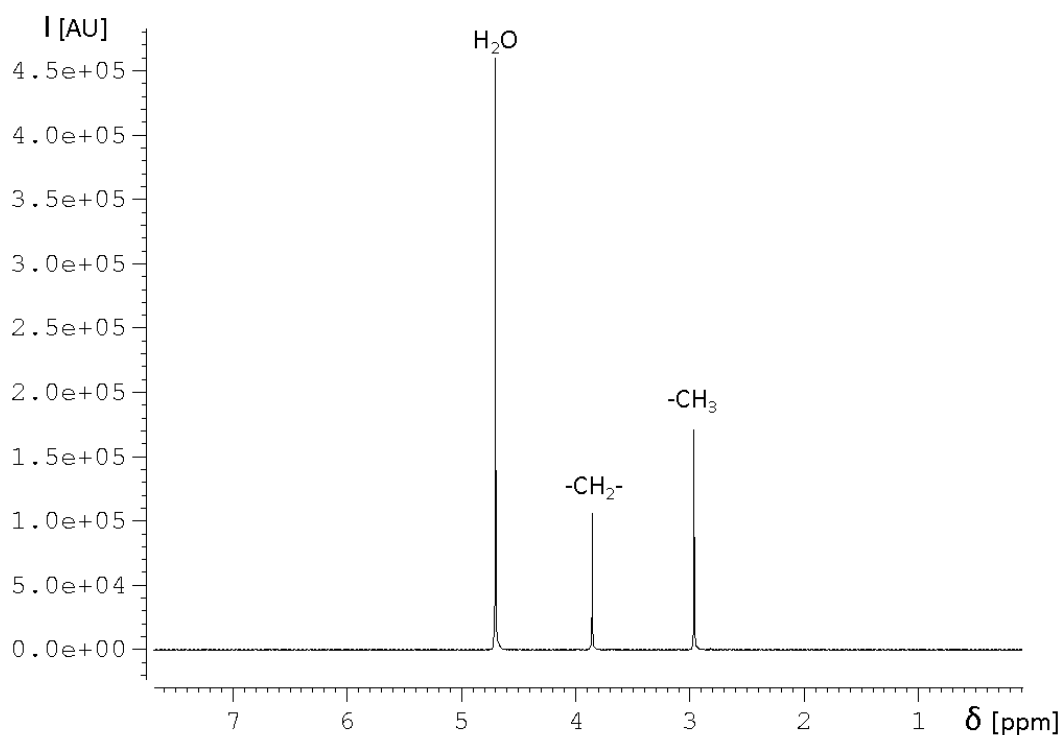
Důležité poznatky poskytly postmortální studie spektra svalu laboratorních zvířat [33] a [34]. Studie sledovaly pokles signálu CH_2 kreatinu ve spektru ^1H a ^{31}P . Signál v obou spektrech klesal přibližně stejně, což dokazuje, že signál CH_2 skupiny je tvořen pouze fosfokreatinem vázaným v určité oblasti. Z postmortální studie na laboratorních zvířatech vyplývá, že CH_2 vidíme jako dublet a vymizení tohoto dubletu trvá přibližně dvě hodiny.

Dle studií [30], [34] se ukazuje, že vazba ke kreatinkináze není hlavním faktorem vytvoření reziduální dipolární vazby. Výsledkem této studie byl fakt, že potkan s přírodní kreatinkinázou a potkan s deficiencí kreatinkinázy nemají zásadní pozorovatelné změny v RDC molekul kreatinu, odpustilo se tedy od teorie, která vysvětlovala pozorovanou RDC jako navázání kreatinu na makromolekulu kreatinkinázy. I když kreatinkináza nemusí být jedinou molekulou sloužící pro transport fosfokreatinu.

Molekula kreatinu je zobrazena na Obr. 2.10. Spektrum zásobního kreatinu s popisem signálů je uvedeno na Obr. 2.11, ve spektru je patrný signál CH_3 a CH_2 skupin kreatinu v obohacené vodě. Hodnoty disociačních konstant pro kreatin jsou $\text{pK}_1 = 2,63$ a $\text{pK}_2 = 14,3$. [35]



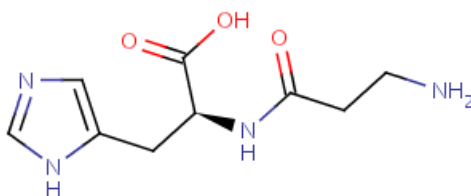
Obr. 2.10: Molekula kreatinu [36]



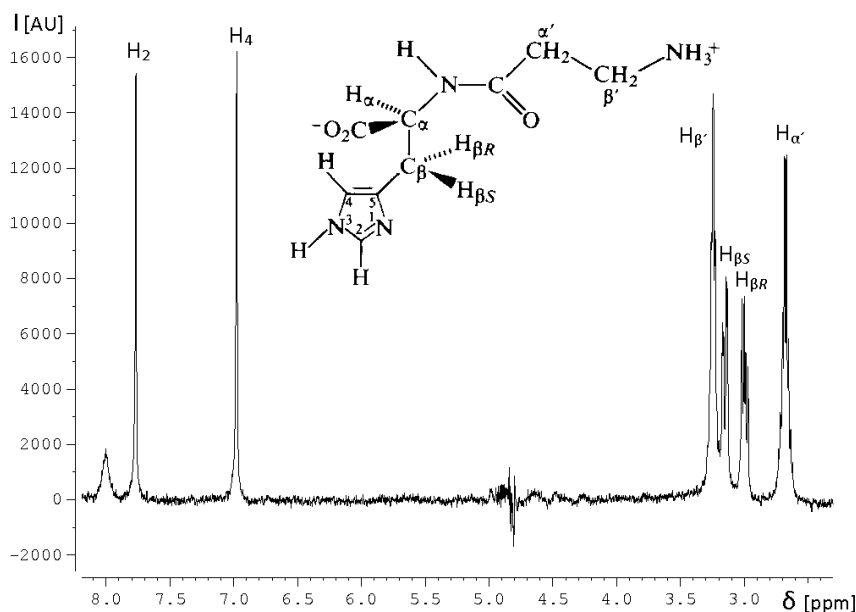
Obr. 2.11: ^1H NMR spektrum kreatinu a přiřazení píků ve spektru kreatinu dle [25]

2.3.4. Informace o karnosinu

Karnosin je dipeptid z L-histidinu a β -alaninu. Jeho funkce ve svazech dosud není plně objasněna. Intenzivně se zkoumá úloha karnosinu jako bufferu intracelulárního pH. Koncentrace karnosinu ve svalu závisí na fyzické kondici jedince, atleti dosahují hodnot až 4,8 mmol/l, zatímco netréňovaní jedinci dosahují koncentrace až 3,3 mmol/l. Přibližné hodnoty disociačních konstant karnosinu $pK_1 = 2,73$, $pK_2 = 7,06$ a $pK_3 = 10,55$ při 298 K. Na Obr. 2.11 je zobrazena molekula karnosinu a na Obr. 2.12 je zobrazeno spektrum roztoku karnosinu s přiřazením jednotlivých signálů. Více informací viz. [37] a [38].



Obr. 2.11: Molekula karnosinu [36]



Obr. 2.12: Přiřazení píků v ^1H spektru zásobního roztoku karnosinu dle [37]

3. Experimentální část

3.1. Měření pomocí nukleární magnetické rezonance

3.1.1. Popis spektrometru

Spektra jsem naměřil na spektrometru NMR Avance 500 firmy Bruker (Rheinstetten, Německo). Nastavení měření a zpracování spekter se provádí v programu Topspin v. 1.3 dodávaném k tomuto spektrometru. Údaj 500 v názvu NMR spektrometru udává rezonanční frekvenci protonů, která je 500,13 MHz, která odpovídá velikosti magnetické indukce pole 11,7 T. Spektrometr je sestaven z magnetu, konzole a počítače s ovládacím softwarem. Magnet je válcová nádoba, ve které je supravodivý solenoid ponořený v kapalném heliu. Středem válce vede průchozí dutina, do které se umísťují vzorky. Aby se helium nemuselo často dolévat je magnet obklopen několika vrstvami izolace a vanou kapalného dusíku. Do průchozí dutiny se vzorky vkládají shora a ve spodní části jsou umístěny shimovací cívky a měřicí sonda. Při nastavování experimentu je nutné dbát na správné nastavení útlumu, aby nedošlo k poškození sondy. Konzole obsahuje elektroniku pro vytvoření excitačních pulzů a následné zpracování získaných dat. Externí počítač s programem Topspin je určen pro nastavení a spuštění experimentu a zpracování naměřeného signálu.

3.1.2. Popis přípravy k měření

Kyveta pro měření kapalných vzorků je skleněná trubička o vnějším průměru 5 mm, do které se běžně umístí 500 až 600 μ l roztoku. Pro měření RDC vzorku byly použity speciální kyvety umožňující radiální stlačení vzorku ve formě válečku hydrogelu. Hydrogel musí být umístěn ve středu měřicí cívky, jinak dochází ke vzniku nehomogenity magnetického pole v místě vzorku, protože v případě kyvety s gelem se může na koncích gelu vytvořit prostor se zásobním roztokem, který má jiný signál ve spektru než roztok v gelu, a také se mohou vytvořit vzduchové bubliny, které vytvářejí již značnou nehomogenitu magnetického pole v místě vzorku.

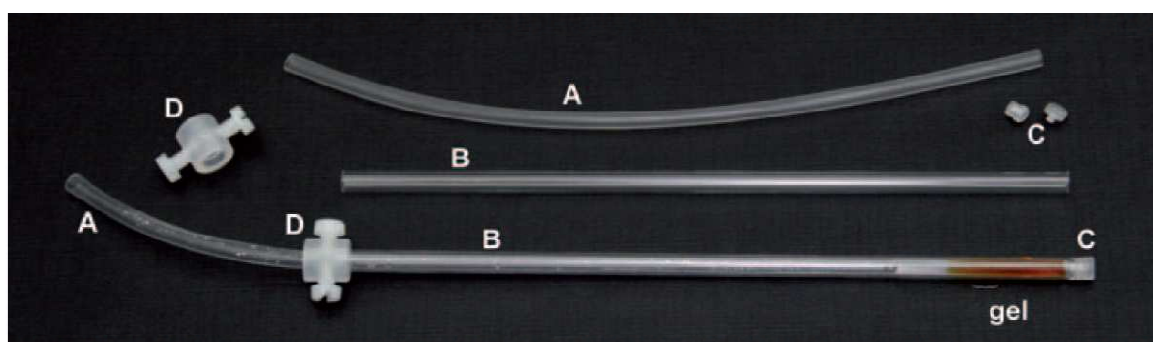
Nejdříve jsem měřil spektra ^1H , následně jsem měřil i spektra ^2H , v souvislosti s možností určení residuální kvadrupolární vazby v signálu deuteria, kdy dochází k částečné orientaci těžké vody [39]. Všechna spektra jsem naměřil při teplotě 298 K. V následující části je popsáno nastavení základních parametrů pro měření. Pro jádra ^1H jsem používal délku pulzu 13,4 μs při útlumu 5 dB. Pro ^2H jsem používal délku pulzu 50 μs při útlumu 15 dB, kvůli způsobu měření signálu pomocí kanálu sondy určeného pro signál locku deuteria. Měření ^1H spektra probíhala na 2 skeny, měření ^2H spektra probíhala na 1 sken. Šířka snímaného spektra pro ^1H spektrum byla 14 ppm, neboli 7002 Hz. Pro spektrum ^2H jsem nastavil šířku spektra 10 ppm, neboli 766 Hz. Počet datových bodů byl pro spektra ^1H 16384 bodů a pro spektra ^2H 4096 bodů.

RDC v ^1H spektru by mohl být měřen pomocí základní sekvence složené z $\frac{\pi}{2}$ pulzu a detekce signálu. Nejvýraznějším signálem ve spektru by byl signál vody, proto jsem použil pulzní sekvenci doplněnou blokem pro potlačení vody (WATERGATE v kombinaci s DPFGE selektivní inverzí signálu vody). Selektivní pulzní sekvence se skládá z pulzů délek v poměru k použitému excitačnímu pulzu $p1 = 13,4 \mu\text{s}$ a časovou prodlevou mezi jednotlivými pulzy nastavenou k potlačení signálu ve spektru na chemickém posuvu $\delta = 4,691 \text{ ppm}$. Výkon byl nastaven stejně jako u excitačního $\frac{\pi}{2}$ pulzu. Pro měření residuální kvadrupolární vazby projevující se jako štěpení v ^2H spektru jsem použil základní sekvenci s jedním $\frac{\pi}{2}$ pulzem. Bližší informace jsou uvedeny v kapitole 2.1.8.

3.2. Příprava vzorků

3.2.1. Metoda natahovací hadičky

Hlavním prvkem této metody je použití natahovací hadičky, ve které je umístěn vzorek. Experimentální sada s natahovací silikonovou hadičkou byla získána od Prof. Burkharda Luye z TU Mnichov, který později s autorským kolektivem vydal článek popisující použití této sady [12]. Sada je obdobná jako na Obr. 3.1, skládá se ze silikonové hadičky (A), otevřené kyvety (B), zátky na umístění hadičky do kyvety (C) a uzávěru (D), kterým lze měnit délku silikonové hadičky. Sada umožňuje měnit radiální stlačení gelu pomocí natahování silikonové hadičky, proto můžeme použít jeden vzorek na měření několika různých stlačení gelu.

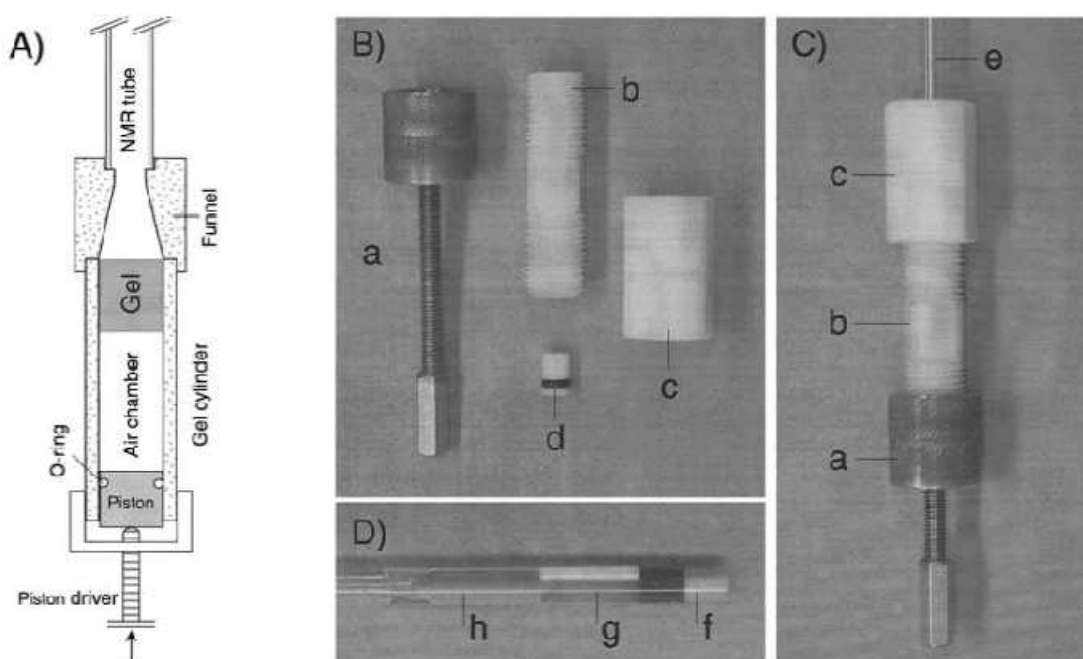


Obr. 3.1: Sada silikonové hadičky na přípravu gelu [12]

Pro přípravu vhodného gelu pro umístění do silikonové hadičky jsem si nechal zhotovit formu z teflonového válce, do kterého byla vyvrtána průchozí díra o průměru 3 mm. Vycházel jsem z předpokladu, že rozměr gelu po opětovném nasáknutí bude stejný nebo větší než při polymerizaci, což je přibližně stejně jako při nenatažené silikonové hadičce v kyvetě. Komplikace s přípravou gelu se objevily již při umísťování roztoku chemikálií do formy. Nejlepším způsobem se ukázalo dostat roztok chemikálií do formy pomocí jehly a stříkačky. Jehla se zavedla nad dno formy a obsah stříkačky jsem přesunul do formy, tak, aby nedocházelo ke vzniku vzduchových bublin, které by gel neměl obsahovat. Bubliny způsobují značnou nehomogenitu magnetického pole při měření. K formě jsem samozřejmě nechal vyrobit i píst, používaný k vytlačení gelu, o odpovídajícím průměru. Vysušený gel jsem následně společně se zásobním roztokem umístil do silikonové hadičky a zazátkoval.

3.2.2. Metoda dle Baxe

Pro přípravu gelu pomocí metody dle Baxe a kol. [40] jsem použil komerčně dostupnou sadu od společnosti NEW ERA [41]. Tato sada je zobrazena na Obr. 3.2, v části A je znázorněn schematický nákres, v části B a C jsou fotografie rozložené a složené sady na přípravu gelu a v části D je fotografie připraveného vzorku. Zobrazené součásti jsou nástavec pro posun pístu (a), forma na gel (b), trychtýř (c), píst s těsnícím kroužkem (d), otevřená NMR kyveta (e), koncová zátka do NMR kyvety (f), stlačený gel (g) a táhlo pro manipulaci s gelem (h). Hlavním rozdílem oproti předchozí metodě je umístění vysušeného gelu zpět do formy určené k polymerizaci a následovné umístění již nasáklého gelu do otevřené kyvety o vnitřním průměru 4,2 mm pomocí trychtýře a pístu. Měl jsem k dispozici dva typy forem, první měla vnitřní průměr 5,5 mm a druhá 6 mm. Pro vytvoření vzorků k měření závislosti velikosti residuálního dipolárního štěpení na koncentraci akrylamidu v gelu jsem používal formu o průměru 6 mm, ve které by měl pozorovaný RDC být větší než v případě formy o průměru 5,5 mm.



Obr. 3.2: Sada na přípravu gelu metodou dle Baxe [38]

3.2.3. Příprava gelu

Základem gelu je akrylamid, jehož hmotnostní zlomek určuje základní vlastnosti gelu. K akrylamidu se následně přidá ve vhodném molárním poměru bisakrylamid (N,N'-methylenbisakrylamid), který vytváří při polymerizaci síťování gelu za pomoci APS (Peroxidisíran amonný) a TEMEDu (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin), dvou chemikálií zodpovědných za polymerizaci. APS je zdrojem volných radikálů a TEMED zde funguje jako katalyzátor, polymerizace začíná až po přidání TEMEDu do roztoku chemikálií, proto se vždy přidává jako poslední těsně před umístěním roztoku do formy. Seznam použitých chemikálií je uveden v Tab. 3.1. Při manipulaci je nutné dodržovat bezpečnostní předpisy a pokyny pro práci s nebezpečnými látkami. Akrylamid a bisakrylamid jsou vysoce toxické krystalické látky, se kterými je vhodné zacházet pouze s použitím ochranných rukavic a pláště. TEMED je toxická velmi těkavá látka. APS je krystalická dráždivá látka. Kreatin, karnosin, taurin a myo-Inositol jsou netoxické krystalické látky. Ukázkové hodnoty pro přípravu gelu s hmotnostním zlomkem akrylamidu 5 % a poměrem síťování 50:1 jsou uvedeny v Tab. 3.2. Pro přípravu gelu jsem použil zásobní roztoky jednotlivých chemikálií, je nezbytně nutné dodržet co možná nejpresnější odměření látek. Zásobní roztoky jsem připravoval následovně, 20% roztok akrylamidu, 2% roztok bisakrylamidu, 10% APS a 10% roztok TEMEDu. Pro skladování čistého TEMEDu je vhodné uzavřít nádoby po přípravě zásobního roztoku utěsnit parafilmem. Gel jsem připravoval na celkový objem 260 μ l, při míchání jsem postupoval následovně, nejdříve jsem smíchal akrylamid s bisakrylamidem, pak jsem přidal APS, dále H₂O k doplnění na výsledný objem 260 μ l a nakonec těsně před umístěním roztoku do formy jsem přidal TEMED.

Název	Sumární vzorec	Výrobce	Čistota (%)
Akrylamid	C ₃ H ₅ NO	Sigma	99
N,N'-methylenbisakrylamid	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	Sigma	99
Peroxidisíran amonný	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Sigma	98
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin	C ₆ H ₁₆ N ₂	Sigma	99
Kreatin	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	Fluka	99
Karnosin	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃	Acros Organics	98
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	Fluka	99
Taurin	NH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H	Fluka	99,5
Deuterovaná voda	D ₂ O	Sigma	99,9

Tab. 3.1: Seznam použitých chemikálií

Látka	Hmotnostní zlomek zásobního roztoku (%)	Množství (μl)
Akrylamid	20	65
Bisakrylamid	2	28,2
APS	10	2,6
TEMED	10	2,6
H ₂ O	100	161,6
Celkem		260

Tab. 3.2: Příprava gelu (5%, 50:1)

Pro přípravu gelu jsem vždy použil stejnou metodu. Základem je polymerizace gelu ve vhodné formě z teflonu. Polymerizace by měla trvat minimálně 3 hodiny, pokud je vzorek při polymerizaci umístěn do lednice nechal jsem ho polymerizovat minimálně 4 hodiny. Po polymerizaci se gel vytlačí pomocí pístu do přibližně 0,5 l destilované vody, kde by se měl nejméně za 12 hodin pomocí difuze vyčistit od přebytečných nezreagovaných chemikálií. Po vyčištění se gel umístí na parafilm a nechá se částečně vyschnout, aby bylo možno přidat zásobní roztok metabolitu. Během schnutí gelu může dojít k jeho přeschnutí, stavu kdy dochází k poškození gelu. Gel byl umístěn na parafilmu, ke kterému nepřilne, dalším kouskem parafilmu se gel musel několikrát během schnutí obrátit, aby nedošlo ke zkroucení, popřípadě jinému poškození gelu. Je nezbytně nutné s gelem manipulovat pouze pomocí parafilmu, jestliže gel k něčemu přilne, potrhá se a může se dále poškodit při umisťování do kyvety, výsledkem je poté nekvalitní vzorek. Vhodným okamžikem pro přerušení sušení gelu je stav, kdy gel takzvaně soudkovatí, voda se více odpařuje z konců gelu, proto je nutné hlídat stav okrajů gelu, aby nedošlo k jejich vyschnutí. Gel se při schnutí znatelně zmenší a pomocí parafilmu se umístí buď silikonové hadičky, nebo do formy na polymerizaci. Průměrná doba schnutí se pohybovala od tří do čtyř hodin v závislosti na hmotnostním zlomku akrylamidu a poměru síťování gelu a vlhkosti vzduchu. Pro vytvoření částečné orientace v gelu jsem používal dvě metody popsané v předcházejících podkapitolách.

Zásobní roztok metabolitů v těžké vodě jsem připravoval pro kreatin v koncentraci 100 mmol/l, pro karnosin v koncentraci 50 mmol/l a v případě taurinu a myo-Inositolu 50 mmol/l. Výslednou koncentraci metabolitu ve vzorku nelze přesně určit, protože část vody při sušení v gelu vždy zůstane.

V Tab. 3.3 uvádím přehled typů vytvořených gelů. V tabulce nejsou uvedeny některé nepovedené pokusy, jde o základní přehled jednotlivých etap měření. Následující kapitola obsahující výsledky je členěna dle jednotlivých etap pro zajištění přehlednosti a návaznosti průběhu měření.

Etapa	Hmotnostní zlomek AA (%)	Poměr síťování	Metoda	Metabolit
1	5	50:1	hadička	kreatin
1	5	20:1	hadička	kreatin
2	5	6:1	Bax	směs metabolitů
2	8	10:1	Bax	směs metabolitů
3	5	100:1	Bax	kreatin
3	8	10:1	Bax	kreatin
4	8	80:1	Bax	karnosin
4	8	60:1	Bax	karnosin
4	8	80:1	Bax	kreatin s karnosinem
5	4	50:1	Bax	karnosin
5	5	50:1	Bax	karnosin
5	6	50:1	Bax	karnosin
5	8	50:1	Bax	karnosin

Tab. 3.3: Přehled typů připravených gelů

3.3. Výsledky

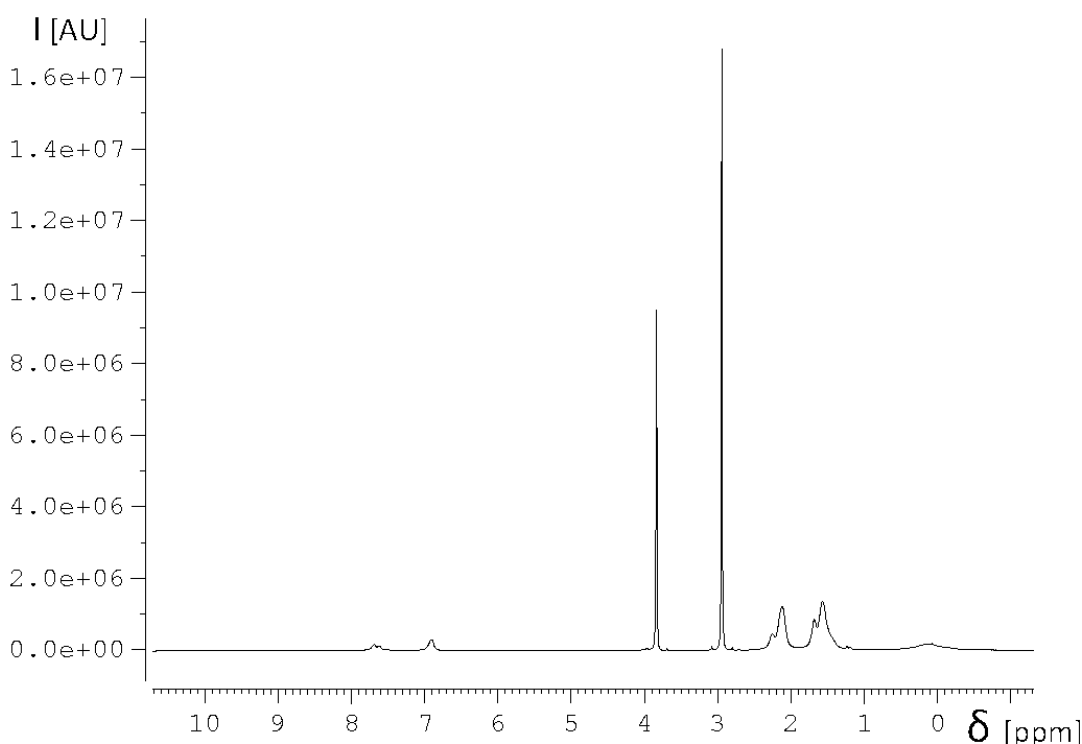
3.3.1. První etapa měření – metoda natahovací hadičky

První experimenty byly provedeny s použitím stlačení gelu metodou natahovací hadičky. Gel obsahoval roztok kreatinu. Úvodním vzorkem byl gel s hmotnostním zlomkem akrylamidu 5% a poměrem síťování 50:1 připravený ve formě o průměru 6 mm, který byl umístěn v silikonové hadičce. Pomocí silikonové hadičky jsem mohl měnit částečnou orientaci molekul pomocí natažení hadičky, okamžitě po natažení by mělo dojít ke změně částečné orientace molekul. Změřil jsem několikrát tentýž vzorek s různým natažením hadičky od původní velikosti až do maximálního natažení, kdy z kyvety byla hadička vytažena 10,4 cm. Žádné z měření nepřineslo výsledek v podobě pozorovatelného štěpení píků kreatinu ve spektru ^1H . Měření prováděná na prvním vzorku byla spíše pokusná pro optimální nastavení parametrů měření, zvláště potlačení signálu vody. Vedle ^1H spektra bylo změřeno též spektrum ^2H , které obsahuje jediný pík obohacené vody. V případě částečné orientace molekul by tento signál měl ukazovat štěpení v důsledku reziduální kvadrupólové vazby. Štěpení píku ve spektru ^2H na Obr. 3.5 má nicméně jiný původ, jedná se superpozici signálu vody z gelu a z volného roztoku, který byl v reakci na natažení hadičky vytěsněn z gelu a zabíral část měřeného objemu vzorku. Tento problém spočíval ve faktu, že se v silikonové hadičce gel nenasákl na původní velikost, při volné silikonové hadičce nedosahoval ani velikosti radiofrekvenční cívky.

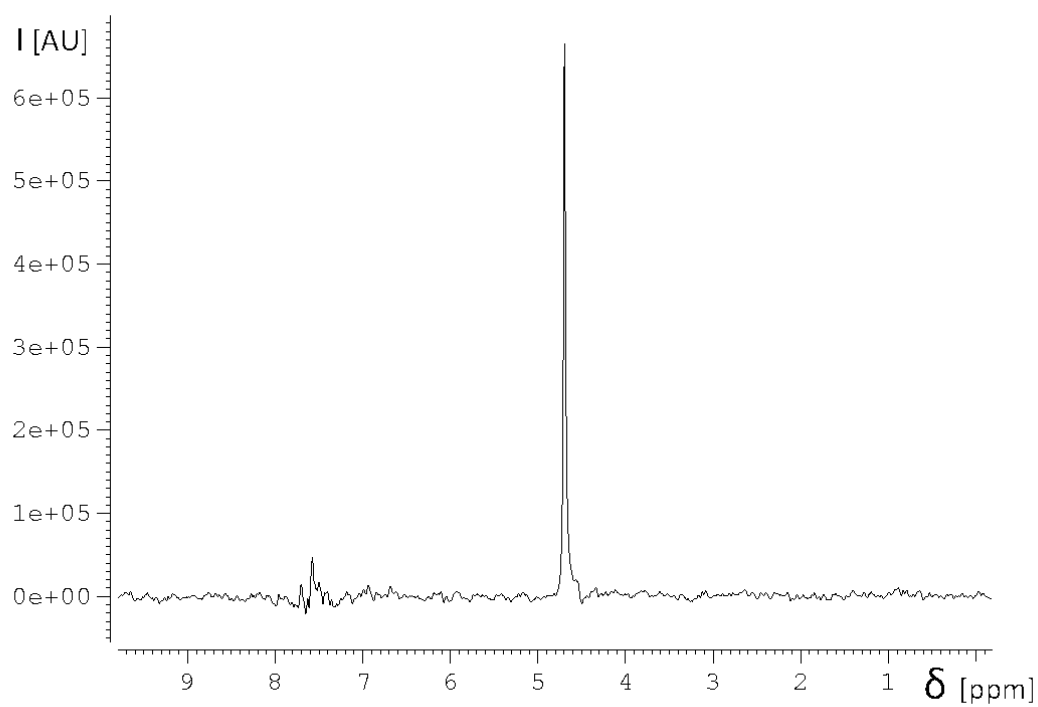
Dalším vzorkem byl pokusný gel s hmotnostním zlomkem akrylamidu 20 % a poměrem síťování 50:1, který byl připraven ve formě s průměrem 3 mm, ale během sušení se značně zkroutil a při umístění do silikonové hadičky se potřhal.

Při postupu zhušťování gelu jsem se rozhodl změnit strategii a místo hmotnostního zlomku akrylamidu jsem zahuštění gelu docílil zvýšením množství síťovadla. Připravil jsem gel ve formě s vnitřním průměrem 3 mm o hmotnostním zlomku akrylamidu 5 % a poměru síťování 20:1. Spektrum ^1H tohoto gelu je zobrazeno na Obr. 3.3 a spektrum ^2H tohoto gelu je zobrazeno na Obr. 3.4. Jak je zřetelně z obrázků vidět nedochází ke štěpení signálu kreatinu ve spektru ^1H ani ke štěpení signálu deuterované vody ve spektru ^2H .

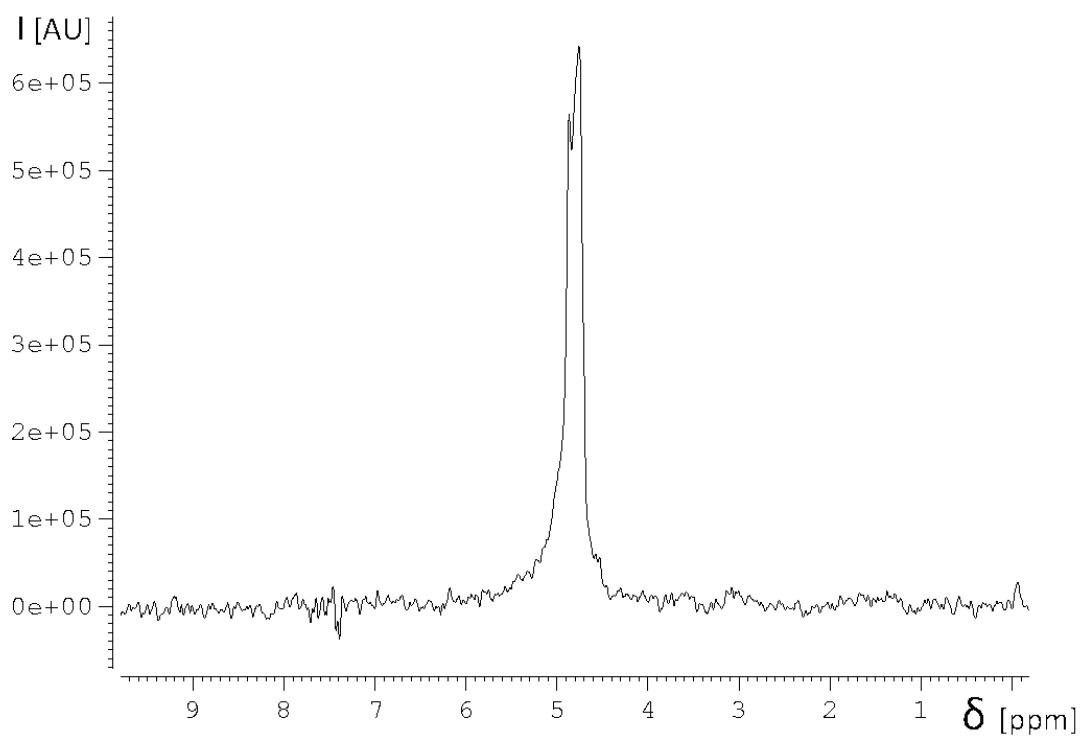
Nová forma o vnitřním průměru 3 mm, kterou jsem nechal vyrobit, se příliš neosvědčila při výrobě vzorků. Hlavním nedostatkem takto úzkého průměru je dostat do formy roztok chemikálií. Při pokusu dostat roztok dovnitř pipetou došlo k uzavření formy kapkou roztoku a k vytékání roztoku ven z formy. Problém jsem vyřešil pomocí jehly a stříkačky, tímto způsobem ale někdy docházelo k vytlačení zbytku vzduchu ze stříkačky a vzniku bubliny, která způsobila vznik dvou gelů místo jednoho. Při sušení také nastaly komplikace v podobě přeschnutí a kroucení gelu, způsobené příliš úzkým průměrem gelu a rychlým odpařováním vody z konců gelu. Při měření se projevovala nehomogenita magnetického pole způsobená vzduchem v prostoru mezi nataženou hadičkou a stěnou kyvety. U zátky docházelo k deformaci hadičky vlivem natažení, deformovaná hadička se nacházela i v oblasti radiofrekvenční cívky.



Obr. 3.3: Spektrum ^1H kreatinu v gelu (5%, 20:1)



Obr. 3.4: Spektrum ^2H kreatinu v gelu (5%, 20:1)



Obr. 3.5: Spektrum ^2H kreatinu v gelu s volným zásobním roztokem (5%, 50:1)

3.3.2. Druhá etapa měření – metoda dle Baxe

V této etapě jsem začal měřit metodou dle Baxe [39], [40] zásobní roztok kreatinu ve směsi s dalšími metabolity, u kterých by mohlo docházet k částečné orientaci. Metoda dle Baxe se běžně používá k dosažení částečné orientace molekul větších proteinů. Roztok metabolitů byl připraven z kreatinu, myo-Inositolu a taurinu. Pro měření jsem připravil čtyři gely s poměrem síťování 6:1, odlišovaly se hmotnostním zlomkem akrylamidu 5, 8, 12 a 15 %. Během přípravy došlo k potrhání gelů o hmotnostním zlomku 12 a 15 %. Z těchto měření jsem vybral reprezentativní vzorek (5%, 6:1), kde se minimálně projevovала nehomogenita vzorku, protože se jednalo o vzorek s nejnižším hmotnostním zlomkem akrylamidu. Při poměru síťování gelu 6:1 by se měla vytvořit velmi hustá síť, která je ovšem velmi křehká. Ve spektru ^1H bylo vidět překrytí signálů jednotlivých metabolitů, ovšem při srovnání se spektrem zásobního roztoku nebylo patrné štěpení některého píků. Ve spektru ^2H nedocházelo ke znatelnému štěpení signálu obohacené vody. Zásobní roztok metabolitů jsem také měřil v gelu s hmotnostním zlomkem akrylamidu 8 % a s poměrem síťování 10:1. Ve spektru ^1H ani ^2H nebylo patrné štěpení signálů.

3.3.3. Třetí etapa měření – od metabolitů zpět ke kreatinu

Další měření proběhla na gelech se zásobním roztokem kreatinu. Důvodem návratu zpět ke kreatinu byla nepřehlednost spektra, kde se signály metabolitů překrývaly. Nejdříve jsem změřil gel s hmotnostním zlomkem akrylamidu 5 % a poměrem síťování 100:1 a následně gel s hmotnostním zlomkem akrylamidu 8 % a poměrem síťování 10:1. Ve spektrech ^1H se neprojevovала reziduální dipolární vazba a ani ve spektrech ^2H nebyla patrná reziduální kvadrupólová vazba naznačující částečnou orientaci obohacené vody ve vzorku.

3.3.4. Čtvrtá etapa měření – karnosin

Po neúspěchu měření částečné orientace molekul kreatinu metodou dle Baxe jsem jako sledovanou molekulu použil karnosin. Připravil jsem vzorky gelu s hmotnostní zlomkem akrylamidu 8 % a s poměrem síťování 60:1 a 80:1. V ^1H spektrech nebylo na první pohled patrné štěpení signálu karnosinu, ale ve spektrech ^2H bylo patrné štěpení dokazující částečnou orientaci molekul obohacené vody ve vzorku. Štěpení ve spektru ^2H bylo dobře patrné, ale intenzita píků dubletu nebyla stejná. Na rozdíl od předcházejících příprav gelů jsem gel při polymerizaci umístil do chladničky, aby se snížil tepelný pohyb částic ve vzorku a vznikla hustší homogenní síť gelu.

Po dosažení částečné orientace molekul obohacené vody jsem se pokusil vrátit k vytvoření částečné orientace molekul kreatinu a připravil jsem vzorky gelů s hmotnostním zlomkem akrylamidu 8 % a s poměrem síťování 80:1 a 70:1. Jako zásobní roztok jsem použil směs kreatinu a karnosinu. Ve spektru ^1H nebylo patrné štěpení signálu kreatinu. V ^2H spektru jsem opět získal štěpení obohacené vody s různou intenzitou píků dubletu. Různá intenzita je způsobena superpozicí částečně orientované a volné obohacené vody v důsledku nehomogenity gelu.

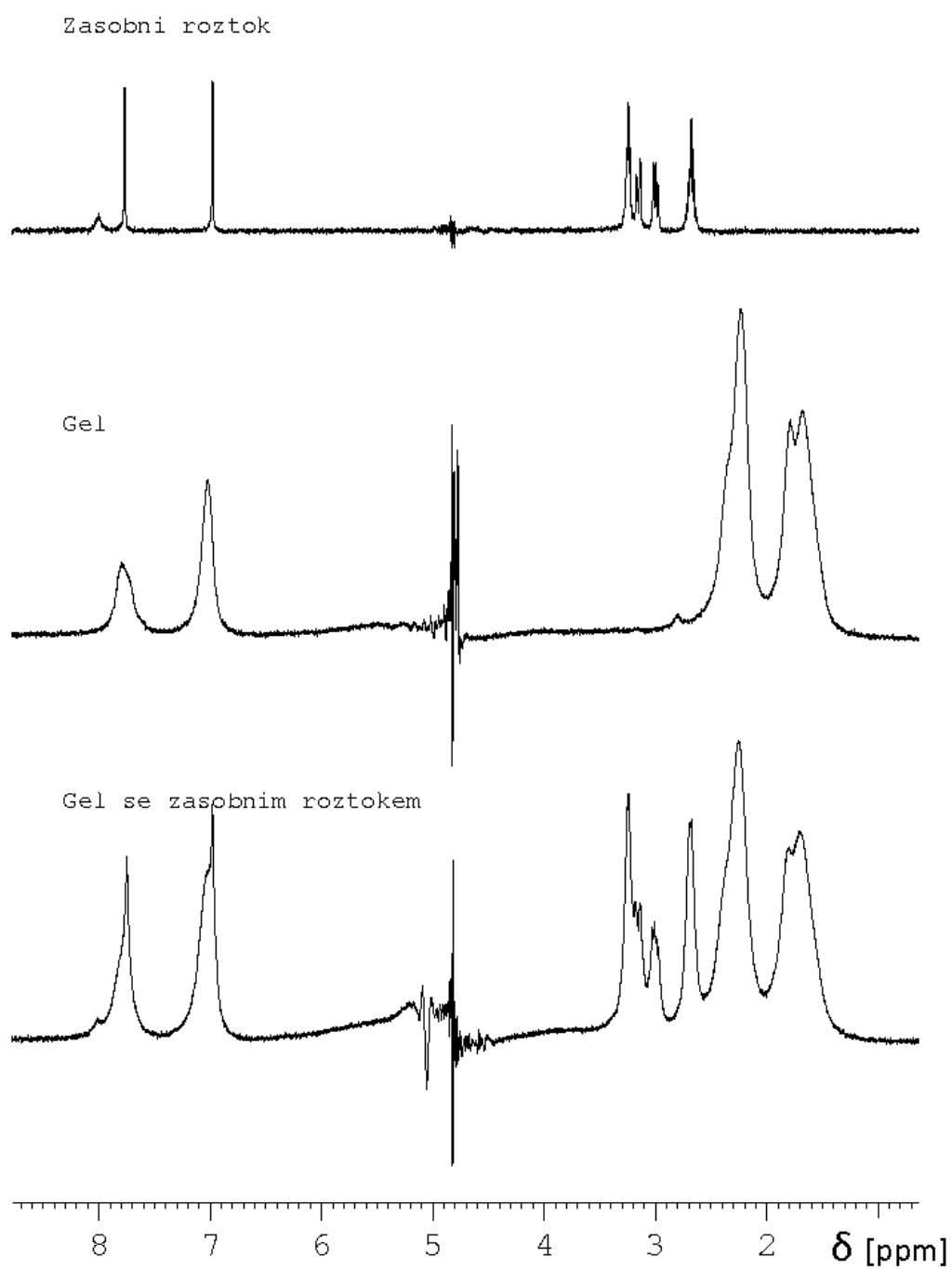
Po analýze výsledků jsem dospěl k závěru, že při přípravě gelu docházelo při použití většího množství TEMEDu k výraznému zrychlení procesu polymerizace a vznikalo nehomogenní síťování gelu, tento proces se v případě měřených gelů částečně kompenzoval polymerizací gelu v chladničce.

3.3.5. Pátá etapa měření – získání štěpení ve spektru karnosinu

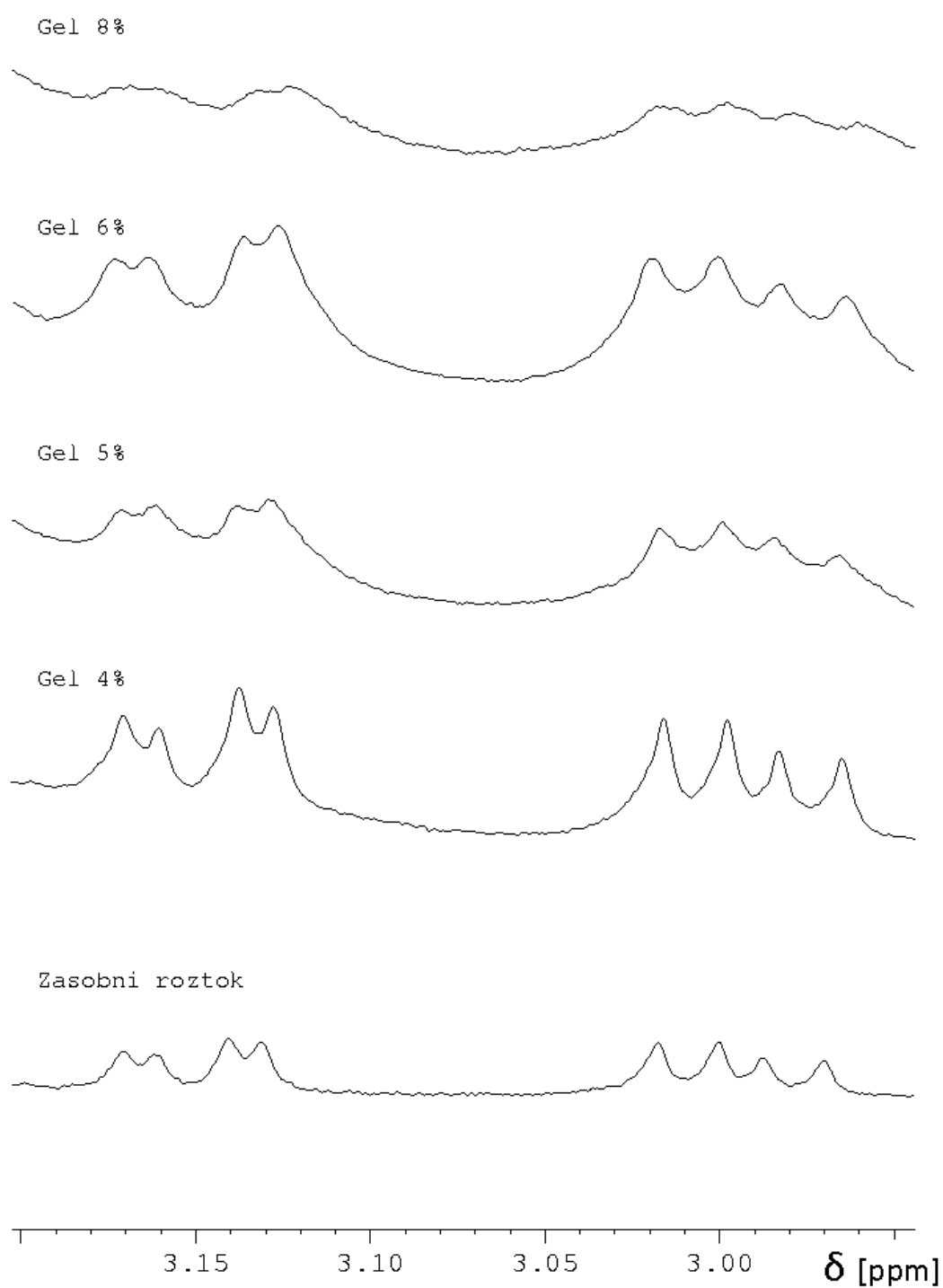
Po odstranění nedostatku v přípravě gelu jsem vyrobil zkušební vzorek gelu s hmotnostním zlomkem akrylamidu 8 % a s poměrem síťování 50:1. Do gelu jsem nasákl pouze obohacenou vodu, protože samotný gel by měl orientovat molekuly vody. Ve spektru ^2H byl dublet s residuální kvadrupólovou vazbou přibližně 10 Hz, jehož píky měly přibližně stejnou intenzitu, docházelo tedy k částečné orientaci veškeré obohacené vody ve vzorku.

Pro získání závislosti velikosti residuálního dipolárního štěpení na hmotnostním zlomku akrylamidu jsem připravil vzorky s poměrem síťování 50:1 a hmotnostním zlomkem akrylamidu 4, 5, 6 a 8 %. Hodnoty jsem vybral dle studie [39], která se zabývala vytvořením částečné orientace molekul proteinu.

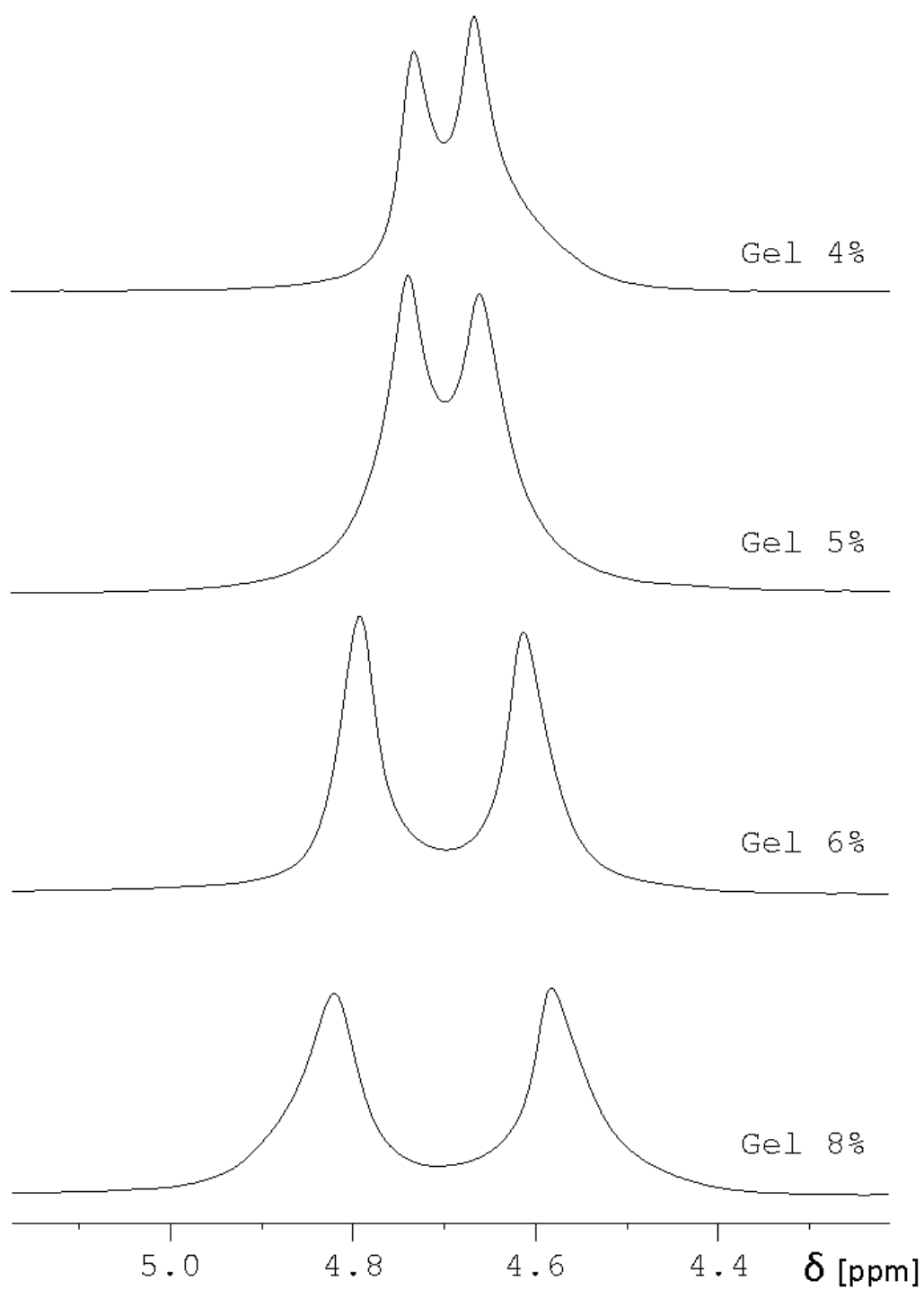
Přiřazení jednotlivých píků ve spektru zásobního roztoku karnosinu je zobrazeno Obr. 2.13. Vodíky H_α nejsou ve spektru viditelné, protože jsou selektivně potlačeny společně se signálem vody.



Obr. 3.6: Srovnání ^1H spekter zásobního roztoku, čistého gelu (8% 50:1) a vzorku (8%, 50:1)



Obr. 3.7: ^1H spektra vybrané oblasti pro zásobní roztok a gely (4%, 5%, 6% a 8% 50:1)



Obr. 3.8: ^2H spektra štěpení signálu obohacené vody
pro hmotnostní zlomky gelu 4, 5, 6 a 8 % (50:1)

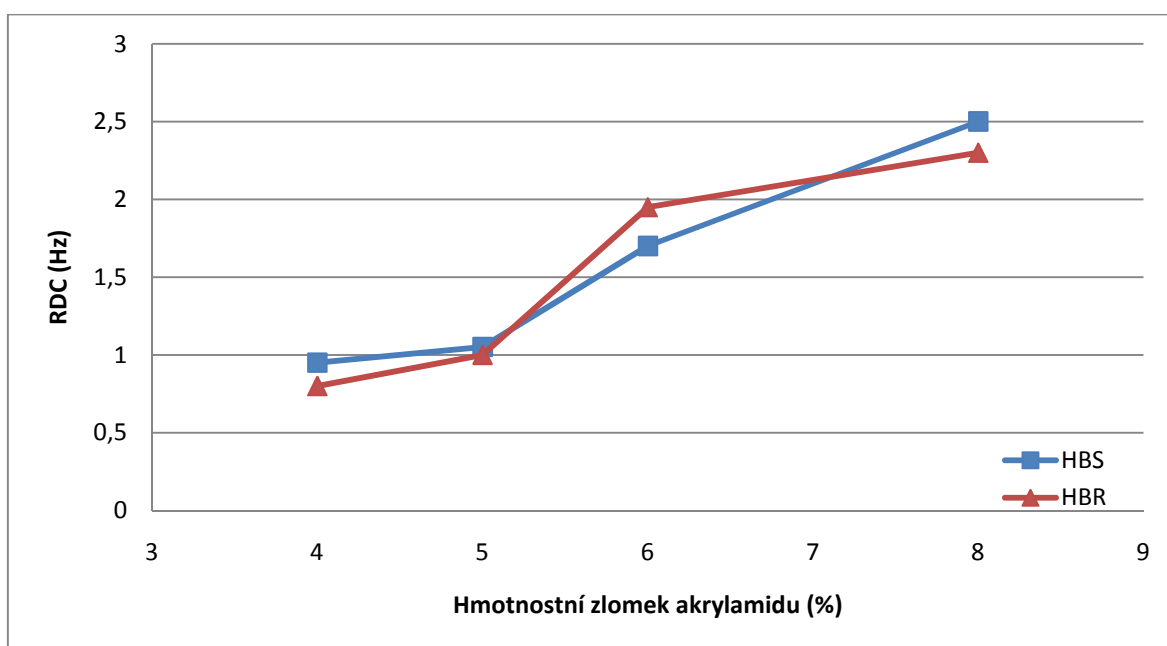
Pro představu průběhu měření uvádím na Obr. 3.6 spektrum roztoku karnosinu, spektrum gelu (8%, 50:1) a spektrum roztoku karnosinu v gelu (8%, 50:1). Ze spekter je patrné, že dochází k překryvu spekter pro rezonance vodíků karnosinu H_2 a H_4 , ostatní rezonance karnosinu se nepřekrývají se signálem jader 1H z gelu.

Reziduální dipolární vazba se projevovala ve spektru jako štěpení signálu vodíků CH_2 skupiny, konkrétně $H_{\beta S}$ a $H_{\beta R}$. Štěpení nebylo na první pohled patrné, ale měření vzdálenosti píků signálu CH_2 skupiny odhalilo štěpení na rámec pozorované nepřímé dipól-dipolární interakce ve spektru roztoku karnosinu. Zvětšená spektra CH_2 skupiny karnosinu, kde docházelo ke štěpení signálu vlivem RDC, v závislosti na hmotnostním zlomku akrylamidu v gelu, jsou uvedena na Obr. 3.7. V levé části vidíme štěpený dublet odpovídající signálu $H_{\beta S}$ a v pravé části je štěpený dublet $H_{\beta R}$. Ze spektra 8% gelu je patrné, že pro gely s vyšším hmotnostním zlomkem akrylamidu představuje určení celkového štěpení problém. Ve spektru se výrazněji projevuje efekt nevystředování dipól-dipólové interakce, tento efekt způsobuje rozšíření píků ve spektru.

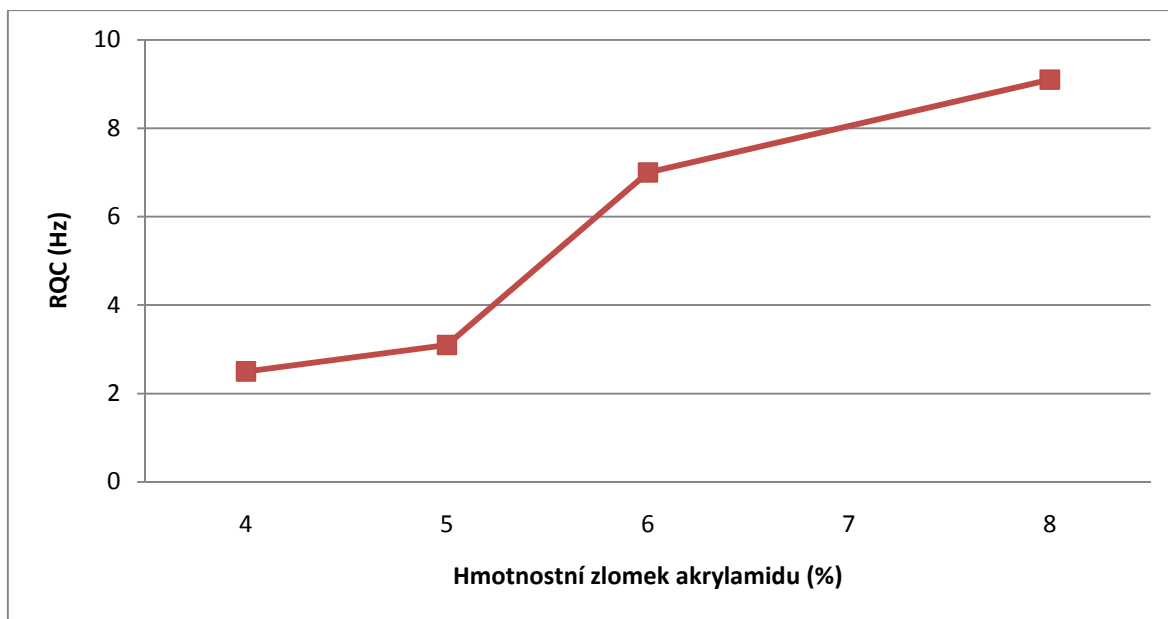
Velikost štěpení vlivem RDC jsem určil dle vzorce (10), ze spektra zásobního roztoku jsem získal velikost nepřímé dipól-dipolární interakce, která odpovídá vzdálenosti středu dubletů v signálu $H_{\beta S}$ a $H_{\beta R}$. Velikost $^2J_{HH}$ signálu $H_{\beta S}$ byla 15,2 Hz. Velikost $^2J_{HH}$ $H_{\beta R}$ byla 15 Hz. Ze spekter gelů jsem získal RDC v řádu 0,8 až 2,5 Hz, pro jednotlivé gely je velikost RDC uvedena v Tab. 3.4, kde je také uvedena velikost reziduální kvadrupólové vazby obohacené vody. Naměřená spektra 2H v závislosti na hmotnostním zlomku akrylamidu v gelu jsou uvedena na Obr. 3.8. Pozorované štěpení dokazuje částečnou orientaci obohacené vody v gelu. Přesnost měření jsem určil z přibližné šířky vrcholu píků signálu $H_{\beta S}$ a $H_{\beta R}$ ve spektru 1H a šířky píků signálu obohacené vody ve spektru 2H . Grafická závislost velikosti štěpení vlivem reziduálních dipolárních vazeb pozorovaných ve spektru karnosinu v gelu na hmotnostní zlomku akrylamidu v gelu při poměru síťování 50:1 je zobrazena na Obr. 3.9. Ze závislosti je patrné, že velikost štěpení signálu je skoro identická pro danou hustotu gelu. Závislost RQC na hmotnostním zlomku akrylamidu v gelu s poměrem síťování 50:1 je zobrazena na Obr. 3.10. Při srovnání závislosti RDC a RQC při stejné hustotě gelu lze říci, že průběhem jsou si velice podobné. Korelační koeficient RDC $H_{\beta S}$ a RQC obohacené vody je roven 0,98. Korelační koeficient velikosti RDC $H_{\beta R}$ a RQC obohacené vody je roven 0,99. Z korelace naměřených dat jasně vyplývá, že pozorované štěpení je nezměnitelně projevem RDC.

Hmotnostní zlomek akrylamidu (%)	RDC $H_{\beta S} \text{ } ^1H$ (Hz)	RDC $H_{\beta R} \text{ } ^1H$ (Hz)	RQC 2H (Hz)
4	$0,95 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,02$
5	$1,05 \pm 0,04$	$1 \pm 0,03$	$3,1 \pm 0,03$
6	$1,7 \pm 0,03$	$1,95 \pm 0,02$	$7 \pm 0,03$
8	$2,5 \pm 0,05$	$2,3 \pm 0,05$	$9,1 \pm 0,04$

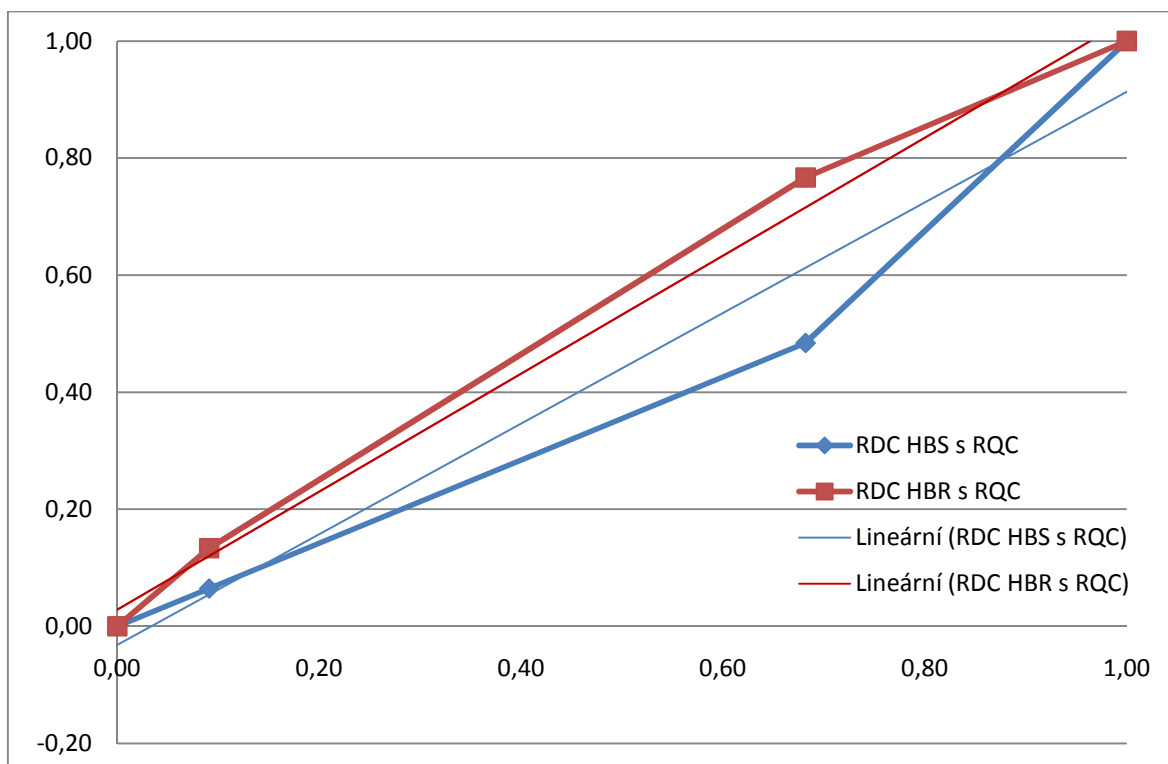
Tab. 3.4: Naměřené hodnoty RDC ve spektru 1H a RQC ve spektru 2H



Obr 3.9: Závislost velikosti štěpení signálu karnosinu v 1H spektru na hmotnostním zlomku akrylamid v gelu (50:1)



Obr. 3.10: Závislost velikosti štěpení signálu těžké vody ve spektru ^2H na hmotnostním zlomku akrylamidu v gelu (50:1)



Obr. 3.11: Korelace štěpení signálu karnosinu v ^1H spektru a štěpení signálu obohacené vody v ^2H spektru

3.4. Diskuse výsledků

3.4.1. Metody přípravy gelů

Příprava gelu je nejdůležitější částí práce, protože gel použitý jako orientující médium vytváří základní podmínky pro vznik částečné orientace molekul. Bylo zjištěno, že postup přípravy gelu obsahuje několik kritických bodů, u nichž detaily provedení zásadně ovlivňují kvalitu výsledného gelu a reprodukovatelnost jeho přípravy. Částečná nereprodukovatelnost některých kroků přípravy gelu může způsobit rozdíly v dosažené částečné orientaci molekul metabolitu. Zásadním problémem při přípravě gelu bylo přesné odměření množství TEMEDu použité pro polymerizaci gelu. Tato látka je velmi těkavá, pro přípravu gelu se používá 0,26 μl čistého TEMEDu. Původně jsem toto množství odměřoval pomocí stříkačky Hamilton o objemu 5 μl , ale když jsem začal vytvářet vzorky metodou dle Baxe nedošlo několikrát k polymerizaci gelu, a proto jsem se rozhodl do gelu přidávat přibližně pětkrát větší množství TEMEDu. Po zvýšení množství TEMEDu, došlo ke zrychlení polymerizace, která vedla k nehomogennímu síťování v gelu. K odstranění tohoto problému došlo posléze u vzorků z páté etapy měření, kdy jsem začal používat 10% zásobní roztok TEMEDu.

Po polymerizaci následuje čištění gelu v destilované vodě, které je bezproblémovým procesem. Problémy většinou nastávají při sušení gelu, kdy jsem nebyl schopen přesně určit, kolik vody se z gelu odpařilo, nebo jestli při manipulaci s gelem během procesu sušení nedošlo k lokálnímu potrhání gelu. Určení nejvhodnějšího okamžiku pro přerušení sušení je čistě subjektivní, vodítkem může být okamžik, kdy dojde k soudkovatění gelu a někdy také k vytvoření matného zbarvení původně čirého gelu. Po sušení se gel umístil buď do silikonové hadičky, nebo zpět do formy a byl k němu přidán zásobní roztok metabolitu. Zásobní roztok jsem přidával ve větší množství, aby se gel optimálně nasákl, přebytečný zásobní roztok byl posléze odstraněn nebo se použil k vytlačení vzduchových bublin, které způsobovaly značnou nehomogenitu magnetického pole. Gel s nízkým obsahem síťovadla (80:1) jsem zkoušel použít opakovaně, kdy se hotový vzorek opatrně vytlačil ven z kyvety, aby nedošlo k potrhání gelu, do destilované vody a poté opět fungoval jako nový vzorek. Nebyla pozorována změna vlastností gelu.

Metoda silikonové hadičky se původně zdála jako vhodné řešení získání závislosti velikosti RDC na natažení gelu, ale v mém případě jsem nedosáhl žádného dipolárního štěpení ve spektru kreatinu a navíc se u této metody projevilo několik technických problémů. Zásadním problémem je homogenita magnetického pole v místě vzorku, kdy při

natažení silikonové hadičky dochází k vytvoření vzduchové mezery mezi hadičkou a kyvetou, pokoušel jsem se o kompenzaci přidáním těžké vody do této oblasti. Problémem se ukázalo být natahování hadičky, při němž došlo k poklesu hladiny těžké vody až do oblasti radiofrekvenční cívky. Dalším problémem se ukázala příprava vhodného rozměru gelu, který by bylo možné do silikonové hadičky umístit. Příprava gelu ve formě o průměru 3 mm se neosvědčila. Objevili se problémy spojené s umísťováním roztoku chemikálií do formy a sušením gelu, jejichž výsledkem byl nekvalitní vzorek. Při umísťování roztoku do formy o průměru 3 mm pomocí pipety docházelo k vytvoření kapky, která formu utěsnila. Pod touto kapkou zůstala vzduchová bublina a roztok vytékal ven z formy. Řešením bylo použití jehly a stříkačky, někdy ale docházelo k vytvoření bubliny, která roztok rozdělila na dvě části. Při sušení docházelo k přeschnutí konců gelu způsobené zvýšeným odparem vody z koncových částí. Došlo také ke zkroucení gelu, kdy gel o tak malém průměru nevysychá rovnoměrně. Míru stlačení gelu jsem určoval dle délky hadičky vytažené ven z kyvety. Použitím gelu o větším průměru by bylo možno získat větší stlačení gelu, problém je možnost poškození gelu při natahování v silikonové hadičce.

Měření pomocí metody dle Baxe je sice časově náročnější a projeví se zde více vliv málo reprodukovatelných kroků přípravy gelů, ale vzhledem k velikosti vzorku a propracování metodiky přípravy pro umístění stlačeného polyakrylamidového gelu do NMR kyvety se tato metoda ukázala jako vhodnější. Částečné problémy s homogenitou magnetického pole v místě vzorku jsou způsobeny velikostí gelu, která nedosahuje celé délky radiofrekvenční cívky. Gel má při polymerizaci objem 260 μl , který je podle mého názoru experimentálně potvrzen za kompromisní řešení, ve formě můžeme vytvořit větší gel, ale při sušení delšího gelu docházelo k přeschnutí koncových částí, které často způsobilo popraskání gelu při umísťování do kyvety pomocí trychtýře a pístu.

3.4.2. Měření gelů

Určení homonukleární RDC z 1D ^1H spektra vzorku je v mém případě jednoduché. Jak jsem uvedl v teoretické části, celkové štěpení signálu ve spektru je součtem RDC a nepřímé dipól-dipólové interakce. V první etapě proběhla optimalizace nastavení měření vzorku pomocí NMR spektrometru a měření RDC na vzorku kreatinu. Ve druhé etapě jsem zkoušel po neúspěchu s dosažením částečné orientace molekul kreatinu do gelu umístit společně s kreatinem další molekuly, taurin a myo-Inositol. Taurin podobně jako kreatin vykazuje RDC při měření in vivo. Molekula myo-Inositolu měla fungovat jako překážka v pórech gelu, která by omezovala volný pohyb ostatních molekul. Ve třetí etapě jsem se vrátil k měření RDC ve spektru kreatinu metodou dle Baxe na dvou vzorcích s rozdílnou hustotou síťování gelu. Ve čtvrté etapě jsem vyzkoušel polymerizaci gelu v chladničce, kde dochází ke zpomalení tepelného pohybu částic. Při měření se ve spektru ^2H objevilo štěpení signálu způsobené residuální kvadrupólovou vazbou dokazující částečnou orientaci těžké vody. Zajímavé ale bylo, že intenzity píků dubletu nebyly stejné. Tento tvar je způsoben superpozicí dubletu a singletu, které jsou patrně přítomny v důsledku nehomogenity připraveného vzorku. Po analýze přípravy gelu jsem objevil chybu v podobě přidávání většího množství TEMEDu. V páté etapě jsem naměřil již kvalitně připravené vzorky a získal jsem RDC projevující se jako štěpení v signálu karnosinu. Na Obr 3.7 jsou zobrazena naměřená spektra, při jejich měření jsem se nesoustředil na získání maximální homogenity magnetického pole, ale na možnost odečtení RDC ze spektra. U gelů s nejvyšším hmotnostním zlomkem akrylamidu 8 %, dochází ke značnému rozšíření signálů, které komplikuje přesné odečtení velikosti štěpení. Za těchto podmínek patrně již dochází ke zpomalení náhodných reorientačních pohybů i relativně malých molekul, což vede ke zkracování příčné relaxační doby, a tedy rozšíření signálu ve spektru.

3.4.3. Naměřené výsledky

Nenaměřil jsem částečnou orientaci molekul kreatinu pomocí polyakrylamidového gelu. První vzorky byly pečlivě připraveny, ale nebyla na nich pozorována ani částečná orientace těžké vody. Možným vysvětlením nedosažení výsledků je poškození gelu vlivem natažení silikonové hadičky v kyvetě.

Podařilo se nalézt podmínky, zejména detailní metodu přípravy a složení gelu na bázi polyakrylamidu, která vede ke vzniku reziduálního dipolárního štěpení v ^1H spektru významného metabolitu vyskytujícího se ve svazech, karnosinu. Toto štěpení bylo pozorováno pro případ dvojice geminálních vodíků methylenové skupiny $H_{\beta S}$ a $H_{\beta R}$, výsledky viz Tab. 3.4. Výsledky naznačují velmi slabou orientaci molekul karnosinu, zatímco částečná orientace těžké vody dle reziduálního kvadrupolárního štěpení ve spektru ^2H je pouze o něco menší než byla naměřena na vzorcích proteinů [39]. V případě karnosinu, nelze in vivo pozorovat methylenové skupiny, v důsledku překrytí signály jiných metabolitů, v literatuře je však popsán RDC mezi dvěma vodíky imidazolových skupin, H_2 a H_4 a to přibližně 16 Hz [42]. Tato hodnota je poněkud překvapivá vzhledem k podstatně větší vzájemné vzdálenosti těchto vodíků (cca 0,3 nm) ve srovnání se vzdáleností geminálních vodíků (cca 0,18 nm). Z dosud provedených měření nelze spolehlivě určit, zda je mechanismus orientace metabolitů ve stlačeném gelu podobný situaci ve svalu, či nikoliv. Zdá se ale, že orientace molekul ve svalu je nejspíše způsobena specifickými interakcemi. Míru orientace molekul metabolitů v gelu je patrně možné dále optimalizovat pomocí dalších, dosud nezkoumaných parametrů, jako je například pH, případně se pokusit o chemickou modifikaci gelu, která by vedla k silnější interakci s molekulami metabolitů.

Připravené vzorky metabolitů ve stlačeném polyakrylamidovém gelu umožní získání rozsáhlejší experimentální informace, vedle homonukleárních RDC v principu lze naměřit i heteronukleární RDC, zejména mezi přímo vázanými páry ^1H - ^{13}C a ^1H - ^{15}N . To by mělo umožnit získat dostatek experimentálních údajů ke stanovení mechanismu orientace metabolitů v gelu. Teoreticky si lze představit podobná měření za speciálních podmínek i za in vivo podmínek na speciálním MR tomografu s vysokou citlivostí. O ^{13}C měření jsem se pokusil i v rámci této práce, ale ukázalo se, že připravený vzorek měl pro tento typ měření příliš nízkou koncentraci karnosinu.

Použité orientující médium, tedy polyakrylamidový gel, by bylo možno využít k přípravě fantomu pro MR tomograf k měření residuálního dipolárního štěpení v souvislosti s pozorováním patobiochemických změn mikrostruktury tkáně. Ale pozorovaná RDC ve spektru je projevem slabé částečné orientace způsobené pouze prostorovým omezením pohybu zkoumané molekuly. Pomocí fantomu pro MR tomograf by bylo možné vyzkoušet vliv faktorů na pozorovanou RDC ve spektru. Pomocí RDC jako projevu změn mikrostruktury svalu by bylo možno vytvořit klasifikaci postižení svalů, například z hlediska nahrazení svalových buněk tukovou tkání.

4. Závěr

Hlavním výsledkem práce je optimalizace způsobu přípravy a složení gelu na bázi polyakrylamidu, který lze použít jako orientující médium pro molekuly nízkomolekulárních metabolitů, které se vyskytují ve svalu. Byly vyzkoušeny dvě metody radiálního stlačení vzorku, umožňující měření v NMR spektrometru vysokého rozlišení. Pouze metoda dle Baxe vedla k pozorování reziduální dipolární vazby. Štěpení rezonancí geminálních vodíků methylenových skupin bylo pozorováno v případě dipeptidu karnosinu. Bylo prokázáno, že toto štěpení je důsledkem RDC pomocí změřené závislosti na koncentraci gelu a dále pomocí lineární korelace s reziduálním kvadrupólovým štěpením signálu ^2H deuterované vody, které sloužila jako rozpouštědlo.

Získané výsledky poslouží ke konstrukci fantómu (slepého vzorku) vhodného pro MR tomograf, který umožní jednak optimalizaci nastavení tomografu pro tento typ měření, jednak prozkoumání dalších charakteristik jako je například orientační závislosti pozorovaných reziduálních dipolárních vazeb.

Byly splněny jednotlivé body zadání diplomové práce, a to zejména seznámení se s technikou přípravy stlačených polyakrylamidových gelů, osvojení základů ovládání NMR spektrometru, příprava gelů s různou koncentrací, poměrem síťovadla a mírou stlačení, naměření ^1H spekter metabolitu rozpuštěného v připravených vzorcích gelu a vyhodnocení naměřených spekter.

Seznam použité literatury

- [1] EMSLEY, J. W., FEENEY, J., *Forty years of Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Progress In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2007, 50, 179-198
- [2] SHOOLERY, J. N., *The development of experimental and analytical high resolution NMR*, Progress In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1995, 28, 37-52
- [3] COHEN, J. S., JAROSZEWSKI, J. W., KAPLAN, O., RUIZCABELLO, J., COLLIER, S. W., *A history of biological applications of NMR spectroscopy*, Progress In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1995, 28, 53-85
- [4] Nobelprize.org, *The Nobel Prizes* [on-line], [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/>
- [5] LEVITT, M.H., *Spin Dynamics*, Wiley 2001, ISBN 0-471-48922-0
- [6] GÜNTHER, H., *NMR spectroscopy*, Second edition, Wiley 1995, ISBN 0-471-95201-X
- [7] HORE, P.J., *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press 1995, ISBN 0-19-855682-9
- [8] HRAZDÍRA, I., MORNSTEIN, V., ŠKORPÍKOVÁ, J., *Základy biofyziky a zdravotnické techniky*, Neptun 2006, ISBN 80-86850-01-3
- [9] fMRI TEAM Brno, *Zobrazování pomocí MR*, [online], [cit 2010-06-03], Dostupné z WWW: <http://fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=14#kodovani>
- [10] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, USA, *PALES prediction of alignment from structure*, [online] [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <<http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/PALES/index.html>>
- [11] KUMMERLOWE, G., LUY, B., *Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules*, Trac-trends In Analytical Chemistry, 2009, 28, 483-493
- [12] KUMMERLOWE, G., MCCORD E.F., CHEATHAM, S.F., NISS, S., SCHNELL, R.W., LUY, B., *Tunable Alignment for All Polymer Gel/Solvent Combinations for the Measurement of Anisotropic NMR Parameters*, Chemistry – A European Journal, Recieved 15.1.2010, DOI: 10.1002/chem.201000108

- [13] BLACKLEDGE, M., *Recent progress in the study of biomolecular structure and dynamics in solution from residual dipolar couplings*, Progress In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2005, 46, 23-61
- [14] GSCHWIND, R. M., *Residual dipolar couplings - A valuable NMR parameter for small organic molecules*, Angewandte Chemie-international Edition, 2005, 44, 4666-4668
- [15] BRAUN, S., KALINOWSKI, H.-O., BERGER S., *150 and More Basic NMR Experiments*, 2nd expanded edition, Wiley 1998, ISBN 3-527-29512-7
- [16] PARELLA T., *Pulse Program Catalogue*, Bruker 2004, NMR Guide 4.0
- [17] THIELE, C. M., *Use of RDCs in rigid organic compounds and some practical considerations concerning alignment media*, Concepts In Magnetic Resonance Part A, 2007, 30A, 65-80
- [18] KLOCHKOV, V. V.; KLOCHKOV, A. V.; THIELE, C. M., BERGER, S., *A novel liquid crystalline system for partial alignment of polar organic molecules*, Journal of Magnetic Resonance, 2006, 179, 58-63
- [19] Wikipedie Otevřená encyklopedie, *Kapalné krystaly*, [online], [cit 2010-06-03], Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_crystal>
- [20] LIRA, L. M.; MARTINS, K. A., de TORRESI, S. I. C., *Structural parameters of polyacrylamide hydrogels obtained by the Equilibrium Swelling Theory*, European Polymer Journal, 2009, 45, 1232-1238
- [21] THIELE, C. M., *Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination*, European Journal of Organic Chemistry, 2008, 5673-5685
- [22] LUY, B.; KOBZAR, K., KESSLER, H., *An easy and scalable method for the partial alignment of organic molecules for measuring residual dipolar couplings*, Angewandte Chemie-international Edition, 2004, 43, 1092-1094
- [23] The h bar, *Gel: two for one*, [online], [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <<http://myhbar.wordpress.com/2009/06/28/gels-two-for-one/>>
- [24] HOPKINS HEMMINGS, H.C., HOPKINS, P.M.P., *Foundations of Anaesthesia: Basic Sciences for Clinical Practice*, 2nd Edition, Elsevier Mosby, ISBN 0 3230 3707 0
- [25] SCHRODER, L., SCHMITZ, C., BACHERT, P., *Molecular dynamics and information on possible sites of interaction of intramyocellular metabolites in vivo*

- from resolved dipolar couplings in localized H-1 NMR spectra*, Journal of Magnetic Resonance, 2004, 171, 213-224
- [26] BOESCH, C., KREIS, R., *Dipolar coupling and ordering effects observed in magnetic resonance spectra of skeletal muscle*, Nmr In Biomedicine, 2001, 14, 140-148
 - [27] KREIS, R.; KOSTER, M.; KAMBER, M.; HOPPELER, H., BOESCH, C., *Peak assignment in localized H-1 MR spectra of human muscle based on oral creatine supplementation*, Magnetic Resonance In Medicine, 1997, 37, 159-163
 - [28] KREIS, R.; JUNG, B.; SLOTBOOM, J.; FELBLINGER, J., BOESCH, C., *Effect of exercise on the creatine resonances in H-1 MR spectra of human skeletal muscle*, Journal of Magnetic Resonance, 1999, 137, 350-357
 - [29] SELIVANOV, V. A.; de ATAURI, P.; CENTELLES, J. J.; CADEFAU, J.; PARRA, J.; CUSSO, R.; CARRERAS, J., CASCANTE, M., *The changes in the energy metabolism of human muscle induced by training*, Journal of Theoretical Biology, 2008, 252, 402-410
 - [30] ZANDT, H. J. A. I.; de GROOFT, A. J. C.; RENEMA, W. K. J.; OERLEMANS, F. T. J. J.; KLOMP, D. W. J.; WIERINGA, B., HEERSCHAP, A., *Presence of (phospho)creatine in developing and adult skeletal muscle of mice without mitochondrial and cytosolic muscle creatine kinase isoforms*, Journal of Physiology-london, 2003, 548, 847-858
 - [31] RENEMA, W. K. J., KLOMP, D. W. J., PHILIPPENS, M. E. P., van den BERGH, A. J., WIERINGA, B., HEERSCHAP, A., *Magnetization transfer effect on the creatine methyl resonance studied by CW off-resonance irradiation in human skeletal muscle on a clinical MR system*, Magnetic Resonance In Medicine, 2003, 50, 468-473
 - [32] KRUISKAMP, M. J.; de GRAAF, R. A.; van der GROND, J.; LAMERICHES, R. NICOLAY, K., *Magnetic coupling between water and creatine protons in human brain and skeletal muscle, as measured using inversion transfer H-1-MRS*, Nmr In Biomedicine, 2001, 14, 1-4
 - [33] NTZIACHRISTOS, V.; KREIS, R.; BOESCH, C., QUISTORFF, B., *Dipolar resonance frequency shifts in H-1 MR spectra of skeletal muscle: Confirmation in rats at 4.7 T in vivo and observation of changes postmortem*, Magnetic Resonance In Medicine, 1997, 38, 33-39

- [34] 't ZANDT, H. J. A. I.; KLOMP, D. W. J.; OERLEMANS, F.; WIERRINGA, B.; HILBERS, C. W., HEERSCHAP, A., *Proton MR spectroscopy of wild-type and creatine kinase deficient mouse skeletal muscle: Dipole-dipole coupling effects and post-mortem changes*, Magnetic Resonance In Medicine, 2000, 43, 517-524
- [35] ZirChrom Separations Inc., *Dissociation Constants Of Organic Acids And Bases*, [online], [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <<http://www.zirchrom.com/organic.htm>>
- [36] The Board of Regents of the University of Wisconsin, *Biological Magnetic Resonance Data Bank*, [online], [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <<http://www.bmrwisc.edu/metabolomics>>
- [37] FRIEDRICH, J. O., WASYLISHEN, R. E., *A H-1 and C-13 Nuclear-magnetic-resonance Study of Carnosine*, Canadian Journal of Chemistry-revue Canadienne De Chimie, 1986, 64, 2132-2138
- [38] OZDEMIR, M. S. R., REYNGOUDT, H., De DEENE, Y., SAZAK, H. S., FIEREMANS, E., DELPUTTE, S., D'ASSELER, Y., DERAIVE, W., LEMAHIEU, I., ACHTEN, E., *Absolute quantification of carnosine in human calf muscle by proton magnetic resonance spectroscopy*, Physics In Medicine and Biology, 2007, 52, 6781-6794
- [39] CHOU, J. J.; GAEMERS, S.; HOWDER, B.; LOUIS, J. M., BAX, A., *A simple apparatus for generating stretched polyacrylamide gels, yielding uniform alignment of proteins and detergent micelles*, Journal of Biomolecular Nmr, 2001, 21, 377-382
- [40] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, USA, *Gel Funnel Specification* [on-line], [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <<http://spin.niddk.nih.gov/bax/>>
- [41] NEW ERA ENTERPRISES, Inc., *NMR Catalogue 10*, [on-line], [cit. 2010-06-03], Dostupné z WWW: <<http://newera-nmr.com/>>
- [42] SCHRODER, L., BACHERT, P., *Evidence for a dipolar-coupled AM system in carnosine in human calf muscle from in vivo H-1 NMR spectroscopy*, Journal of Magnetic Resonance, 2003, 164, 256-269