

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Studijní program: doktorský
Studijní obor: Lékařská biofyzika



MUDr. Pavlína Vyhnanovská

³¹P MR Spektroskopie transplantovaných ledvin

*Sledování MR parametrů transplantovaných orgánů a jejich korelace
s klinickým stavem pacientů*

³¹P MR Spectroscopy of Human Kidney Grafts

*Monitoring of MR parameters of human grafts and their comparison
with clinical parameters of patients*

Dizertační práce

Školitel: Ing. Milan Hájek, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

V Praze, 27.6.2011

Podpis:

Poděkování

Děkuji svému školiteli Ing. Milanovi Hájkovi, DrSc. a Mgr. Vítovi Herynkovi, PhD. za podnětné připomínky a všestrannou vytrvalou pomoc. Dále mé poděkování patří všem pacientům, lékařům a dobrovolníkům za ochotnou spolupráci při této studii a kolegům za cenné rady.

Identifikační záznam:

VYHNANOVSKÁ, Pavlína. *³¹P MR Spektroskopie transplantovaných ledvin. [³¹P MR Spectroscopy of Human Kidney Grafts]*. Praha, 2011. 70 s., 1 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky. Vedoucí práce Hájek, Milan.

Popis zadání práce

Studium energetického metabolismu transplantovaných ledvin pomocí fosforové MR spektroskopie a zjištění možnosti využití této metody v praxi u nefrologických pacientů v diagnostice dysfunkcí transplantovaných ledvin.

Obsah

Shrnutí.....	7
Shrnutí v anglickém jazyce.....	8
Použité zkratky.....	9
1. Úvod.....	11
1.1 Magnetická rezonance a MR spektroskopie	11
1.2 Cíl práce	12
2. Teoretická část	14
2.1 Fyziologie a patofyziologie ledvin	14
2.2 Transplantace ledvin	16
2.2.1 Příčina dysfunkcí transplantovaných ledvin.....	17
2.2.2 Diagnostické metody	19
2.3 MR spektroskopie	20
2.3.1 Analýza MR spekter	21
2.3.2 Fosforové spektrum	22
2.3.3 Biochemická role metabolitů	22
2.4 Vyšetřovací techniky	27
2.5 Dostupná literatura	29
2.6 Bezpečnost a hygienické normy	32
3. Experimentální část	33
3.1 Optimalizace postupu měření	33
3.2 Ověřovací experimenty s fantomy	34
3.3 Klinická část	37
3.3.1 Subjekty	37
3.3.2 Klinický vyšetřovací protokol	39
3.4 Statistika	43

4. Výsledky	45
4.1 Detailní analýza ³¹ P MR spekter transplantovaných ledvin	45
4.1.1 Opakovatelnost měření a opakovatelnost zpracování dat	46
4.2 Kvalitativní a kvantitativní zpracování získaných spekter	47
4.2.1 Transplantované ledviny	47
4.2.2 Nativní ledviny	48
4.3 Porovnání výsledků jednotlivých skupin pacientů	50
4.4 Opakované měření pacientů	51
5. Diskuze	55
5.1 Porovnání výsledků s publikovanými daty	55
5.2 Metodické poznámky	57
5.2.1 Vliv hloubky uložení ledviny od povrchové cívky	58
5.2.2 Vliv vzdálenosti ledviny od středu cívky	59
5.2.3 Omezení a nevýhody metody ³¹ P MRS	60
6. Závěr	62
6.1 Zhodnocení možností metody.....	62
6.2 Shrnutí závěrů práce.....	63
7. Příloha	64
7.1 Vyšetřovací protokol	64
8. Použitá literatura	65
9. Seznam vlastních publikací	70

Shrnutí:

Tato práce je zaměřená na studium transplantovaných ledvin pomocí fosforové MR spektroskopie. Cílem této práce je zjistit možnosti a využití této metody u pacientů po transplantaci s dysfunkcí ledviny.

Na 1,5 T MR tomografu bylo metodou 2D-CSI vyšetřeno celkem 68 pacientů po transplantaci ledviny. Pacienti byli podle klinického a histologického nálezu rozděleni do 4 skupin: akutní tubulární nekróza (ATN), epizoda akutní rejekce (AR), pozdní dysfunkce štěpu (LGD) a kontrolní skupinu K, kterou tvořili pacienti s dobrou funkcí štěpu ledviny. Během vyšetření, které trvalo 20 minut, byla měřena intenzita signálů odpovídajících metabolitům: fosfomonoestery (PME), anorganický fosfát (Pi), fosfodiester (PDE), gama, alfa a beta adenosintrifosfát (γ -, α -, β - ATP). ATP bylo měřeno s příspěvkem α - a β - adenosindifosfátu.

U pacientů s epizodou akutní rejekce bylo zjištěno signifikantní zvýšení poměrů metabolitů PME/ β -ATP, PME/Pi a PDE/Pi v porovnání s kontrolní skupinou. U skupiny s ATN bylo pozorováno snížení parametrů PDE/ β -ATP a PDE/Pi oproti kontrolní skupině. U skupiny s LGD bylo zjištěno signifikantní snížení poměru PME/Pi oproti kontrolní skupině. Skupina pacientů s AR se signifikantně odlišovala od skupiny ATN v parametru PME/Pi a PDE/Pi, od skupiny LGD v parametru PME/Pi.

Výsledky této práce ukazují, že metoda ^{31}P MRS umožňuje sledovat metabolismus transplantované ledviny a na základě porovnání poměrů relativních koncentrací rozlišit dvě základní příčiny dysfunkce ledviny v časném potransplantačním období.

Klíčová slova:

^{31}P MR spektroskopie, transplantace, epizoda akutní rejekce, metoda 2D chemical shift imaging

Summary:

The aim of this work was to evaluate the possibility to use in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy (^{31}P MRS) for the diagnosis of kidney graft dysfunction after transplantation.

A total of 68 patients with kidney grafts were examined on a 1.5T MR scanner. ^{31}P MRS was performed using the 2D-chemical shift imaging method. The patients were divided into four groups: acute rejection episodes; acute tubular necrosis; late graft dysfunction; and patients with good renal function after transplantation. We measured the signal intensities of phosphomonoesters (PME), inorganic phosphate (Pi), phosphodiester (PDE) and α -, β -, γ -adenosine triphosphate (with contribution of α -, β -adenosine diphosphate) and their ratios.

Patients with acute rejection episodes showed significantly elevated PME/ β -ATP, PME/Pi and PDE/Pi signal ratios compared to the control group. The group with acute tubular necrosis has decreased these ratios: PDE/ β -ATP and PDE/Pi compared to the control group. Patients with late graft dysfunction revealed only significant decrease of PME/Pi ratio. The group of AR patients display higher ratios of PME/Pi and PDE/Pi compared to the group of ATN patients and display higher ratios of PME/Pi compared to the group of LGD.

We conclude that ^{31}P MRS is capable to distinguish between the two main causes of graft dysfunction early after transplantation.

Keywords

^{31}P MR spectroscopy, kidney, transplantation, acute rejection episodes, chemical shift imaging

Použité zkratky:

¹ H MRS	-	protonová MR spektroskopie
2D-CSI	-	2D spektroskopické zobrazování (<i>chemical shift imaging</i>)
³¹ P MRS	-	fosforová MR spektroskopie
ANOVA	-	analýza rozptylu (<i>analysis of variance</i>)
AR	-	epizoda akutní rejekce
ATN	-	akutní tubulární nekróza
ATP	-	adenosintrifosfát
clearance	-	míra očišťovací schopnosti ledvin
Cr	-	kreatinin (μmol/l)
CT	-	počítačová tomografie
DRESS	-	<i>depth-resolved surface coil spectroscopy</i>
ESMRMB	-	European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology
FID	-	<i>free induction decay</i>
FT	-	Fourierova transformace
GF	-	glomerulární filtrace
HLA	-	znaky vyjádřené na povrchu buněk, vyvolávající imunitní reakci
ISIS	-	<i>image-selected in vivo spectroscopy</i>
K	-	kontrolní skupina
LGD	-	pozdní dysfunkce štěpu, <i>late graft dysfunction</i>
MR	-	magnetická rezonance
MRI	-	zobrazování magnetickou rezonancí - <i>magnetic resonance imaging</i>
MRS	-	magneticko-rezonanční spektroskopie
NOE	-	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
PCr	-	fosfokreatin
PDE	-	fosfodiester
pH	-	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
Pi	-	anorganický fosfát
PME	-	fosfomonoestery
Ppi	-	difosfát (pyrufosfát), anion kyseliny difosforečné
ppm	-	parts-per-million
PVE	-	<i>partial volume effect</i>

SNR	-	poměr signál/šum (<i>signal to noise ratio</i>)
TE	-	echo čas (<i>Time Echo</i>)
T _x	-	transplantace
TR	-	repetiční čas (<i>Repetition Time</i>)
T _{1w}	-	T1 vážený obraz
voxel	-	objemový element (slovo vzniklé spojením volume a pixel)

1. Úvod

1.1 Magnetická rezonance a MR spektroskopie

Magnetická rezonance (MR) patří mezi velmi šetrné neinvazivní radiodiagnostické vyšetřovací metody. Metoda byla objevena v letech 1945 – 46 (1) a původně byla použita jako fyzikální metoda pro určování magnetického momentu jader. Později se začala uplatňovat v chemii při zjišťování struktury a chemického složení látek a od konce 70. let se začala uplatňovat v medicíně, kde se stala nenahraditelnou součástí komplexu zobrazovacích metod. Je to moderní zobrazovací metoda, jejíž největší předností je, že umožňuje zobrazit jak anatomii (klasické MR zobrazování), funkci (funkční MR zobrazování), tak i biochemické procesy (MR spektroskopie), a to bez škodlivých účinků. Dává nám informace o protonové hustotě, relaxačních časech, koncentraci kovových iontů, metabolitech a intracelulární hodnotě pH. Základním principem vzniku informací pro vytvoření obrazu je změna magnetického pole tkání lidského organismu působením vysokofrekvenčního magnetického pole. Frekvence tohoto elektromagnetického záření spadá do pásma velmi krátkých rádiových vln.

V České republice se začala magnetická rezonance používat v lékařské diagnostice od roku 1988, kdy bylo v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze zahájeno vyšetřování na vůbec prvním MR tomografu. Roku 1994 byl instalován MR tomograf Magnetom Vision 1.5 T firmy Siemens. Ten byl rutinně využíván ke klinickému vyšetřování pacientů a klinickým studiím pomocí MR zobrazování. Díky spektroskopickému softwaru umožňoval techniku protonové a fosforové spektroskopie, která byla využívána jak pro výzkum, tak pro klinickou praxi. Od roku 1995 se na oddělení provádí vyšetřování pomocí kvantitativní protonové ^1H MR spektroskopie. Tato metoda se uplatňuje především ve sledování metabolismu mozkové tkáně a v klinickém provozu například při sledování pacientů s epileptickým (2) či nádorovým onemocněním mozku a pro výzkum pacientů trpících schizofrenií (3). V posledních letech byla metoda protonové spektroskopie mimo jiné využita pro studium intra- a extracelulárních lipidů ve svalové tkáni u diabetiků (4) a potomků hypertoniků (5). Od roku 1997 je na oddělení MR k dispozici speciální povrchová cívka, která umožňuje vyšetřovat technikou fosforové ^{31}P MR spektroskopie. Nejčastěji je povrchová cívka využívána k vyšetřování pacientů s metabolickým onemocněním svalu, kdy pomocí

fosforové spektroskopie je monitorován stav energetického metabolismu kosterního svalu v průběhu léčby. V posledních letech byly metodou fosforové spektroskopie sledovány změny energetického metabolismu jater u pacientů s cirhotickým onemocněním (6).

1.2 Cíl práce

Tato práce je zaměřená na studium transplantovaných ledvin pomocí MR fosforové spektroskopie. Práce vychází z předpokladu, že metabolismus jakéhokoliv orgánu se liší za fyziologických a patologických podmínek. Ledvina, a stejně tak i transplantovaná ledvina, patří mezi orgány s velmi vysokým energetickým metabolismem. Fosforová spektroskopie, tím že detekuje metabolity aktivní především v energetickém metabolismu, je vhodná ke sledování těchto změn. Dokladem toho je provedená rešerše a výsledky pilotních studií (7, 8) v *in vivo* hodnocení energetického metabolismu transplantovaných ledvin u nefrologických pacientů.

V naší práci jsme tedy již zavedenou metodu fosforové spektroskopie použili s cílem zjistit její možnosti a využití v klinické praxi. Metoda fosforové spektroskopie transplantovaných ledvin v sobě zahrnuje více medicínských oborů. Patří mezi zobrazovací metody oboru radiologie, využívá poznatky biofyziky a přibližuje se k oborům biochemie a fyziologie. Svým klinickým zaměřením na transplantované ledviny úzce souvisí s oborem nefrologie.

Předkládaná práce byla vypracována na MR oddělení Základny radiodiagnostiky a intervenční radiologie Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze, ve spolupráci s Klinikou nefrologie Transplacentra IKEM.

Hlavní cíle práce jsou shrnuty v těchto bodech:

- 1) analýza ^{31}P MR spekter transplantovaných ledvin
- 2) kvalitativní a kvantitativní zpracování získaných spekter
- 3) porovnání výsledků jednotlivých skupin pacientů
- 4) zhodnocení možností metody

V úvodu teoretické části se práce věnuje fyziologii ledvin a problematice transplantovaných ledvin. V další kapitole je zmíněn princip MR spektroskopie a měřené metabolity jsou představeny z biochemického pohledu. Následuje přehled dostupné literatury věnující se tomuto tématu. Experimentální část rozebírá problém optimalizace vyšetřovacího postupu a měření na fantomech. Součástí této kapitoly je popis klinického vyšetřování pacientů a dobrovolníků, včetně vyšetřovacího protokolu. V kapitole výsledků jsou shrnuta výsledná data a uvedeny příklady opakovaného měření. V diskuzi jsou výsledky porovnány s publikovanými daty a jsou zde rozebrány metodické poznámky. V závěru jsou uvedeny nejdůležitější poznatky. V příloze je uveden vyšetřovací MR protokol. Posledními kapitolami jsou seznamy použité literatury a vlastní publikační činnosti.

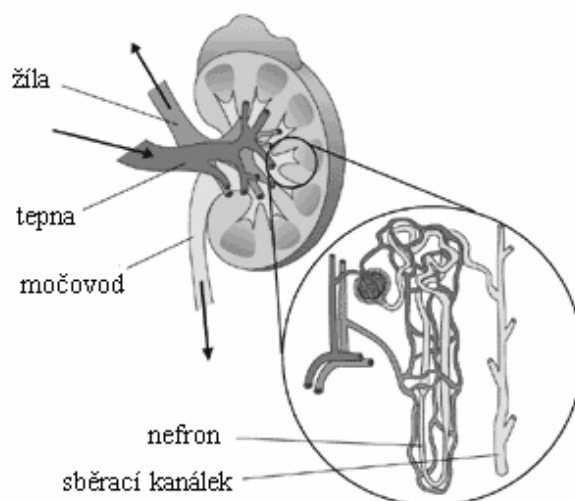
2. Teoretická část

2.1 Fyziologie a patofyziologie ledvin

Ledviny jsou párový, životně důležitý orgán. Jejich úkolem je odstraňovat toxické látky z organismu a vylučovat přebytek vody a solí. Dále se podílejí na úpravě krevního tlaku, na tvorbě vitamínu D a na tvorbě hormonu podporujícího tvorbu červených krvinek. Nepotřebné látky a nadbytečná voda se z organismu odstraňují močí a tím je kontrolována jeho rovnováha. Cílem ledvin je vyloučit maximum nežádoucích metabolitů s minimálními ztrátami nezbytných složek extracelulární tekutiny.

Parenchym ledvin zahrnuje vmezežené vazivo, ve kterém jsou uloženy krevní a lymfatické cévy a nefrony (obrázek 2.1). Nefrony jsou základní stavební a funkční jednotkou ledviny a u lidí je jich asi 2 milióny. Parenchym se podle vnitřního uspořádání dělí na kůru a dřeň, které představují dvě funkčně naprosto odlišné části renálního parenchymu. Správnou funkci ledvin umožňuje mimořádně těsný kontakt krevního oběhu s parenchymem. Bohaté krevní zásobenění ledvin zajišťuje dostatečnou dodávku kyslíku, která odpovídá energeticky náročným procesům tubulární exkrece a zpětné resorpce. Ledvinami proteče asi 20-25 % hodnoty klidového srdečního minutového objemu (400 – 430 ml/100g/min), kolem 90 % směřuje do kůry a 10 % do dřeň ledvin. Na spotřebě kyslíku se nejvíce podílí aktivní tubulární transport, především sodných iontů, o čemž svědčí morfologická charakteristika tubulárních buněk.

Fyzikální podstatou tvorby glomerulárního filtrátu je ultrafiltrace krevní plazmy v glomerulech (180 l za 24 hodin). Mezi dva základní tubulární procesy patří tubulární exkrece a reabsorpce. Na řízení těchto procesů se podílí celá řada regulačních faktorů (vazopresin, aldosteron, renin-angiotensin, atd.). Funkcí sběracích kanálků je závěrečná kvalitativní a kvantitativní úprava moči. Konečným produktem činnosti funkčního renálního parenchymu je průměrně 1-1.5 l definitivní moči (9, 10).



Obrázek 2.1: Schématické znázornění nefronu (11).

Dojde-li k onemocnění ledvin, může se stát, že jejich životně důležité funkce dále již neprobíhají, nebo jsou výrazně sniženy. V těle se začnou hromadit odpadní látky a voda, které způsobují mnohé problémy (únava, nechutenství, otoky, atd.). Organismus dokáže tolerovat hromadění odpadních látek pouze po určitou dobu, potom je nutné začít s adekvátní léčbou, která nahradí některé funkce ledvin.

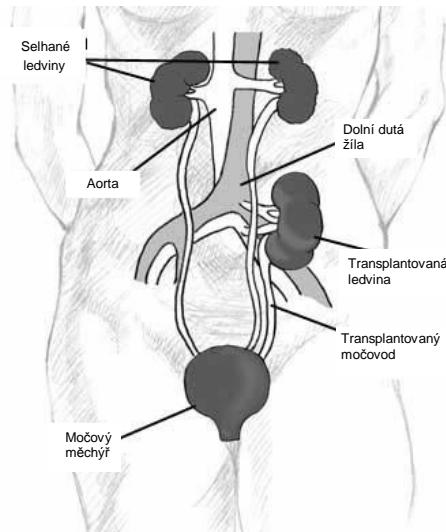
Mezi nejčastější příčiny chronické renální insuficience patří glomerulonefritida (zánět glomerulů - ledvinných klubíček), tubulointersticiální nefritida (nebakteriální zánět ledvinných kanálků), chronická pyelonefritida (bakteriální zánět ledvinných kanálků), diabetická a hypertenzní nefropatie a dědičné choroby (např. polycystóza). Při chronickém renálním onemocnění se postupně snižuje funkce ledvin na takovou úroveň, kdy dochází k výrazným změnám ve složení extracelulární tekutiny. Za selhání ledvin považujeme situaci, kdy je jejich funkce snížena na 10 %. Ledviny pak nejsou schopny udržet normální složení vnitřního prostředí, a to ani za bazálních podmínek a je nutné zahájit pravidelnou dialyzační léčbu (12).

2.2 Transplantace ledvin

Existuje více způsobů léčby selhání ledvin. Chronická dialyzační léčba (hemodialýza a peritoneální dialýza) dokáže i po několik let udržet homeostázu organismu ve vitálně přijatelných mezích, ale není ideálním řešením problému těchto nemocných. Nemocní jsou závislí na přístroji, jsou neustále ohroženi sepsí a kardiopulmonálním selháním. Optimálním řešením je transplantace ledviny. Transplantace ledviny poskytuje nemocnému oproti dialýze nejenom šanci na delší přežití, ale i lepší kvalitu života. První úspěšná transplantace ledviny byla u nás provedena roku 1966 a od tohoto data byl zahájen systematický program transplantací ledvin. V České republice platí dle transplantačního zákona č. 285 sb. z roku 2002 princip předpokládaného souhlasu. Celkově patří ČR ke špičce v počtu prováděných transplantací na světě. Většinu transplantovaných ledvin tvoří orgány ze zemřelého dárce, tzv. kadaverózní ledviny. V současné době přibývá také příbuzenských transplantací ledvin od žijícího dárce.

Imunologická bariéra organismu je jedním ze základních problémů transplantace ledviny. Všechny buňky organismu jsou nositeli antigenů, které jsou vázány na její povrch. Jde o histokompatibilní tkáňové antigeny. Hlavní systém těchto antigenů je označen jako HLA systém ("Human Leucocytes Antigen"). Nejvýznamnějšími imunokompetentními buňkami jsou malé lymfocyty. Jsou senzibilizovány proti histokompatibilním antigenům dárce. Tyto T-lymfocyty jsou odpovědné za sérii imunologických reakcí, které vedou k odhojení - rejekci transplantované ledviny. Každý nemocný na čekací listině je podroben typizaci tkáně podle HLA systému a je snaha, aby neshoda s typizovanou odebranou ledvinou byla co nejmenší. Výběr dárce ledviny může výrazně ovlivnit dlouhodobý výsledek transplantace. Pro snížení imunitní odpovědi příjemce na cizí antigeny je třeba zaručit kompatibilitu v systému ABO krevních skupin a zajistit co největší příbuznost v HLA systému tkáňovou typizací (13).

Technika transplantace se stala již rutinní metodou léčby selhání ledvin. Ledvina je příjemci voperována do podbřišku vpravo či vlevo. Jedná se o operaci *extraperitoneální*, to znamená, že ledvina je uložena mimo břišní dutinu (obrázek 2.2). Toto místo je vhodné malou vzdáleností k močovému měchýři a také pro dobrou možnost pooperační palpce a biopsie.



Obrázek 2.2: Schéma uložení transplantované ledviny v levé kyčelní jámě (14).

2.2.1 Příčina dysfunkcí transplantovaných ledvin

Pooperační průběh po transplantaci bývá až v 60 % komplikován zpomalením funkce ledviny, které se projevuje poruchou vylučování vody a elektrolytů. Laboratorně je patrná stagnace sérové hladiny kreatininu a snížená glomerulární filtrace, což někdy vyžaduje hemodialyzační léčbu. Komplikace transplantace jsou důsledkem vlastního chirurgického výkonu, imunobiologických pochodů nebo imunosupresivní léčby. V časném potransplantačním období se nejčastěji vyskytuje pooperační krvácení, močová píštěl, trombóza odvodné žíly a infekční komplikace.

Jednou z příčin, která vede k dysfunkci kadaverózní ledviny ihned po transplantaci, je **akutní tubulární nekróza (ATN)**. Tato jednotka úzce souvisí s dobou teplé a studené ischemie. U kadaverózní ledviny čas teplé ischemie (doba od přerušení oběhu v ledvině do okamžiku perfuze konzervační tekutinou) nesmí překročit 45 minut. Čas studené ischemie (doba od začátku konzervace ledviny chladným roztokem ve sterilním prostředí do transplantace) nemá překročit 10 hodin. Při ATN dojde následkem ischemie k poškození citlivých tubulárních buněk a tím k opožděnému nástupu funkce transplantované ledviny.

Závažnou komplikací je epizoda **akutní rejekce** (AR), kdy se projevují známky odhojování štěpu. Setkáváme se s ní zejména v prvních šesti měsících po transplantaci. Epizoda akutní rejekce souvisí s imunitní reakcí organismu na přítomnost cizího tělesa. Provází ji řada intracelulárních biochemických reakcí, které stimulují imunitní buňky k produkci proteinových mediátorů s lokálním působením, tzv. cytokinů (např. interferony, interleukiny, růstové faktory, aj.). Některé cytokiny vedou k množení T lymfocytů, které postupně prostupují do štěpu. V závěru dochází k zánětlivé infiltraci celého štěpu, která je vysvětlena vzájemným působením adhezivních molekul bílých krvinek (leukocytů) a cévní výstelky (endotelu). Epizoda akutní rejekce poškozuje cévní výstelku a tubuly. Ve vzorku odebrané tkáně (biopsii) je rejekce provázena infiltrátem mononukleárních buněk, intersticiálním edémem a tubulární atrofií. Tuto nežádoucí imunitní aktivitu, a s ní spojenou destrukci štěpu, se snaží potlačit imunosupresivní látky. Imunosupresiva mají selektivním způsobem zamezit aktivaci T a B lymfocytů, které jsou hlavními nositeli imunitní odpovědi na cizí antigeny. Na druhé straně nesmějí být tlumeny buňky nespecifické imunity (monocyty, makrofágy, NK buňky). Imunosupresivní léčba tedy zabraňuje rejeci štěpu ledviny, na druhé straně oslabuje protiinfekční imunitu. Nadměrná inhibice T a B lymfocytů je podkladem vzniku toxicity, která se projevuje zejména rozvojem infektů s atypickým průběhem. Přestože je dávkování imunosupresiv upravováno podle váhy pacienta a jejich hladiny jsou pečlivě monitorovány, není výskyt toxicity nikterak výjimečný. Epizody akutní rejekce lze obvykle zvládnout podáním vyšších dávek jednoho z užívaných imunosupresivních léků anebo dočasným přidáním nového imunosupresivního léku.

Mezi závažné a časté diagnózy patří **pozdní dysfunkce štěpu** (late kidney graft dysfunction, LGD), dříve označované jako chronická nefropatie štěpu. Pozdní progresivní dysfunkce štěpu představuje skupinu rozličných procesů vedoucích i přes dostatečnou imunosupresi k poškození štěpů. Je velmi obtížně ovlivnitelná a je charakterizována pomalým progresivním poklesem glomerulární filtrace (přibližně 0.5 ml/min/měs.). Její incidence je relativně vysoká, bývá diagnostikována ve většině protokolárních biopsií provedených v 1. roce po transplantaci ledviny (15). Za významný rizikový faktor pro její rozvoj je považována prodělaná epizoda akutní rejekce v prvním roce po transplantaci. Progresivní dysfunkce štěpu urychlí stárnutí ledviny a výsledkem je postupná atrofie nefronů, které jsou nahrazovány vazivovou tkání. Klinicky je provázena proteinurií, hypertenzí a postupnou ztrátou funkce orgánu (16, 17).

2.2.2 Diagnostické metody

Metodou první volby při diagnostice dysfunkcí štěpu ledviny je ultrasonografie s dopplerovským vyšetřením. Tato metoda je nejdostupnější, nejlevnější a pro některé diagnostické jednotky i nejdůležitější (například u dilatace dutého systému) (18). Problémem však zůstává diagnostika dysfunkcí v časném období po transplantaci. Akutní tubulární nekróza nemá v ultrazvukovém obraze specifický obraz, v B scanu se ATN může projevit nehomogenitou parenchymu a zvýšením pulzatilního či rezistivního indexu při dopplerovském měření. Stejně změny v sonografickém obraze často provázejí i epizodu akutní rejekce. Štěp ledviny při ní bývá zpravidla zvětšený, s širokým nehomogenním parenchymem (19). Toxicita spojená s užíváním imunosuprese (např. dříve často cyklosporinová toxicita) nevyvolává sonograficky hodnotitelné změny. Pozdní dysfunkce štěpu se projevuje rovněž nespecificky, někdy při ní bývá parenchym redukován a má vyšší echogenitu.

Další méně využívanou vyšetřovací metodou je dynamická scintigrafie transplantované ledviny, která umožňuje hodnocení perfuze a funkční schopnosti transplantátu, jeho drenáže a kinetiky horních močových cest (20).

Metodou volby a zároveň zlatým standardem je bioptické vyšetření štěpu ledviny. Výkon je prováděn v lokální anestézii, pod sonografickou kontrolou a za sterilních podmínek. Z oblasti horního či dolního pólu štěpu je speciální bioptickou jehlou odebrán malý vzorek tkáně. Výkon je časově nenáročný (cca 15 min), vyžaduje však značnou erudici lékaře. Po výkonu zůstává pacient hospitalizován na lůžku, je u něho monitorován krevní tlak a po dobu 6-ti hodin má umístěn tlakový obvaz v místě vpichu. Tento výkon je minimálně invazivní, přesto je provázen v malém procentu komplikacemi. Mezi nejčastější komplikace patří krvácení, které může vést k přechodné hematurii, vytvoření hematomu kolem štěpu, či k vytvoření krevních sraženin v močovém měchýři. Vyšší riziko krvácení je u pacientů s epizodou akutní rejekce, kdy se při biopsii snáze poruší některá z intrarenálních tepen ve velkém prosáklém štěpu ledviny. V některých případech toto krvácení vyžaduje chirurgickou revizi. Mezi časté komplikace přicházející po biopsii, patří také vytvoření arterio–venózní (av) píštěle, která vede k patologické vaskularizaci ve štěpu. Pro pacienta je bioptický výkon většinou dobře snášen, je však spojen s určitou stresovou zátěží a omezením při 24 hodinovém setrvání na lůžku. Určité procento indikovaných pacientů toto vyšetření odmítne. Téměř 10 % vzorků, tím že neobsahují

dostatečné množství zachycených glomerulů, je označeno jako nereprezentativní a histologická diagnóza nebývá stanovena, nebo musí být bioptické vyšetření opakováno.

Všechny tyto problémy a komplikace vedou k hledání nových možných neinvazivních diagnostických metod. Vedle ultrasonografie a počítačové tomografie, hraje vyšetřování pomocí magnetické rezonance stále důležitější roli v diagnostice renálních patologií (21). Nové možnosti nabízí vyšetřování pomocí MR spektroskopie.

2.3 MR spektroskopie

Metoda MR spektroskopie umožňuje neinvazivní sledování biochemických pochodů v různých orgánech a tkáních, a proto bývá někdy označována jako *in vivo* MR biopsie. Je to analytická metoda, založená na obdobném principu jako je princip MR zobrazování. Metoda spektroskopie detekuje signály z atomových jader nacházejících se v různých molekulách. V okolí těchto atomových jader dochází vlivem nabitých částic a chemických vazeb ke změně velikosti lokálního magnetického pole B_0 . Tento jev, kdy rezonanční frekvence jader dané molekuly (nebo funkční skupiny) je ovlivněna chemickou strukturou, nazýváme chemický posun. Rezonanční frekvence je pro každou funkční skupinu charakteristická. Pro popis chemického posunu je zavedena tzv. konstanta chemického posunu δ :

$$[1] \quad \delta_i = \frac{\omega_i - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}} \cdot 10^6,$$

kde ω_i je rezonanční frekvence dané chemické skupiny a ω_{ref} je rezonanční frekvence standardu, což je sloučenina zvolená konvencí (v případě ^1H MR spektroskopie se jedná o tetrametylsilan, u ^{31}P MR spektroskopie je standardem fosfokreatin PCr). Chemický posun δ je vyjádřen v jednotkách ppm (*part per milion* - milióntiny nosné frekvence).

U protonové ^1H MR spektroskopie je cívka přístroje naladěna na rezonanční frekvenci vodíku, která je při magnetickém poli $B_0 = 1,5 \text{ T}$ rovna 63,6 MHz. Pomocí ^1H MRS můžeme získat informace o zastoupení a koncentraci některých sloučenin (obsahující vodík) ve zkoumané oblasti. Například v mozku se jedná o sloučeniny N- acetyl aspartátu, kreatinu, cholinu, laktátu, atd. Signál těchto molekul je překryt

výrazně silnějším signálem vody (poměr koncentrace vody a zkoumaných molekul je 1/10 000-100 000). Tento dominantní signál je u protonové spektroskopie potřeba potlačit pomocí komplikovaných algoritmů.

Princip fosforové ^{31}P MR spektroskopie je analogický, rozdíl je v cívce a ve frekvenčním pásmu. U ^{31}P spektroskopie je tato rezonanční frekvence při magnetickém poli $B_0 = 1,5 \text{ T}$ vyladěna na frekvenci 25,8 MHz. Velkou výhodou ^{31}P MRS je nepřítomnost silného signálu vody, ale nevýhodou je menší citlivost a nižší zastoupení sloučenin obsahující fosfor (22).

2.3.1 Analýza MR spekter

Výsledkem spektroskopického vyšetření je spektrum skládající se z různých intenzivních signálů o charakteristické frekvenci. Při popisu signálů ve spektru lze získat celou řadu cenných informací. Především je to poloha signálu ve spektru, která určuje druh sloučeniny. Jde o frekvenční stupnici, která může být vyjádřena v Hz, ale častěji bývá uváděna jako chemický posun δ v jednotkách ppm. Přestože absolutní chemické posuny jednotlivých metabolitů jsou závislé na síle použitého magnetického pole, relativní jednotky umožní porovnávat signály nezávisle na použitém magnetickém poli. Poloha některých signálů ve spektru závisí na pH, dále na přítomnosti paramagnetických iontů a teplotě. Tyto závislosti jsou využívány zejména v ^{31}P spektrech, kdy z polohy signálu anorganického fosfátu lze vypočítat intracelulární hodnotu pH tkáně a z ATP signálů koncentraci $[\text{Mg}^{2+}]$ iontů. Mezi další kvalitativní charakteristiky signálu patří jeho intenzita, tvar a pološířka. Pološířka signálu závisí na homogenitě magnetického pole, mobilitě a relaxačních konstantách jádra (23). Intenzita každého signálu je závislá nejen na počtu ^{31}P jader v dané funkční skupině charakterizované chemickým posunem, ale též na relaxačních časech T1 a T2, které určují její fyzikálně chemické vlastnosti a jsou pro danou látku v daném prostředí charakteristické. Proto se u jednotlivých látek projevuje závislost na parametrech sekvence, zejména na repetičním čase TR a echo čase TE, které zodpovídají za míru vážení MR signálu relaxačními časy T1 a T2. Při kvantitativní analýze jednotlivých metabolitů ve tkáni se používá relativních koncentrací, které jsou založeny na určování poměrů intenzit jednotlivých signálů vůči sobě. Využívá se přitom faktu, že intenzita naměřeného signálu určité látky je přímo úměrná její koncentraci.

2.3.2 Fosforové spektrum

^{31}P jádra v různých metabolitech rezonují díky odlišné chemické struktuře dané látky s odlišnou frekvencí. Signály jednotlivých metabolitů jsou relativně jednoduché, protože většina metabolitů obsahuje fosfátovou skupinu v molekule pouze v jedné formě, což znamená, že je reprezentována ve spektru jednou rezonanční frekvencí (na rozdíl od protonového spektra). Výjimku představuje adenosintrifosfát ATP či adenosindifosfát ADP se třemi, resp. dvěma fosfátovými skupinami, ve spektru jsou pak tyto molekuly reprezentovány třemi, resp. dvěma signály. Fosfátové skupiny v mobilních molekulách dávají ve ^{31}P spektru ostrý signál, oproti fosfátům v imobilních molekulách – fosfolipidy v membránách, které dávají široký signál.

Ve všech orgánech a biologických tkáních lze pomocí MR spektroskopie identifikovat v rozdílné koncentraci celkem 7 metabolitů: fosfomonoestery PME (v oblasti 6,0 ~ 8,0 ppm), anorganický fosfát Pi (v oblasti 4,0 ~ 6,0 ppm), fosfodiester PDE (v oblasti 2,5 ~ 4,5 ppm), fosfokreatin PCr (v oblasti -1,5 ~ 1,5 ppm) a adenosintrifosfát γ -ATP (v oblasti -3,0 ~ -1,5 ppm), adenosintrifosfát α -ATP (v oblasti -8,0 ~ -6,0 ppm), adenosintrifosfát β -ATP (v oblasti -18,0 ~ -14,0 ppm). K signálu ATP přispívá signál ADP (α ~ -7,5 ppm, β ~ -3,0 ppm).

2.3.3 Biochemická role metabolitů

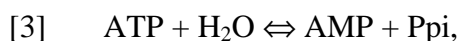
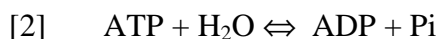
Následující kapitola shrnuje, v jakých biochemických procesech se výše uvedené metabolity zapojují. Chemické vzorce vybraných metabolitů jsou znázorněny na obrázku 2.3.

2.3.3.1 Adenosintrifosfát a fosfokreatin

Adenosintrifosfát, fosfokreatin a Pi patří mezi energetické metabolity. Adenosintrifosfát ATP je syntetizován z ADP a fosfátu a slouží jako zdroj energie pro biosyntetické dráhy. ATP se vytváří během degradace složitých metabolitů a je univerzálním meziproduktem s vysokým obsahem energie. Adenosintrifosfát se skládá z adenosinové podjednotky, k níž jsou esterovou vazbou připojeny 3 fosfátové zbytky,

navzájem vázané fosfoanhydridovou vazbou (obrázek 2.3 – strana 24). Podobnou stavbu mají adenosindifosfát (ADP) a 5'-adenosinmonofosfát (AMP).

Syntézu a hydrolyzu ATP popisují reakce popsané v rovnicích [2] a [3].



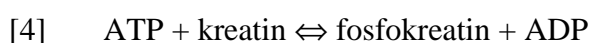
P_i a P_{pi} označují anorganický fosfát a difosfát.

ATP funguje jako spojka mezi energií bohatými fosfátovými donory a energií chudými fosfátovými akceptory. Tvorba ATP z ADP a P_i probíhá za přítomnosti enzymů (kinázy). Hydrolyza ATP na ADP a P_i je zdrojem energie pro mnoho fyziologických procesů, jako je kontrakce svalu nebo transport iontů a molekul proti koncentračnímu gradientu. ATP je nepřetržitě hydrolyzováno a regenerováno, protože jeho množství v buňce je dostačující k pokrytí potřeby volné energie jen po dobu 1 – 2 minut. Zvláště svalové a nervové buňky mají vysoký obrat ATP, proto vyžadují zásobu volné energie, jejímž zdrojem je fosfokreatin (PCr).

Chemická struktura molekuly ATP je zodpovědná za to, že je ve fosforovém spektru reprezentována právě třemi signály. K signálům α-ATP a γ-ATP přispívají sloučeniny typu nukleosiddifosfátů (α-ADP a β-ADP). Velká část nukleosiddifosfátů je vázána na makromolekuly, které nelze pomocí MR spektroskopie detekovat.

Fosfokreatin

Sloučenina fosfokreatinu PCr vzniká fosforylací kreatinu adenosintrifosfátem, za přítomnosti enzymu kreatinkinázy [4]. Fosfokreatin je při svalové činnosti hydrolyzován a dochází k přísunu ATP z ADP.



Fosfokreatin se vyskytuje hlavně ve svalových buňkách, kde je využíván jako rychlý zdroj energie při kontrakci. Běžná koncentrace ATP, ADP a P_i ve svalech jsou

5,0, 0,5 a 1,0 mmol/l, při teplotě 25 °C a pH 7,0 (24). Uvnitř každé buňky se koncentrace většiny sloučenin mění s místem i časem, proto je velmi obtížné změřit přesnou koncentraci kterékoliv chemické sloučeniny v určitém buněčném oddíle. Intenzita signálu PCr sledovaná pomocí ^{31}P MR spektroskopie se využívá k hodnocení energetického metabolismu a patří mezi hlavní parametr, který je sledovaný u metabolických svalových poruch.

2.3.3.2 Fosfomonoestery a fosfodiesterly

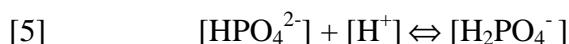
Fosfomonoestery a fosfodiesterly jsou součástí buněčných membrán. Biomembrány jsou tvořeny dvojnou vrstvou lipidů. Lipidová frakce je složitou směsí, jejichž složení se liší podle zdroje membrán (základní matrix tvoří především fosfatidylcholin). Hlavní lipidovou složkou jsou glycerofosfolipidy. Glycerofosfolipidy mají polární hlavičku tvořenou fosfátovým esterem například ethanolaminu či cholinu. Hydrofobní konec je tvořený 1,2 diacyl-*sn*-glycerolem. Glycerofosfolipidy se skládají z glycerol-3-fosfátu, který je esterifikován mastnými kyselinami a na své fosforylové skupině má navázanou skupinu X. Tím vzniká v nejjednodušším případě fosfatidová kyselina ($\text{X} = \text{H}$, v biomembránách v malém množství), častěji bývá navázán alkohol ethanolamin $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ a tím vzniká fosfatidylethanolamin, nebo cholin $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ a vzniká fosfatidylcholin, známý jako lecitin) (24). Lecitin tvoří nezbytnou součást buněčných membrán, velký význam má zvláště v nervové tkáni.

Signály PME i PDE sledovatelné při MR spektroskopii obsahují více sloučenin. PME obsahuje zejména fosforylcholin a fosforylethanolamin, což jsou prekurzory výše zmíněného fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu (obrázek 2.3) a tvoří stavební kameny membrán. K fosfomonoesterům malou měrou přispívají i dihydroxyacetonfosfát, glukosa-6-fosfát, ribosa-5-monofosfát a fruktosa-1,6-bifosfát.

Signál PDE je tvořen především glycerofosforylcholinem GPC, glycerofosfoethanolaminem GPE, mobilní frakcí velkých fosfolipidových molekul membrán a P_i pocházejícího z moče. PME a PDE se podílejí při biochemické syntéze a katabolismu fosfolipidů (25). Vzestup intracelulární koncentrace PDE lze vysvětlit změnou v syntéze fosfolipidů, nebo vzestupem volných fosfolipidů v ischemických podmínkách, nebo při nekróze - jsou uvolňovány při degradaci membrán (26, 27).

2.3.3.3 Fosfátový pufr, Pi a stanovení pH z ^{31}P MR spekter

Ledviny umožňují vylučovat jak prchavé tak neprchavé metabolity (včetně kyselin a zásad) z extracelulární tekutiny. Tím se obnovuje acidobazická rovnováha, zachovává se osmotický tlak, objem a složení extracelulární tekutiny. Na stálosti pH krve se kromě bikarbonátového nárazníku podílí ještě fosfátový pufr. Úloha fosfátu spočívá v kvantitativních posunech od baze ke kyselině. Sérové hladiny fosfátů jsou posuzovány jako anorganický fosfor. Normální hodnoty u dospělých jsou udávány okolo 0,8 – 1,6 mmol/l. Většina sérových anorganických fosfátů (85 %) je volná a fyziologicky aktivní ve formě převážně dvojmocného fosfátu $[\text{HPO}_4^{2-}]$ a jednomocného fosfátu $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ při pH 7,4 v poměru 4 : 1 [5].



Při poklesu pH tubulární tekutiny v důsledku exkrece H^+ tubulárními buňkami se celá reakce posouvá doleva. Každá z těchto forem má jiný chemický posun (δ). Díky rychlé chemické výměně protonu nepozorujeme zvlášť signál odpovídající těmto dvěma formám, ale pozorujeme jediný signál. Předpokládá se, že chemický posun $\delta(\text{Pi})$ je roven váženému průměru chemických posunů $[\text{HPO}_4^{2-}]$ a $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$. Váhové koeficienty jsou úměrné koncentracím příslušných forem kyseliny fosforečné:

$$[6] \quad \delta(\text{Pi}) = \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]\delta(\text{HPO}_4^{2-}) + [\text{H}_2\text{PO}_4^-]\delta(\text{H}_2\text{PO}_4^-)}{[\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

Rovnovážné koncentrace jednotlivých forem kyseliny fosforečné jsou dány vztahem pro rovnovážnou konstantu:

$$[7] \quad K_p = \frac{[\text{H}^+][\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

Z těchto dvou rovnic [6] a [7] lze odvodit vztah pro koncentraci protonů $[H^+]$ (28):

$$[8] \quad [H^+] = K_p \frac{\delta(P_i) - \delta(HPO_4^{2-})}{\delta(H_2PO_4^-) - \delta(P_i)},$$

jeho logaritmováním lze dostat vztah pro pH:

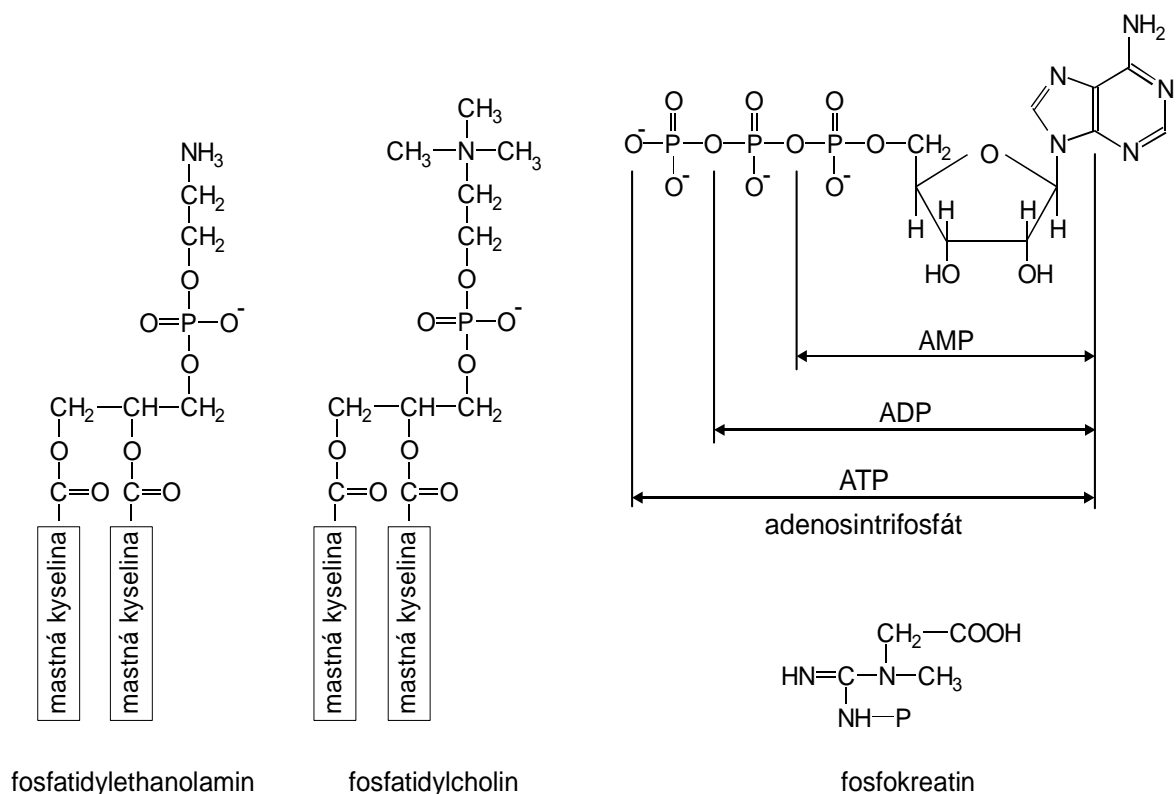
$$[9] \quad pH = pK_{p_i} + \log_{10} \frac{\delta(HPO_4^{2-}) - \delta(P_i)}{\delta(P_i) - \delta(H_2PO_4^-)}$$

Ve většině studií byl metabolit P_i vybrán jako nejvhodnější pro výpočet pH. Je velice citlivý k pH a zároveň jeho frekvence je jen málo ovlivněná koncentrací kovových iontů. Navíc má metabolit P_i ve spektru jednoduchý tvar. Chemický posun PCr je v rozmezí pH 6,0 – 8,0 stabilní, při nižším pH se poloha PCr výrazně mění.

Pro výpočet hodnoty pH byl použit shodný vzorec v našem experimentu, jako v některých publikovaných pracích (29):

$$[10] \quad pH = 6,75 + \log [(\delta - 3,27)/(5,69 - \delta)],$$

kde δ odpovídá chemickému posunu P_i v jednotkách ppm, vzhledem k PCr (30).



Obrázek 2.3: Chemické vzorce vybraných metabolitů.

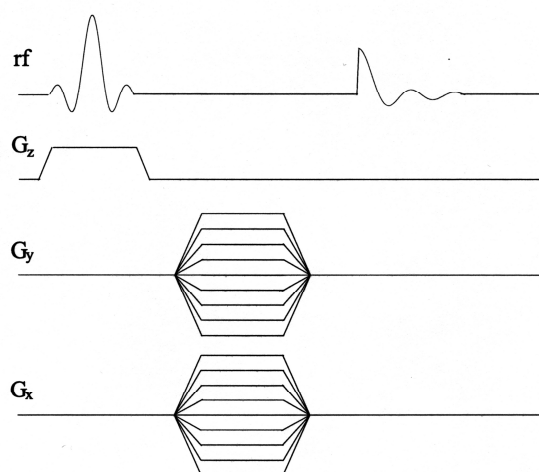
2.4 Vyšetřovací techniky

Pro *in vivo* MR spektroskopii je vypracována řada metod k naměření fosforových spekter. Vůbec nejjednodušší sekvencí je metoda jednoho pulsu, tzv. *Free Induction Decay* (FID). Lokalizace je dána vyzařovacím profilem cívky a spektrum se měří z celého objemu, který je cívce dostupný. Tato metoda se využívá při vyšetřování energetického metabolismu svalů.

V oblasti lokalizované ^{31}P spektroskopie se používají dvě základní techniky měření v různých obměnách. První z nich je ISIS (*image-selected in vivo spectroscopy*), pomocí které nakonec získáváme data z omezeného, předem zvoleného objemu. Další metodou, která byla prvně představena v 80. letech, je metoda spektroskopického zobrazování nebo-li CSI (*Chemical Shift Imaging*) (31, 32). Metoda spektroskopického zobrazování umožňuje získat současně v určitém časovém intervalu spektra z několika prostorově vymezených oblastí. Vyšetřovací sekvence spektroskopického zobrazování je založena na principu sběru fázově kódovaných signálů, čímž je tato metoda podobná technikám

známým v MR zobrazování. Výsledkem vyšetření je mapa spekter z jednotlivých objemů, které odrážejí prostorové rozložení různých metabolitů. To je mnohem výhodnější než měření pouze jednoho objemu, jako je tomu u metody jediného objemu (SVS, *single-voxel spectroscopy*), která používá frekvenčně selektivní pulzy.

Sekvence 2D-CSI spektroskopického zobrazování částečně kombinuje obě zmíněné techniky, protože obsahuje jak frekvenčně selektivní pulz, který slouží k výběru vrstvy, tak fázové kódování. Schéma sekvence popisuje obrázek 2.4. Volitelnými parametry je repetiční čas (TR), sklápěcí úhel, tloušťka vrstvy, FOV (*field of view*) a počet akumulací. Pevně je dán počet kódovacích kroků. U nás na pracovišti jsou k dispozici dvě modifikace této sekvence, a to s 8 nebo 16-ti kroky v obou směrech. Rekonstrukce signálu je tvořena víceprostorovou apodizací a FT (Fourierovou transformací) dat. Velikost *voxelu* je dána velikostí FOV a počtem kódujících kroků (*encoding steps*). Tato metoda je vzhledem k velkému vyšetřovanému objemu zatížena chybou způsobenou nižší homogenitou magnetického pole v celé snímané oblasti a tím zhoršenou kvalitou získaných spekter. Velkou výhodou však je, že umožňuje během relativně krátké doby získat informace z většího počtu voxelů (33).



Obrázek 2.4: Schéma vyšetřovací sekvence 2D-CSI.

2.5 Dostupná literatura

V letech 1992-99 byly publikovány první práce využívající ^{31}P MR spektroskopii pro sledování metabolického stavu transplantovaných ledvin *in vivo*. Tato metoda byla ověřována několika autory pro klinickou aplikaci. Cílem většiny těchto studií bylo zjistit, zda fosforová spektroskopie může přispět k diagnostice dysfunkcí transplantovaných ledvin, a tím se zařadit mezi diagnostické metody jako je renální biopsie.

První práce, zabývající se využitím ^{31}P MR spektroskopie ke sledování metabolismu izolované ledviny, byly publikovány v roce 1977 (34). S rozvojem celotělových MR tomografií a rozvojem vyšetřovacích technik se možnosti výzkumu rozšířily na další lidské orgány, jako jsou mozek, játra či srdce. Měření vlastních ledvin bylo spojeno s obtížemi, které souvisejí s hloubkou uloženého orgánu, se silnou vrstvou svalů, které je obklopují a rovněž s artefakty spojenými s dýchacími pohyby (35). Výsledky dostupných publikovaných prací shrnuje následující kapitola.

Autor Grist *et al.* (36) se zaměřil na možnost diagnostiky dysfunkcí štěpů ledvin pomocí ^{31}P MRS *in vivo*. Studie byla provedena na MR tomografu GE Signa (1,5 T), s použitím sekvence DRESS (*depth-resolved surface coil spectroscopy*), s měřicími parametry: vrstva 30 mm, 600 excitací, TR = 1500 ms, akviziční čas 15 minut a u CSI sekvence parametry: TR = 1500 ms, akviziční čas 13 minut. Spektra byla ručně zpracovávána. V první fázi autor naměřil 12 pacientů s dobrou stabilní funkcí. Ve druhé fázi byla vyšetřena skupina 21 pacientů, kteří podstoupili biopsii ledviny pro dysfunkci štěpu. U 14 pacientů byl popsán nález rejekce, u 7 pacientů byl nerejekční nález. Poměry PDE/PME a Pi/ATP v rejekčních štěpech se významně lišily od nerejekčních ledvin. (PDE/PME > 0.8 mělo 100 % senzitivitu a 86 % specificitu pro předpověď rejekce, poměr Pi/ATP > 0.6 mělo 76 % senzitivitu a 86 % specificitu pro předpověď rejekce). Autor popsal vzestup poměru Pi/ATP u pacientů s epizodou akutní rejekce, a potvrdil tak výsledky získané i na experimentálních studiích. Tuto změnu autor vysvětloval hydrolýzou fosfátu vlivem ischemie. U rejekce byl pozorován vzestup PDE a Pi a relativní redukce β -ATP.

Cílem práce Heindela *et al.* (26) bylo studovat funkci transplantovaných ledvin *in situ* a detekovat patologické změny u 37 pacientů. Spektra byla naměřena na 1,5 T MR systému, Gyroscan S 15, Philips s použitím sekvence ISIS a parametry TR = 2 s, excitace

1024, akviziční čas 34 minut, velikost měřeného objemu byla průměrně 174 ± 52 ml, měřící doba 90 minut. Z celkové skupiny mělo 20 pacientů stabilní funkci, epizoda akutní rejekce byla histologicky verifikována u 5 pacientů, pozdní dysfunkce štěpu u 2 pacientů a ATN byla diagnostikována u 10 pacientů. U transplantovaných ledvin s epizodou akutní rejekce bylo zjištěno v porovnání s kontrolní skupinou zvýšení $P_i/\alpha\text{-ATP}$ ($0,40 \pm 0,16$ vs. $0,22 \pm 0,11$, $P = 0,01$) a snížení vypočtené hodnoty pH. U skupiny ATN došlo ke snížení parametru PME/PDE oproti kontrolní skupině. Skupinu pacientů s epizodou akutní rejekce a ATN bylo možné podle autora odlišit pomocí hodnoty pH. U pacientů s pozdní dysfunkcí štěpu a těžkou ATN byl redukován poměr PME/ P_i (pravděpodobně díky vzestupu P_i).

Autor Klemm *et al.* (27) použil na celotělovém 1,5 T MR systému Gyroscan II, Philips sekvenci ISIS s parametry TR = 2,5 s, FID 2000 Hz u skupiny 34 pacientů po transplantaci ledviny. Autor sledoval vývoj poměru PME/PDE v závislosti na době po Tx a zjistil dobrou korelaci s úspěšností transplantace ($r = 0,66$). Předpokládá, že tato změna v časném potransplantačním období odpovídá regeneraci buněčných membrán. Rovněž bylo zjištěno signifikantní snížení $\beta\text{-ATP}$ u skupiny pacientů s epizodou akutní rejekce. U pacientů s ATN pozoroval snížení parametru PME/PDE. U pacientů s cyklosporinovou toxicitou nebyly pozorovány žádné změny. Z uvedeného článku vyplývá, že pomocí ^{31}P MR spektroskopie spekter získanými technikou ISIS, byla odlišena skupina s dobrou funkcí od skupin s AR a ATN.

Autor Seto *et al.* (37) se soustředil na dlouhodobou prognózu přežívání transplantovaných ledvin. U skupiny 20 pacientů získal fosforová spektra metodou ISIS. Hodnotu poměru $\beta\text{-ATP}/P_i > 1.2$ autor navrhl jako vhodný parametr pro predikci 3-letého a 5-letého přežívání.

Autor Kugel *et al.* (38) se ve své studii zaměřil na výpočet absolutních molárních koncentrací fosforových metabolitů v transplantované ledvině a to na skupině 5 pacientů s dobrou funkcí štěpu. Spektra byla získána modifikovanou ISIS technikou na celotělovém 1,5 T MR tomografu, s využitím povrchové cívký a fantomu umístěném v centru cívký, který sloužil ke kalibraci a identifikaci pozice.

Autor Boska *et al.* (39) porovnával fosforová spektra normálních zdravých ledvin a dobře fungujících renálních štěpů, s cílem zjistit vliv transplantace ledviny na jejich metabolismus. Bylo vyšetřeno 14 dobrovolníků a 6 pacientů. Spektra byla získána na MR tomografu Philips Gyroscan 2T, metodou ISIS (parametry: TR = 2000 ms, počet bodů 512, spektrální šíře 3000 Hz, počet akvizic 600 – 2700). Žádné či jen malé množství

fosfokreatinu potvrzovalo správný výběr měřené oblasti, bez příspěvku okolních svalů. Při porovnání obou skupin se poměry metabolitů signifikantně nelišily, poměr PME/ATP u transplantovaných ledvin byl v porovnání s kontrolní skupinou jen mírně zvýšen. Navzdory praktickým problémům spojeným s hloubkou orgánů, dýchacími pohyby a heterogenní tkání ledvin, výsledky potvrdily možnost získat ^{31}P MR spektra z ledvin nativně uložených i transplantovaných.

Autor Ratcliffe *et al.* (29) studoval v experimentálních podmínkách na horizontálním TMR-32 tomografu energetické změny buněk při akutním renálním selhání na podkladě hemoragické hypotenze. Na skupině potkanů (Wistar) koreloval ATP, Pi, pH před, během a 1 hod po hemoragické hypotenzi, která trvala 30 – 40 minut. U zvířat, kde nebyly prokázány žádné změny v metabolitech během hypotenze, retransfuze okamžitě navodila normální renální funkci. Pokud se během hypotenze změny objevily, byly provázené výrazným snížením ATP, nahromaděním Pi a intracelulární acidózou. Současně byla pozorována snížená renální funkce v období po provedené hemoragické hypotenzi. Snížení funkce bylo vysvětleno změnami, které jsou u lidí podkladem akutní tubulární nekrózy. Výsledkem práce je tvrzení o možnosti rozlišit prerenální selhání, od časně nebo počínající akutní tubulární nekrózy, na základě změn energetického stavu ledvinných buněk během hemoragické hypotenze. Výsledky práce připouští rozdílnou citlivost renálních buněk k ischemii.

V experimentálních podmínkách autoři Chan *et al.* a Shapiro *et al.* (40, 41) studovali změny makroergních fosfátů a intracelulární hodnoty pH u normálních funkčních ledvin na potkanech, dále u dysfunkcí způsobených rejekcí, ischemií, cyklosporinovou toxicitou a městnáním v dutém systému. U epizody akutní rejekce a dysfunkce na podkladě ischemie byl popsán vzestup poměru $\text{Pi}/\alpha\text{ATP}$ a nižší vypočtená hodnota pH u ischemie. Hodnota pH umožnila přesně rozlišit jednotlivé příčiny zhoršené funkce štěpu. Zhoršení funkce na podkladě dilatace dutého systému bylo spojeno se zvýšením PDE/Pi signálu. Ledviny s diagnostikovanou cyklosporinovou toxicitou se neodlišovaly od kontrolní skupiny v žádném ze sledovaných parametrů.

Práce autorky Kurkové *et al.* (42) byla provedena na našem pracovišti v letech 1993 – 1995 a jejím cílem bylo pomocí ^{31}P MRS sledovat metabolismus kadaverózních ledvin *ex vivo*. Na skupině 18 kadaverózních ledvin, které byly perfundované roztokem Euro-Collins, byla měřena a vyhodnocována fosforová spektra. Intracelulární anorganický fosfát (Pii) a anorganický fosfát přítomný v perfuzním roztoku (Pie) byl oddělen dekonvoluční technikou. Poměr PME/Pii byl použit jako marker viability, který byl

korelován s funkcí ledviny po transplantaci. Úspěšné rozlišení intracelulárního Pii a Pie v roztoku bylo možné v 72 %. Výsledek MR analýzy v 78 % koreloval s funkcí ledviny po transplantaci.

Autor Niekisch *et al.* (43) použil metodu ^{31}P MR spektroskopie s vyšetřovací sekvencí 2D-CSI k pretransplantačnímu hodnocení viability štěpů. Celkem bylo na 2,0 T MR tomografu vyšetřeno 16 štěpů, spektra byla vyhodnocena pomocí automatického softwaru MatLab. Studie potvrdila signifikantní závislost mezi poměrem PME/Pi a funkcí štěpu ledviny po transplantaci.

Z provedené rešerše článků vyplývá, že byla provedena celá řada studií zabývajících se využitím fosforové spektroskopie u transplantovaných ledvin. Jen u málo z nich bylo použita vyšetřovací metoda chemického spektroskopického zobrazování (CSI) na větším souboru pacientů.

2.6 Bezpečnost a hygienické normy

Magnetickou rezonancí byli vyšetřováni jen ti pacienti a dobrovolníci, kteří splňovali obecné bezpečnostní podmínky MR pracoviště. Implantovaný kardiostimulátor, kovové implantáty, kovové cévní svorky a některé starší typy chlopenních náhrad byly absolutní kontraindikací vyšetření. Pacienti po transplantaci ledviny, kteří trpěli klaustrofobií nebyli osloveni. Před vstupem do vyšetřovací místnosti byli pacienti a dobrovolníci vyzváni k odložení všech kovových předmětů (včetně hodinek, kreditních karet, peněženek, klíčů a mobilních telefonů).

3. Experimentální část

3.1 Optimalizace postupu měření

Pro optimalizaci měřicího postupu bylo zpočátku nutné zjistit nejvýhodnější parametry vyšetřovací sekvence.

Výběr orientace měřené vrstvy

V úvodu experimentu bylo naměřeno několik pacientů s různou orientací vyšetřované vrstvy ve 2D-CSI sekvenci. Cílem bylo nalézt tu orientaci vrstvy, při které vyšetřovaný objem obsahoval co největší množství ledvinné tkáně. Z porovnání výsledků vyplynulo, že touto rovinou je rovina koronální (paralelní s povrchovou cívkou).

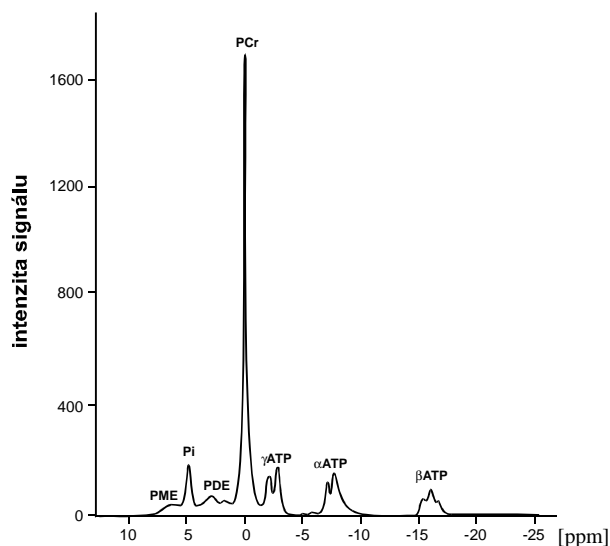
Repetiční čas

V literatuře autoři uvádějí repetiční čas v hodnotách 1500 – 2500 ms. V naší studii byl použit relativně krátký repetiční čas s hodnotou 323 ms, s maximálním počtem akvizic 32. Při hledání optimálního měřicího protokolu byly vyzkoušeny dva repetiční časy (celkem 7 pacientů bylo naměřeno s repetičním časem 323 a 700 ms, s počtem akvizic 32 a 16). Při porovnání nebyl zjištěn signifikantní nárůst poměru S/N v případě měření s delším repetičním časem 700 ms při 16 akvizicích, proto byl v této práci zvolen krátký repetiční čas 323 ms.

Partial Volume Effect

Nevýhodou povrchových cívek je zejména fakt, že intenzita snímaného signálu není homogenní ve všech oblastech, ale že klesá s rostoucí vzdáleností od cívky. Rovněž je při vyšetřování povrchovými cívkami výrazný vliv sousedních tkání – tzv. *Partial Volume Effect* (PVE). Tento vliv se uplatňuje i při měření fosforových spekter z oblasti transplantovaných ledvin. Výsledky některých publikovaných studií dokazují, že ledvina měřená *in vitro* neobsahuje metabolit fosfokreatinu (39), či jen ve velmi malém množství (44). Ve většině našich spekter byl právě vlivem PVE tento signál pozorován. Signál fosfokreatinu PCr pochází z okolních svalů, zejména ze svalů břišní stěny. Ve spektru měřeném čistě ze svalové tkáně získáme 7 signálů, s výrazným signálem PCr. Dalšími

měřitelnými signály jsou fosfomonoestery PME, anorganický fosfát Pi, fosfodiester PDE a 3 signály ATP (obrázek 3.1). Lze předpokládat, že tyto signály mohou částečně přispívat k výsledným intenzitám získaných z transplantované ledviny. Příspěvek těchto metabolitů byl testován porovnáním intenzity signálu PCr získaným z ledviny a z lýtkového svalu. Z tohoto testu vyplývá, že přibližně 6 % intenzity ATP, Pi, PDE odpovídá okolním tkáním. Naše výsledky jsou srovnatelné s výsledky zjištěnými autorem Klemmem *et al.* (27). Přispívání signálů z okolních tkání do výsledného spektra není možné zcela potlačit, signál PCr je však možné s výhodou použít jako vnitřní standard pro stanovení chemických posunů, které mohou být použity pro výpočet intracelulární hodnoty pH.



Obrázek 3.1: Fosforové spektrum lýtkového svalu zdravého dobrovolníka, měřené metodou jednoho pulsu (FID, *Free Induction Decay*).

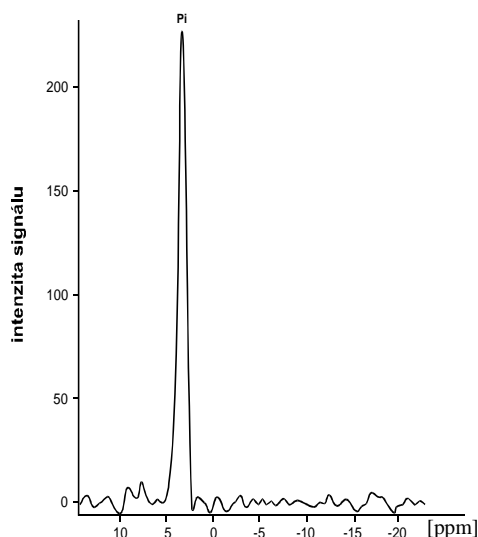
3.2 Ověřovací experimenty s fantomy

K lepšímu pochopení dat, které spektroskopické metody poskytují a které odrážejí složité biochemické děje *in vivo*, slouží experimentální měření a výzkum na fantomech.

Vliv náplně dutého systému

Zvolený objem, ze kterého bylo spektrum u pacientů měřeno, zasahoval často do dutého systému štěpu ledviny. Biochemické složení moče je známé - moč obsahuje z 95 % vodu, 2,5 % obsahu tvoří močovina a zbytek minerály, enzymy, hormony a soli (viz tabulka 3.1). Při obvyklém složení potravy pH definitivní moče kolísá v rozmezí 4,5 – 7,8 (9). Nás zajímalo, jaké spektrum získáme, naměříme-li metodou spektroskopie vzorek moči.

K zodpovězení této otázky jsme provedli měření na fantomu. Jako fantom jsme použili láhev se vzorkem ranní moče. Použili jsme standardní 2D-CSI sekvenci s parametry: TR = 323 ms, TE = 3 ms, sklápěcí úhel = 90°, tloušťka vrstvy = 30 mm, FOV = 320 mm, počet akvizic 32, matrix 1024 bodů. Na obrázku 3.2 je zobrazeno výsledné spektrum s jediným dominantním signálem v poloze 2,8 ppm, který odpovídá anorganickému fosfátu v tubulární tekutině. Tento signál může přispívat do PDE signálu. Někteří autoři se domnívají v souvislosti s nízkým pH moče, že se chemický posun P_i v moči blíží chemickému posunu PDE. Přisuzují tak nárůst PDE vzestupu anorganického fosfátu P_i , který je například při obstrukci dutého systému přítomen v moči ve větším množství (36).



Obrázek 3.2: Fosforové spektrum získané z fantomu obsahujícího vzorek moče, dominantní signál odpovídá anorganickému fosfátu v tubulární tekutině (měřené metodou 2D-CSI).

Fantom s plnou heparinizovanou krví

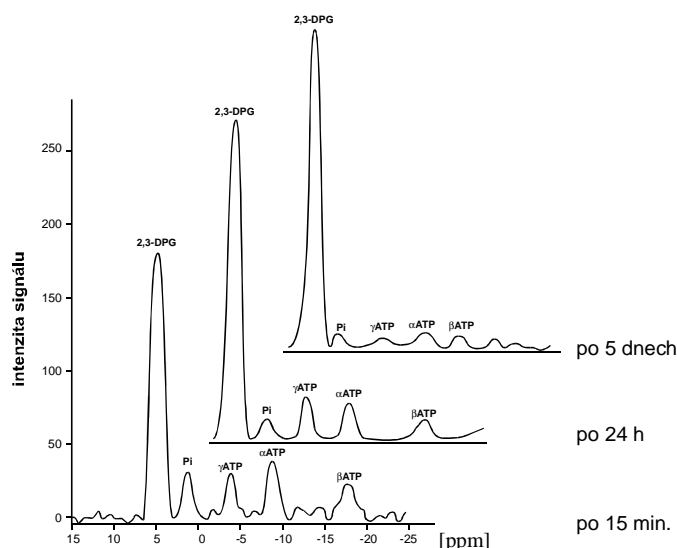
Dále jsme si kladli otázku, jak ovlivňuje měřené spektrum bohaté krevní zásobené ledviny. Krev je suspenze buněčných elementů v krevní plazmě. Krevní plazma je slabě zásaditý vodný roztok bílkovin, elektrolytů a malých organických molekul. Mezi elektrolyty, kromě sodíku, chloridu a hydrogenkarbonátu, nalezneme pro nás zajímavý anorganický fosfor, a to v koncentraci 0,60 – 1,40 mmol/l. Malé organické molekuly představují kreatin v koncentraci 0,06 – 0,10 mmol/l, kreatinin 55 – 110 μmol/l a fosfolipidy 1,8 – 2,5 mg/l (9, 45), viz tabulka 3.1. Složení krve je za fyziologických podmínek stálé, podíl plazmy z celkové extracelulární tekutiny je 25 %.

Provedli jsme test na fantomu naplněném 0,45 l krve s příměsí 10 000 j. heparinu (krev byla zajištěna z klinického oddělení od pacienta s polycytémií). Pro naměření byla použita 2D-CSI sekvence s parametry uvedenými v protokolu. V naměřeném spektru s plnou heparinizovanou krví byl patrný dominantní signál s chemickým posunem 5 ppm, odpovídající difosfoglycerolu (2,3-DPG) v erythrocytech. Vyšetření s fantomem bylo opakováno ještě 2. a 5. den. Získané spektrum s difosfoglycerolem a klesajícími hodnotami Pi a ATP zobrazuje obrázek 3.3.

Tabulka 3.1: Koncentrace základních látek v krevní plazmě a v definitivní moči za fyziologických podmínek (9).

Substance	Jednotka	Plazma	Moč	Změna koncentrace po průchodu ledvinami
H ₂ O	%	90-93	95	-
Bílkoviny, tuky a jiné koloidy	g/l	68-84	-	-
Glukosa	mmol/l	4,0-6,2	-	-
Na ⁺	mmol/l	136-148	160-170	1
Cl ⁻	mmol/l	95-110	159-170	2
Močovina	mmol/l	3,0-7,6	192-365	60
Kyselina močová	μmol/l	215-420	2,04-3,96	12
NH ₄ ⁺	mmol/l	12-55	480-2200	40
Ca ²⁺	mmol/l	2,15-2,61	2,50-5,5	2
Mg ²⁺	mmol/l	0,66-0,94	1,5-2,5	2
Anorganický fosfor	mmol/l	0,65-1,40	10,4-25,9	16
Kreatinin	μmol/l	65-110	4,35-13,2	75

Výsledky fantomu s močí a heparinizedovanou krví potvrzují domněnku autora Heindela *et al.* (26) a Bosky *et al.* (39), že krev i moč tvoří ne zcela zanedbatelnou porci měřeného objemu ledviny, ale obsahují jen málo fosfátových metabolitů, a nemají tak významný vliv na výsledné fosforové spektrum. Aby přesto naplněný dutý systém co nejméně ovlivňoval měřené spektrum, byla MR vyšetření prováděna s prázdným močovým měchýřem.



Obrázek 3.3: 3 fosforová spektra získaná z fantomu obsahující 0,45 l heparinizedované krve 15 minut po odběru, za 24 hodin a 5. den po odběru (měřeno metodou 2D-CSI).

3.3 Klinická část

3.3.1 Subjekty – pacienti a dobrovolníci

Klinická část práce vznikla ve spolupráci s Klinikou nefrologie IKEM, kde větší část pacientů tvoří pacienti po transplantaci ledviny. Náš soubor pacientů tvořili muži a ženy, kteří byli v době vyšetření magnetickou rezonancí hospitalizováni na Klinice nefrologie. Všechna vyšetření byla provedena se souhlasem ošetřujícího lékaře a vedoucího lékaře oddělení. Vyšetřovaní byli vybíráni v první části náhodně s rozdílnou funkcí štěpu, ve druhé části byli vyšetřováni pacienti se zhoršenou funkcí štěpu, kterým

bylo indikováno histologické vyšetření. Celý soubor pacientů obsahoval transplantované ledviny s širokým spektrem funkčnosti (od fyziologické funkce až po hrubě patologické dysfunkce a nefunkční štěpy). Pacienti byli rovněž i v širokém rozmezí od transplantace. Nejčasnější měření bylo prováděno 4. den po operaci, nejdéle 16 let po transplantaci, průměrná doba od transplantace byla 15 ± 42 měsíců. Do experimentu nebyli zahrnuti pacienti v těžkém zdravotním stavu. Každý z pacientů byl předem seznámen s cílem studie a vyšetření mu bylo podrobně vysvětleno. Vyšetřovací protokol byl schválen Etickou komisí. Pokud pacient souhlasil s vyšetřením, podepsal písemný souhlas - poučení pro nemocné před vyšetřením magnetickou rezonancí.

Celkem bylo vyšetřeno 87 pacientů s transplantovanou ledvinou. Data 12 pacientů byla z dalšího zpracování vyloučena z důvodu technické chyby či příliš hluboko uložené ledviny.

Statisticky bylo hodnoceno celkem 68 pacientů (z toho 47 mužů, 21 žen, průměrný věk $47,1 \pm 11,9$ let). Pacienti byli rozděleni do 4 skupin: kontrolní skupinu K tvořili pacienti s dobrou stabilní funkcí štěpu ($n = 31$), ATN – pacienti s akutní tubulární nekrózou ($n = 6$), AR – pacienti s epizodou akutní rejekce ($n = 20$), LGD – pacienti s pozdní dysfunkcí štěpu ($n = 11$). U všech měřených pacientů byly v době spektroskopického vyšetření sledovány dostupné laboratorní a klinické informace: věk pacienta, doba od transplantace, hladina kreatininu, glomerulární filtrace, nutnost dialýzy, sonografické vyšetření, histologické vyšetření, hladina imunopresiv. Klinická data pacientů jednotlivých skupin shrnuje tabulka č. 3.2. Ve většině případů se jednalo o ledviny od kadaverozních dárců, u třech pacientů byla provedena příbuzenská transplantace od žijícího dárce.

Tabulka 3.2: Výsledky biochemických a klinických testů pacientů (průměrné hodnoty a směrodatné odchylky).

	K	ATN	AR	LGD
Počet pacientů	31	6	20	11
Věk pacientů [roky]	$48,7 \pm 11,9$	$56,4 \pm 10,6$	$41,7 \pm 9,7$	$47,5 \pm 11,8$
Doba od transplantace [měsíce]	$15,0 \pm 43,1$	$0,4 \pm 0,3$	$0,9 \pm 1,3$	$55,7 \pm 70,8$
Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	134 ± 32	901 ± 325	249 ± 195	228 ± 62
Glomerulární filtrace [ml/s/1,73 m^2]	$1,00 \pm 0,38$	$0,13 \pm 0,13$	$0,69 \pm 0,30$	$0,53 \pm 0,24$
Cyclosporin [ng/ml]	203 ± 91	182 ± 23	218 ± 100	179 ± 57

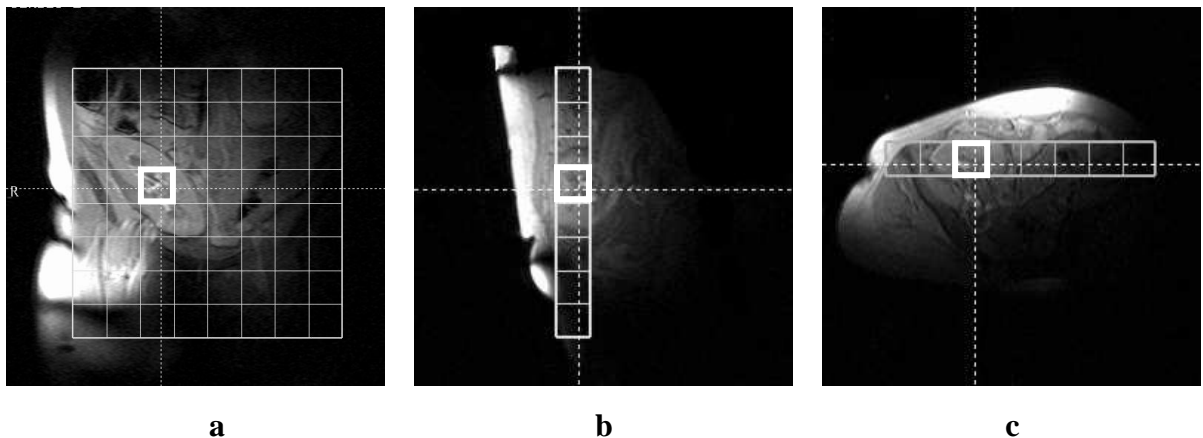
Během experimentu vyvstala otázka, jak vypadá spektrum získané z nativních zdravých ledvin naměřené stejnou metodou, kterou byli vyšetřováni ostatní pacienti. Proto byla naměřena malá skupinka zdravých dobrovolníků (4 muži a 1 žena, průměrný věk $26,5 \pm 5,8$ let). Tito dobrovolníci v době měření nebyli léčeni ani sledováni pro žádné onemocnění ledvin a močových cest. Získaná spektra sloužila pro porovnání výsledků transplantovaných ledvin a nativních ledvin.

3.3.2 Klinický vyšetřovací protokol

Všechny subjekty byly vyšetřeny na celotělovém MR tomografu Magnetom Vision 1.5 T firmy Siemens s použitím $^1\text{H} / ^{31}\text{P}$ povrchové cívky. Před vyšetřením byli pacienti i dobrovolníci poučeni. Vyšetřované osoby byly měřeny v poloze na zádech. Po uložení na vyšetřovací lůžko byla pacientovi umístěna povrchová cívka do pravé či levé kyčelní jámy (podle umístění štěpu ledviny). Cívka byla ve zvolené poloze fixována dvěma pásy se suchým zipem. V případě zdravotních problémů během vyšetření, pacient informoval vyšetřující personál kontrolním signalizačním balónkem.

MR zobrazování

Vlastní protokol měření (viz. příloha 1) obsahoval naměření T1 vážených obrazů multi-slice ve všech třech rovinách: transversální, koronální, sagitální (obrázek 3.4) s využitím duální $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ cívky. Použité parametry byly následující: TR (*repetition time*) = 15 ms, TE (*echo time*) = 6 ms, sklápěcí úhel (*flip angle*) = 30° , *field of view* FOV = 450 mm, tloušťka vrstvy 10 mm, akviziční čas 1 min 12 s). Úvodní obrázky sloužily k orientaci a k umístění vrstvy měření. Pokud nebyla povrchová cívka umístěna přesně nad uloženým štěpem ledviny, byla cívka posunuta do optimální polohy a zavaděcí obrázky znovu naměřeny. Po umístění měřicí vrstvy byla cívka přepnuta na fosforovou frekvenci (25,8 MHz).



Obrázek 3.4: T1- vážené obrazy transplantované ledviny **a)** v koronární rovině, **b)** v sagitální rovině a **c)** v transversální rovině, s vyznačenými oblastmi, ze kterých byla snímána spektra.

Vyšetřovací sekvence 2D-CSI

Vyšetřovací sekvence CSI_31P_ledviny, která je na MR tomografu k dispozici, je variantou sekvence 2D spektroskopické zobrazování (2D *chemical shift imaging*, 2D-CSI). Parametry této sekvence byly následující: počet kódovacích kroků 8 (8 x 8 *phase encoding steps*), počet akumulací = 32, repetiční čas TR = 323 ms, TE = 3 ms, FOV = 320 mm, základní sklápěcí úhel φ_0 (*flip angle*) = 90°, tloušťka vrstvy 30 nebo 40 mm, objem *voxelu* 4 x 4 x 3 cm (48 cm³) nebo 4 x 4 x 4 cm (64 cm³), celkový měřicí čas 11 min 1 s. Měření bylo prováděno s automatickým shimem, který optimalizoval homogenitu magnetického pole. Oblast zájmu (*volume of interest* (VOI)) byla zvolena z úvodních MR obrazů, u 52 pacientů byla oblast zájmu VOI = 48 ml a u 16 pacientů byla VOI = 64 ml. Celková doba vyšetření byla kolem 20 minut.

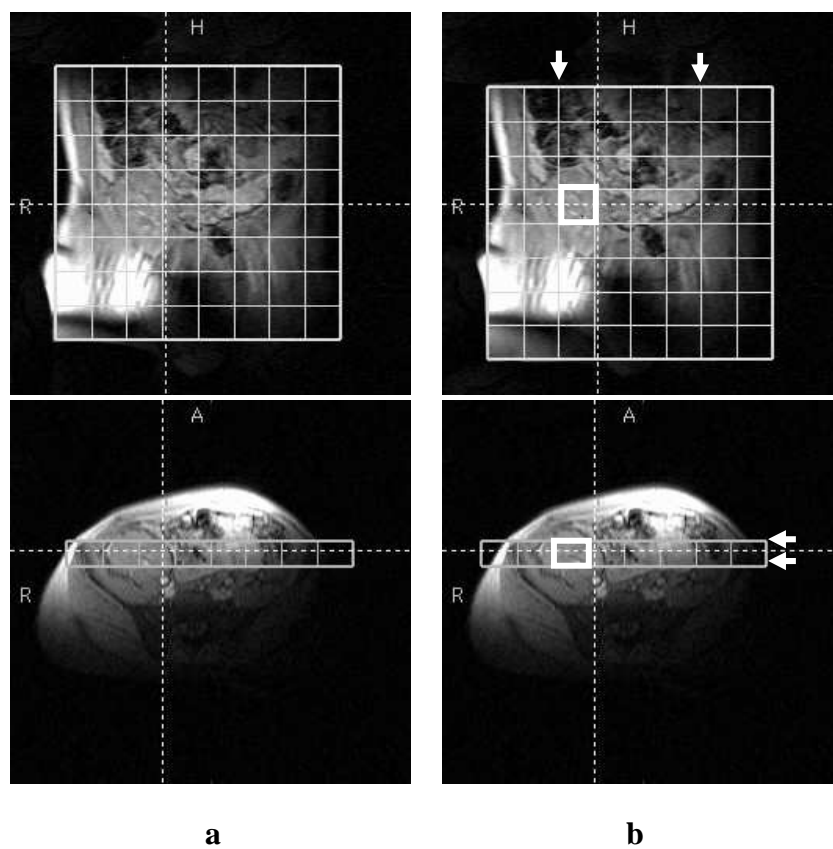
Zpracování MR spekter

Pro zpracování fosforových spekter byl vytvořen jednotný protokol, kterým byla vyhodnocena všechna spektra. Spektra byla vyhodnocována manuálně na pracovní stanici Sun, s využitím softwaru Numaris 3, který je součástí vybavení tomografu Siemens Vision 1.5 T. Vlastnímu zpracování předcházela posun vyšetřovací 2D síť do požadovaného místa, obsahujícího v našem případě co největší objem ledviny. Ukázka posunu sítě do centra ledviny je zobrazena na obrázku 3.5.

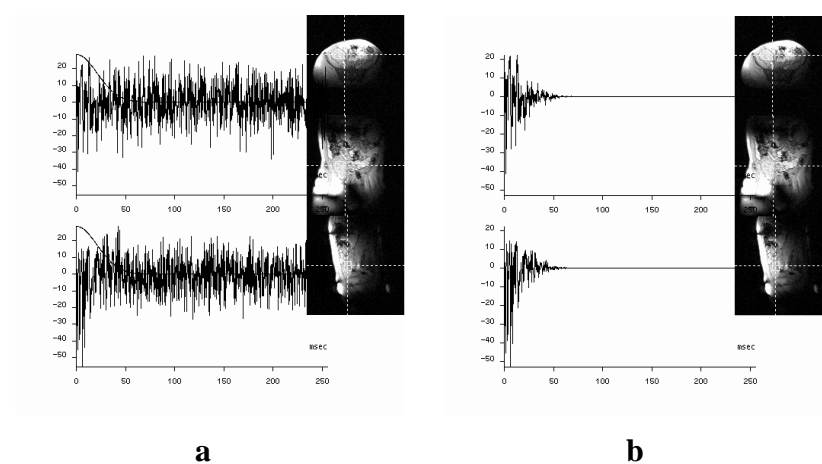
Při zpracování MR signálu se provádí tzv. postprocessing, který zahrnuje několik kroků. Prvním krokem byla apodizační funkce, která funguje jako frekvenční filtr a má za následek potlačení šumu a zlepšení poměru signál/šum. Při aktivní apodizaci je patrné zachování intenzity počátečních bodů a potlačení šumu v místech, kde MR signál již vymizel. V našem vyhodnocovacím protokolu byla zvolena apodizační funkce gaussovského typu s počátkem v nule a s pološířkou 30 ms (viz obrázek 3.6). Dalším krokem byl převod z časové domény do frekvenční domény, pomocí Fourierovy transformace. Následoval automatický frekvenční posun. Poté se prováděla ruční fázová korekce nultého (konstantního) a prvního (lineárního) řádu. Při fázové korekci je cílem získat všechny signály ve vybraném rozmezí s kladnou amplitudou a se symetrickými patami signálu. Snahou je, aby tvar signálu odpovídal *absorpční Lorenzově křivce*. Správné fázování, především spekter s nízkým S/N je silně závislé na zkušenosti operátora. Dalším krokem byla korekce základní čáry (baseline), která slouží k potlačení šumu (artefaktů) a ke srovnání sledovaných signálů do jedné linie (odstraňuje vliv konečné doby snímání časové odezvy). Základní čára má za úkol rovněž potlačit i široké signály především málo mobilních molekul fosfolipidů, které vytvářejí pozadí spektra. Korekce základní čáry byla prováděna v rozsahu chemických posunů od 15,00 do -20,00 ppm. V našem případě byla užitá polynomická varianta proložení základní čáry, tzn. že základní čára je fitována polynomickou funkcí, která je následně od spektra odečtena. Korekce základní čáry patří mezi subjektivně posuzovanou proceduru a může způsobit i hrubé odchylky ve výsledných intenzitách signálů. Proto byla spektra v tomto experimentu zpracovávána opakovaně a jedním operátorem.

Závěrečné vyhodnocení spektra spočívá ve fitování vybraných signálů konvolucí gaussovských křivek, kdy dekonvolucí získáme parametry jednotlivých signálů: intenzitu, pološířku a chemický posun. Plocha pod křivkami (integrál křivky) jednotlivých signálů odpovídá jejich intenzitám. Chemický posun, neboli vzájemná vzdálenost a pozice

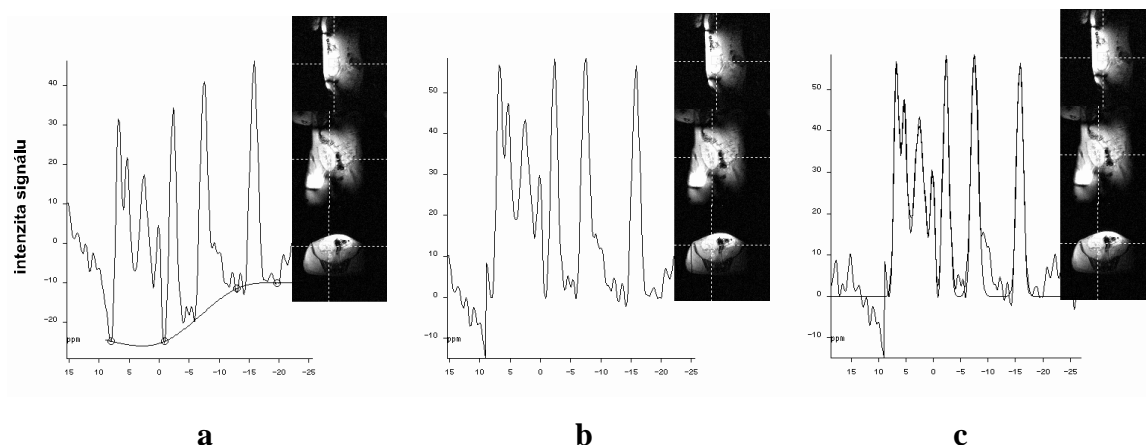
ve spektru, umožňuje vlastní identifikaci získaných metabolitů. Ruční zpracování jednoho fosforového spektra trvalo cca 45 minut. Průběh vyhodnocovacího procesu je zachycen na obrázku 3.7.



Obrázek 3.5: Úprava pozice sítě. Pozice sítě v koronální rovině (horní řádek) a transversální rovině (dolní řádek) **a)** před posunem, **b)** po posunu sítě.



Obrázek 3.6: Vliv apodizační funkce: **a)** funkce apodizace inaktivní, **b)** funkce apodizace aktivní.



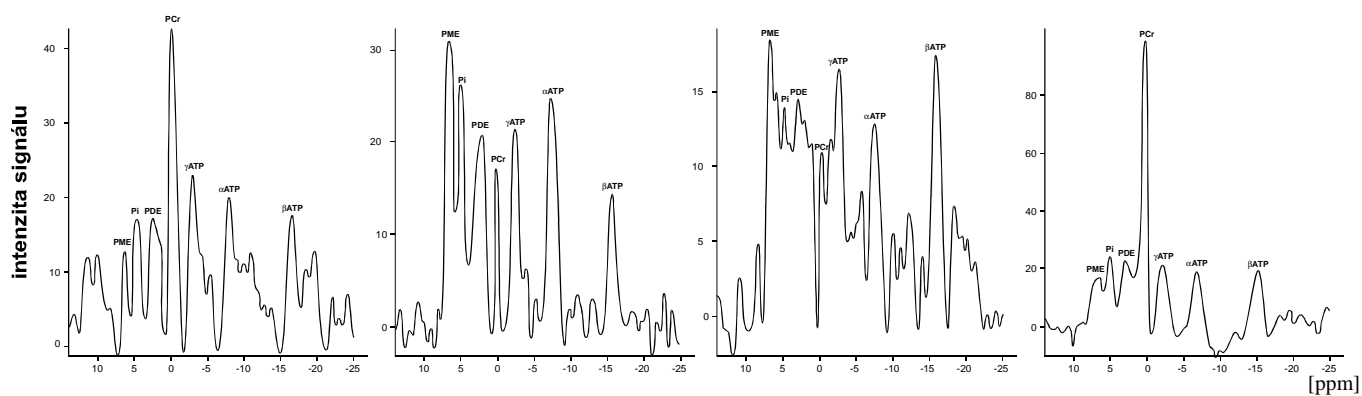
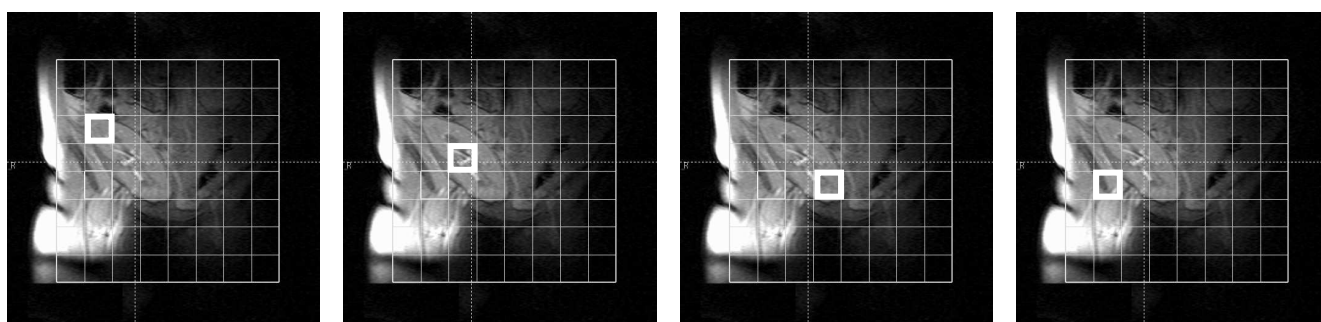
Obrázek 3.7: Vyhodnocovací proces ^{31}P MR spektra: **a)** korekce základní čáry, **b)** spektrum po korekci základní čáry; **c)** výsledné spektrum.

Výběr správné oblasti zájmu - *volume of interest* (VOI)

Velký význam hraje přesnost výběru místa, ze kterého je spektrum měřeno. Obsahuje-li vybraný objem tkáň, kterou zkoumáme, a zároveň tkáň v jejím okolí, výsledkem bude „zprůměrované“ spektrum, které vede ke snížení diagnostické citlivosti. Na 4 spektrech na obrázku 3.8 je demonstrován vliv výběru správného místa. V prvním případě byl vybraný objem umístěn do horního pólu štěpu, ve druhém případě přesně do středu ledviny, dále do dolního pólu ledviny a ve čtvrtém případě zcela mimo ledvinu. Na prvním a čtvrtém spektru (obrázek 3.8a a 3.8d) je patrný výrazný signál fosfokreatinu, pocházejícího z okolních svalů. Spektra s nejlepším poměrem signál/šum bylo docíleno pečlivým umístěním do středu ledviny. Samotné uložení transplantované ledviny v jámě kyčelní je výhodné, protože fyziologické pohyby, jako je dýchání, činnost srdce apod., zde mají jen malý vliv.

3.4 Statistika

Pro statistické vyhodnocení byla použita metoda Analýzy rozptylu jednoduchého třídění (ANOVA). Porovnání jednotlivých skupin s kontrolní skupinou K bylo provedeno Dunnettovým testem a porovnání skupin pacientů navzájem Duncanovým pořadovým testem (46).



a

b

c

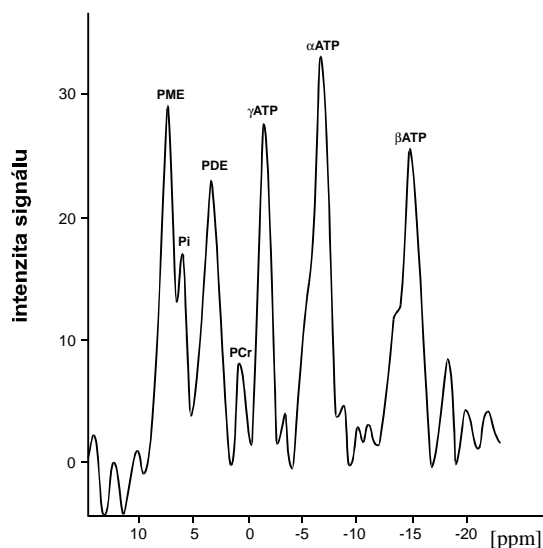
d

Obrázek 3.8: Vliv výběru místa, ze kterého byla spektra měřena (horní řada obrázků) a k tomu odpovídající výsledná spektra (dolní řada obrázků) **a**) v horním pólu ledviny **b**) v centru ledviny **c**) v dolním pólu ledviny **d**) mimo ledvinu.

4. Výsledky

4.1 Detailní analýza ^{31}P MR spekter transplantovaných ledvin

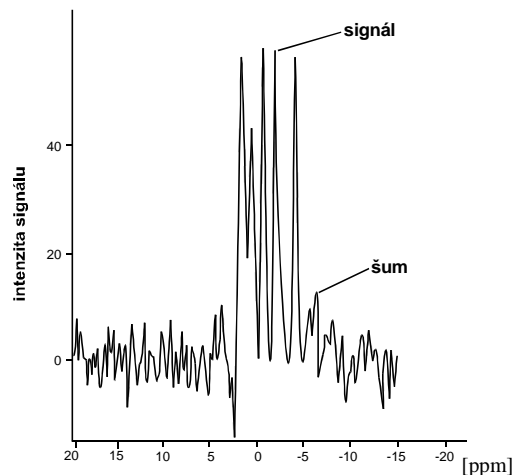
Výsledkem fosforové spektroskopie transplantovaných ledvin je spektrum se 7 rozlišitelnými signály při spektrálním rozpětí 40 ppm, které se liší svojí polohou (mají rozdílný chemický posun δ). Na základě porovnání s dostupnou literaturou a pracemi provedenými při vyšších magnetických polích, byly tyto signály přiřazeny jednotlivým metabolitům (viz obrázek 4.1). První signál odpovídá fosfomonoesterům (PME), které zahrnují prekursory lipidů, jako je fosfoethanolamin nebo fosfocholin. Druhý signál představuje anorganický fosfát (Pi). Třetí signál tvoří fosfodiester (PDE), které zahrnují glycerol-3-fosfocholin nebo glycerol-3-fosfoethanolamin. Signál fosfokreatin PCr pochází z okolních svalů a je při této metodě pozorovatelný na většině spekter – odpovídá čtvrtému signálu. Pátý, šestý a sedmý signál odpovídá třem signálům – gama, alfa a beta adenosintrifosfátu (γ -, α -, β - ATP).



Obrázek 4.1: ^{31}P spektrum získané z transplantované ledviny se 7 rozlišitelnými signály.

Kvalitu spekter popisuje (S/N, signál / šum), který lze vypočítat porovnáním amplitudy spektra a šumu. V této práci byl poměr S/N vypočten z poměru α -ATP/šum

s průměrnou hodnotou 3,7 ($\pm 0,6$), viz obrázek 4.2. Dle literatury mohou být spektra vyhodnocována, je-li S/N větší než 3,0. V naší práci bylo z 12 vyloučených spekter, celkem 5 spekter nehodnoceno právě z důvodu příliš nízké hodnoty S/N.



Obrázek 4.2: Fosforové spektrum Tx ledviny zobrazené v rozsahu -20 ~ +20 ppm.

4.1.1 Opakovatelnost měření a opakovatelnost zpracování dat

Při zavedení nové metody je vždy nutné zjistit, jaká je opakovatelnost měření. Ta byla v našem případě testována tak, že skupina 6 pacientů byla vyšetřena v jednom sezení 2x po sobě stejným protokolem, beze změny polohy pacienta. Vypočtená chyba těchto měření pak vypovídá o opakovatelnosti měření. Ze získaných údajů vyplývá chyba měření 15 %. Opakovatelnost zpracování znamená, s jakou chybou zpracuje stejný operátor jedno konkrétní spektrum. To bylo testováno na skupině 13 pacientů, u kterých byla spektra 3x zpracována. Hodnota vypočtené relativní chyby byla 7 % (s minimální hodnotou 0,1 a maximální hodnotou 28,8). Výsledky shrnují tabulky 4.1 a 4.2.

Tabulka 4.1: Opakovatelnost měření dat (n=6).

metabolity	PME	Pi	PDE	PCr	γ -ATP	α -ATP	β -ATP
průměr	9,61	19,72	11,58	12,37	11,13	16,7	21,57
min	0,44	1,04	1,42	0,84	0,89	0,03	1,93
max	25,99	76,83	23,54	23,16	35,32	35,66	51,79

Tabulka 4.2: Opakovatelnost zpracování dat (n=13).

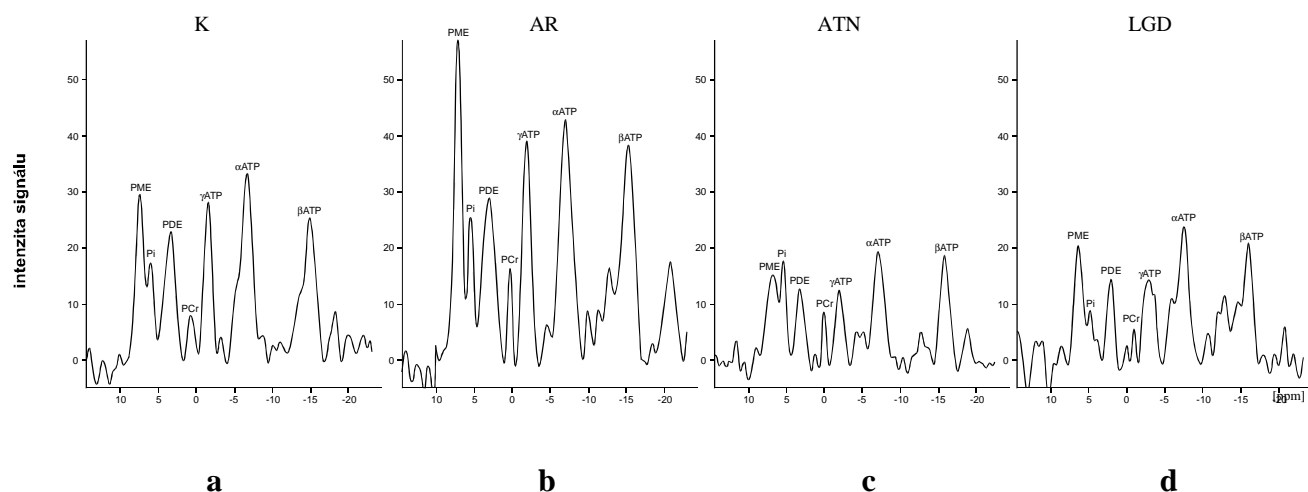
metabolity	PME	Pi	PDE	PCr	γ -ATP	α -ATP	β -ATP
průměr	4,93	6,81	8,39	7,51	7,57	8,83	7,26
min	0,25	0,45	0,1	0,17	0,97	0,88	0,28
max	11,28	18,54	20,24	18,37	25,09	20,11	28,76

Hodnoty představují průměrné směrodatné chyby v procentech s minimální a maximální hodnotou.

4.2 Kvalitativní a kvantitativní zpracování získaných spekter

4.2.1 Transplantované ledviny

Bylo zjištěno, že v naprosté většině naměřených spekter z transplantovaných ledvin jsou základní metabolity dobře rozlišitelné. U všech skupin pacientů jsme získali shodný počet signálů, při porovnání spekter jednotlivých skupin byly patrné jen malé rozdíly, a to především v intenzitě signálu PME. U skupiny ATN a chronické rejekce byly zjištěny nesignifikantně nižší koncentrace všech signálů, které mohou odpovídat nižšímu stupni energetického metabolismu. K porovnání skupin byly použity průměrné hodnoty poměrů metabolitů Pi, PME a PDE v poměru ku β -ATP, neboť tento signál obsahuje nejméně kontaminován signálem ADP. Dále byly vypočteny hodnoty intracelulárního pH, a to dosazením hodnot chemického posunu $\delta P_i - PCr$ do vzorce [10] (strana 23). Výsledná fosforová spektra jednotlivých skupin jsou zobrazena na obrázku 4.3. Průměrné chemické posuny metabolitů shrnuje tabulka 4.3.



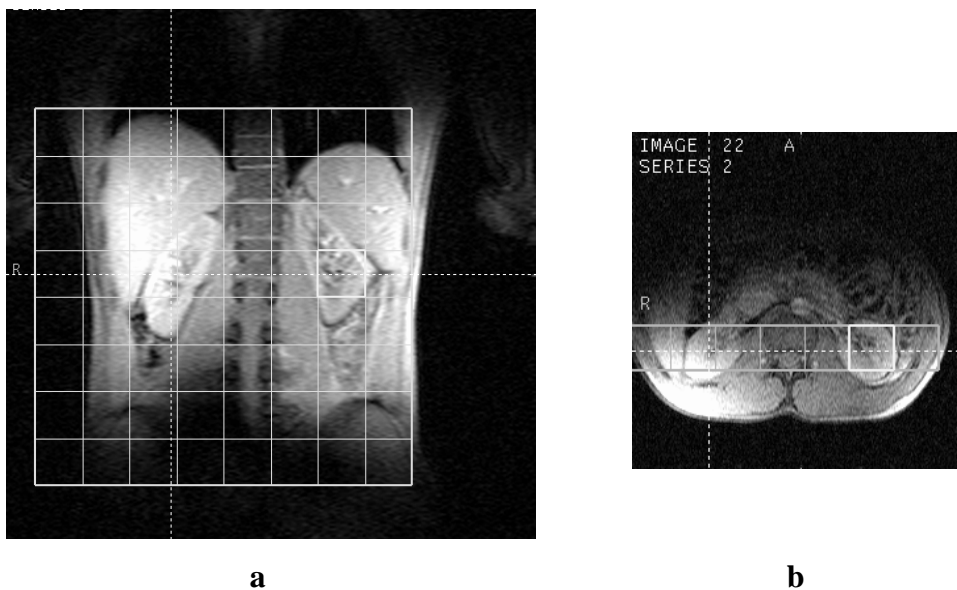
Obrázek 4.3: ^{31}P spektra transplantovaných ledvin **a)** dobrá funkce štěpu, 8 měsíců po transplantaci (Tx); **b)** epizoda akutní rejekce, 20 dnů po Tx; **c)** akutní tubulární nekróza, 4. den po Tx; **d)** pozdní dysfunkce štěpu, 65 měsíců po Tx.

Tabulka 4.3: Průměrné hodnoty chemických posunů metabolitů ve ^{31}P MR spektru transplantované ledviny.

Metabolit	Chemický posun δ
PME	6,5 ppm
Pi	5,1 ppm
PDE	2,6 ppm
PCr	0,0 ppm
γ-ATP	-2,6 ppm
α-ATP	-7,8 ppm
β-ATP	-16,1 ppm

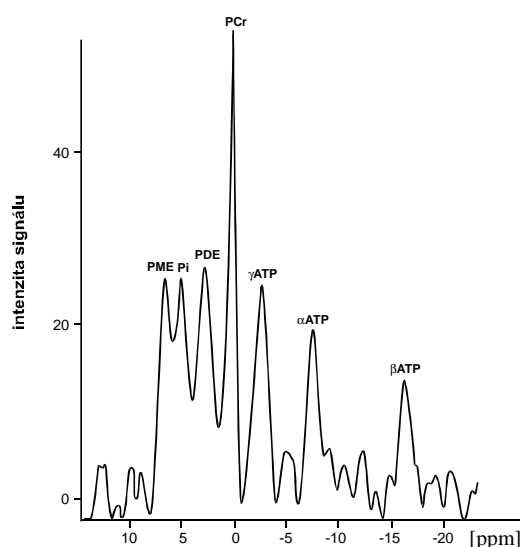
4.2.2 Nativní ledviny

U skupiny 5 zdravých dobrovolníků byla naměřena fosforová spektra z oblasti nativních ledvin, a to stejným protokolem, kterým byli vyšetřováni všichni pacienti. Dobrovolníci byli vyšetřováni v poloze na zádech a povrchovou cívku měli umístěnou v oblasti ledvin (obrázek 4.4). K získání fosforových spekter byla použita měřící sekvence 2D-CSI se zachováním nastavených parametrů.



Obrázek 4.4: T1- vážené obrazy nativních ledvin dobrovolníka **a)** v koronální rovině **a b)** v transversální rovině.

Většina spekter získaných z nativních ledvin zdravých dobrovolníků byla vzhledem k hloubce uložení naměřena s horším poměrem signál/šum (S/N), což potvrzují i závěry publikovaných prací (39). Kvalitativně se však spektra nelišila. Opět bylo získáno 7 základních metabolitů, včetně již diskutovaného signálu PCr pocházejícího z okolních svalů. Ukázkou spektra naměřeného z oblasti nativní ledviny zobrazuje obrázek 4.5. Při hodnocení relativních poměrů byly získány značné směrodatné odchylky, lze však předpokládat, že metabolismus ledviny zdravého dobrovolníka a transplantované ledviny s normální funkcí se neliší. Vypočtené hodnoty pH skupiny dobrovolníků a kontrolní skupiny K se velmi blížily – hodnota pH nativních ledvin skupiny dobrovolníků byla $7,22 \pm 0,29$, v porovnání s hodnotou pH kontrolní skupiny transplantovaných ledvin, která byla $7,24 \pm 0,20$.



Obrázek 4.5: Fosforové spektrum nativní ledviny zdravého dobrovolníka, měřeno metodou 2D-CSI.

4.3 Porovnání výsledků jednotlivých skupin pacientů

V tabulce 4.4 jsou uvedeny hodnoty poměrů jednotlivých metabolitů vyšetřovaných skupin pacientů. Vyhodnocovali jsme metabolity Pi, PME a PDE v poměru k β -ATP, protože tento signál obsahuje příspěvek pouze z ATP. Signály α -ATP a γ -ATP obsahují příspěvek z ADP a dalších metabolitů. Dále byly vyhodnocovány poměry PME/Pi, PDE/Pi a PME/PDE. V tabulce jsou vyznačeny signifikantní rozdíly $P < 0,05$ oproti kontrolní skupině K a mezi skupinami navzájem. Hladina pravděpodobnosti $0,05 < P < 0,08$ byla považovaná pouze za trend. Z této tabulky vyplývá, že od skupiny kontrol se liší skupina pacientů s epizodou akutní rejeckce vzestupem ve třech parametrech: PME/ β -ATP ($1,11 \pm 0,54$ vs. $0,85 \pm 0,20$, $p < 0,05$), PDE/Pi ($3,23 \pm 1,34$ vs. $2,44 \pm 0,87$, $P < 0,05$) a v parametru PME/Pi ($2,74 \pm 1,19$ vs. $1,78 \pm 0,57$, $P < 0,05$). U skupiny pacientů s ATN bylo zjištěno oproti kontrolní skupině signifikantní snížení v parametru PDE/ β -ATP ($0,80 \pm 0,28$ vs. $1,21 \pm 0,38$, $p < 0,05$) a v parametru PDE/Pi ($1,38 \pm 0,46$ vs. $2,44 \pm 0,87$, $p < 0,05$) a trend snížení v parametru PME/ β -ATP. U skupiny pacientů s LGD byl pozorován signifikantní pokles v parametru PME/Pi ($1,36 \pm 0,61$ vs. $1,78 \pm 0,57$, $p < 0,05$) a trend snížení v parametru PDE/Pi.

Porovnáme-li jednotlivé skupiny navzájem, zjistíme, že se skupina pacientů s epizodou akutní rejeckce liší od pacientů s ATN signifikantním zvýšením v parametru

PME/Pi ($2,74 \pm 1,19$ vs. $1,36 \pm 0,57$, $P < 0,05$) a v parametru PDE/Pi ($0,14 \pm 0,04$ vs. $0,21 \pm 0,07$, $P < 0,05$) a trendem zvýšení v parametru PME/ β -ATP a PDE/ β -ATP. Skupina pacientů s AR se dále odlišuje od skupiny pacientů s pozdní dysfunkcí štěpu v parametrech: PME/Pi ($2,74 \pm 1,19$ vs. $1,36 \pm 0,61$, $P < 0,05$) a PDE/Pi ($3,23 \pm 1,34$ vs. $2,06 \pm 0,68$, $P < 0,05$). Signifikantní změny hodnot pH mezi jednotlivými skupinami nebyly zaznamenány

Tabulka 4.4: Poměry relativních intenzit metabolitů 3 skupin pacientů a kontrol (průměrné hodnoty a směrodatné odchylky).

	K	ATN	AR	LGD
PME/β-ATP	$0,85 \pm 0,20$	$0,68 \pm 0,24(*)$	$1,11 \pm 0,54*(\dagger)$	$0,82 \pm 0,30$
Pi/β-ATP	$0,52 \pm 0,14$	$0,54 \pm 0,22$	$0,44 \pm 0,18$	$0,63 \pm 0,30$
PDE/β-ATP	$1,21 \pm 0,38$	$0,80 \pm 0,28*$	$1,35 \pm 0,69(\dagger)$	$1,29 \pm 0,43\dagger$
PME/PDE	$0,75 \pm 0,27$	$0,94 \pm 0,33$	$0,88 \pm 0,32$	$0,69 \pm 0,34$
PME/Pi	$1,78 \pm 0,57$	$1,36 \pm 0,57$	$2,74 \pm 1,19*\dagger$	$1,36 \pm 0,61*\S$
PDE/Pi	$2,44 \pm 0,87$	$1,38 \pm 0,46*$	$3,23 \pm 1,34*\dagger$	$2,06 \pm 0,68(*)\S$
pH	$7,29 \pm 0,23$	$7,27 \pm 0,34$	$7,31 \pm 0,47$	$7,22 \pm 0,21$

* ($p < 0,05$) signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou K, (*) ($p < 0,08$) trend

† ($p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi skupinou ATN a AR, (†) ($p < 0,08$) trend

‡ ($p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi skupinou ATN a LGD, (‡) ($p < 0,08$) trend

§ ($p < 0,05$) signifikantní rozdíl mezi skupinou AR a LGD, (§) ($p < 0,08$) trend

4.4 Opakované měření pacientů

Několik pacientů bylo naměřeno metodou fosforové spektroskopie opakovaně, a to s časovým odstupem a v rozdílném klinickém stavu. 3 příklady opakovaného měření pacientů v této kapitole ukazují, jak se projeví změněná funkce jejich ledviny na vzhledu získaných spekter.

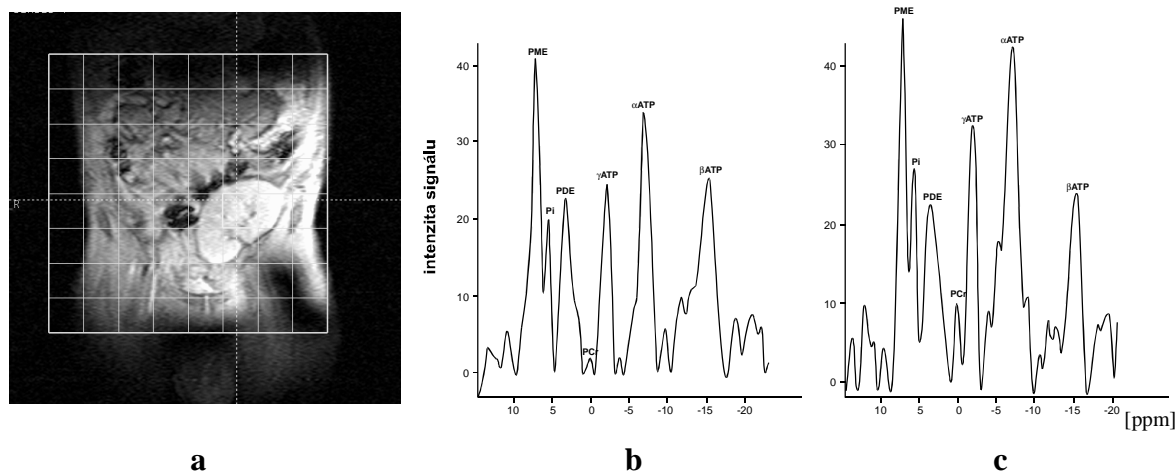
Příklad 1.

40-letý pacient s chronickým renálním selháním na podkladě Alportova syndromu podstoupil 3. transplantaci ledviny. Pro opožděnou funkci štěpu byla nutná dialyzační

léčba do 20. potransplantačního dne. 8. potransplantační den byla provedena biopsie štěpu s nálezem ATN bez nekrózy. 15. potransplantační den byl v biopsii nález akutní rejekce IIA, pro kterou byl pacient léčen pulzy kortikoidů. Efektem byl rozvoj diurézy, nikoliv však rozvoj funkce štěpu. Ve 3. biopsii (38. potransplantační den) nález potvrdil pokračující akutní rejekci IIA, která byla léčena opět pulzy kortikoidů, tentokrát s efektem. Po léčbě došlo k rozvoji funkce štěpu na Cr 176 $\mu\text{mol/l}$ a glomerulární filtrace GF 0,7.

Na našem MR oddělení jsme u tohoto pacienta naměřili spektra 9. a 30. potransplantační den. Z dostupných klinických vyšetření vyplývá, že v době prvního vyšetření na MR byla hodnota kreatininu Cr kolem 880 $\mu\text{mol/l}$ - pacient byl v té době dialyzován, při druhém vyšetření klesla hodnota Cr na 353 $\mu\text{mol/l}$.

Spektra z obou měření ukazuje obrázek 4.6. Obě spektra naměřená s odstupem 3 týdnů si jsou velmi podobná a u obou je nápadný signál PME. Vypočtené hodnoty parametru PME/Pi a jejich porovnání s průměrnými hodnotami PME/Pi ostatních skupin u tohoto pacienta napovídají, že by se mohlo jednat v obou případech o diagnózu epizody akutní rejekce.

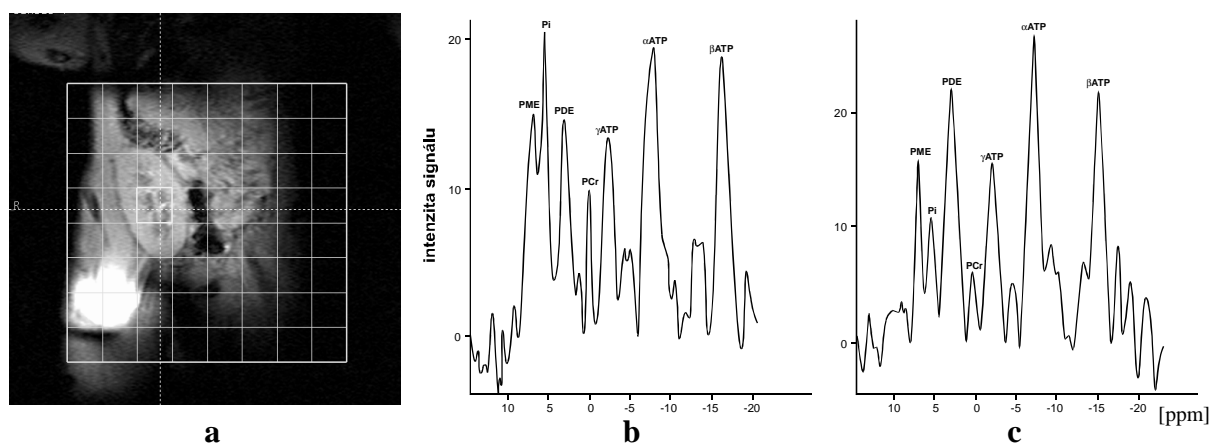


Obrázek 4.6: Porovnání spektra u téhož pacienta 9. a 30. den po transplantaci. a) T1-vážený obrázek transplantované ledviny v koronální rovině, b) ^{31}P MR spektrum získané 9. den po transplantaci a c) ^{31}P MR spektrum získané 30. den po transplantaci.

Příklad 2.

39-letý pacient podstoupil transplantaci pro selhání ledvin na podkladě chronické glomerulonefritidy. První 3 týdny byl štěp ledviny afunkční, s nutností dialyzační léčby. 6. potransplantační den byla provedena biopsie s nálezem ATN. 15. den byla biopsie opakována, s nálezem akutní rejeckce IIA v terénu ATN. Následovala léčba pulzy metylprednisolonu. Po léčbě nastal výrazný rozvoj diurézy a postupný pomalý rozvoj funkce. 28. den po transplantaci byla indikována 3. biopsie, kde byly popsány jen hraniční změny.

Na oddělení magnetické rezonance byl pacient vyšetřen 4. a 34. potransplantační den. Při prvním vyšetření byla hladina kreatininu 1460 $\mu\text{mol/l}$, při druhém vyšetření byla hladina 464 $\mu\text{mol/l}$. Ve spektrech je dobře patrna změna intenzity anorganického fosfátu Pi (obrázek 4.7).



Obrázek 4.7: Porovnání spektra u téhož pacienta 9. a 30. den po transplantaci. **a)** T1-vážený obrázek transplantované ledviny v koronální rovině. **b)** ^{31}P MR spektrum získané 4. den po transplantaci s ATN v biopsii, **c)** ^{31}P MR spektrum získané 34. den po prodělané rejeckní epizodě, s nedostatečným rozvojem funkce štěpu.

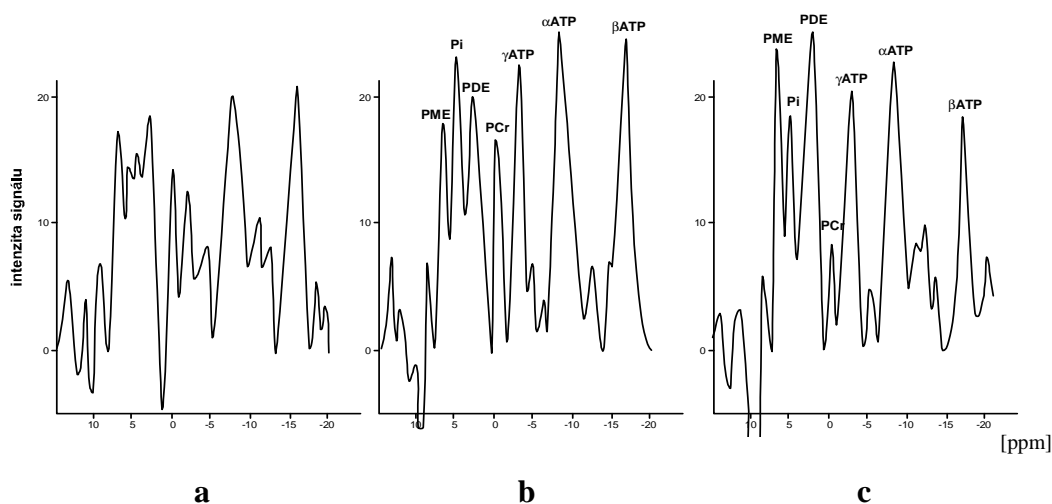
Příklad 3.

52-leté pacientce byla provedena transplantace ledviny pro chronické selhání ledvin na podkladě polycystózy. Během výkonu byla nutná rekonstrukce tepen. Pro opožděný rozvoj funkce štěpu byla u pacientky nutná hemodialyzační léčba. 8. den

po transplantaci byla indikována biopsie, získaný vzorek však nebyl reprezentativní. 11. den byla biopsie štěpu opakována, v nálezů byly popsány akutní rejekční změny, pro které byly nasazeny pulzy kortikoidů. Po léčbě nastal postupný rozvoj funkce štěpu s nejlepší hodnotou Cr 178 $\mu\text{mol/l}$ a glomerulární filtraceí GF 0,6.

Vyšetření magnetickou rezonancí bylo provedeno 6. potransplantační den, kdy přetrvávala afunkce štěpu. Druhé vyšetření bylo provedeno 12. potransplantační den, kdy byla hladina Cr 754 $\mu\text{mol/l}$. Třetí vyšetření následovalo 25. den, kdy hladina kreatininu poklesla na Cr 196 $\mu\text{mol/l}$. Získaná spektra jsou zobrazena na obrázku 4.8.

Z obrázku 4.8 je patrné, že rozdílná funkce štěpu ledviny vede k získání kvalitativně odlišných spekter. Spektra naměřená 6. a 12. den po Tx byla získána v době, kdy u štěpu ledviny zatím nedošlo k rozvoji funkce a byla nutná hemodialýza. Nízké relativní koncentrace měřených metabolitů a horší poměr signál/šum spektra na obrázku 4.8a tomu odpovídají, toto spektrum nebylo dále statisticky zpracovááno. Ve spektru získaném 12. potransplantační den 4.8b(s verifikovanou akutní rejekcí) nejsou zřetelně vyjádřené změny, které signifikantně odlišovaly skupinu pacientů s epizodou akutní rejekce od kontrolní skupiny. Třetí spektrum na obrázku 4.8c bylo naměřené po prodělané antirejekční léčbě, kdy se funkce ledviny upravila, spektrum je kvalitativně srovnatelné se spektry kontrolní skupiny s normální dobrou funkcí.



Obrázek 4.8: Fosforová spektra transplantované ledviny **a)** v časném potransplantačním období (6. den) bez rozvoje funkce, **b)** 12. den po Tx s diagnózou akutní rejekce,

bez rozvoje funkce, c) 25. den po Tx po prodělané antirejekční léčbě kortikoidy, s rozvojem funkce na Cr 196 $\mu\text{mol/l}$.

5. Diskuze

5.1 Porovnání výsledků s publikovanými daty

Porovnání výsledků publikovaných prací a naší práce shrnuje tabulka 5.1. V tabulce jsou uvedeny autoři práce (s odkazem na citaci), sledovaná skupina, použitá MRS metoda, počet vyšetřených pacientů a vybrané poměry metabolitů, pokud byly dostupné.

Tabulka 5.1: Porovnání výsledků relativních poměrů vybraných metabolitů zmíněných v publikovaných pracích a v naší studii.

Autor	Skupina	Metoda	N	PME/PDE	PME/Pi	Pi/ α ATP	PME/ATP	PDE/ATP
Boska (39)	K	ISIS	5	-	1,00 \pm 0,30	1,1 \pm 0,1	1,10 \pm 0,40	1,80 \pm 0,70
Klemm (27)	K	ISIS	18	0,80 \pm 0,21	-	-	-	-
Heindel (26)	K	ISIS	20	0,96 \pm 0,50	5,63 \pm 2,61	-	1,22 \pm 0,38	1,46 \pm 0,45
Heindel (21)	R	ISIS	5	1,00 \pm 0,62	5,87 \pm 5,29	0,22 \pm 0,11	1,30 \pm 0,52	1,50 \pm 0,35
Heindel (21)	ATN	ISIS	10	0,65 \pm 0,35	4,62 \pm 2,48	-	-	-
Grist (36)	K	DRESS	8	1,82 \pm 0,10	3,77 \pm 0,44	0,35 \pm 0,05	-	-
Grist (34)	R	DRESS	14	0,70 \pm 0,21	1,04 \pm 0,23	1,10 \pm 0,21	-	-
Kugel (38)	K	ISIS	5	1,08	3,52	-	0,48	0,45
Naše práce	K	2D-CSI	31	0,75 \pm 0,27	1,78 \pm 0,57	0,44 \pm 0,16	0,27 \pm 0,05	0,38 \pm 0,10
Naše práce	AR	2D-CSI	20	0,88 \pm 0,32	2,74 \pm 1,19	0,33 \pm 0,12	0,33 \pm 0,09	0,40 \pm 0,13
Naše práce	ATN	2D-CSI	6	0,94 \pm 0,33	1,36 \pm 0,57	0,52 \pm 0,19	0,25 \pm 0,09	0,29 \pm 0,09

K – pacienti s dobrou stabilní funkcí štěpu, R (AR) – pacienti s rejekčními známkami ve štěpu, ATN – pacienti s akutní tubulární nekrózou štěpu, N – počet pacientů ve skupině, ”– ”neuveдено.

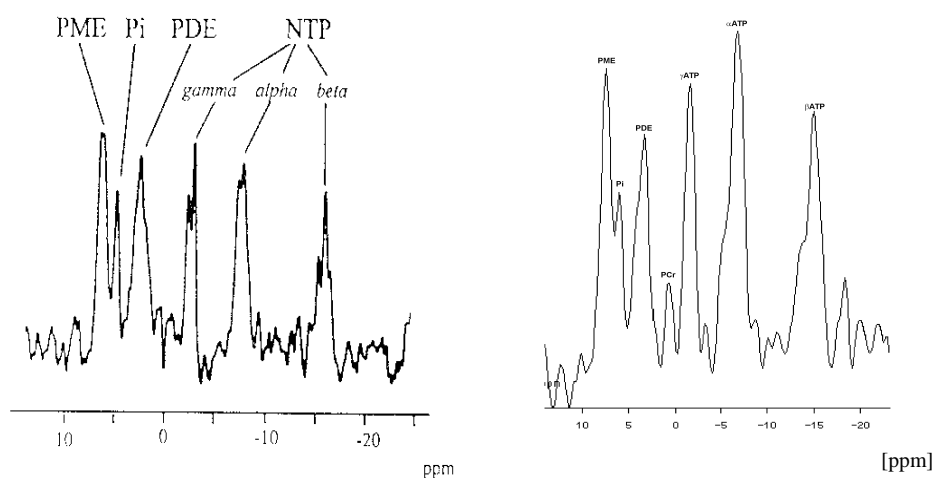
Z porovnání s ostatními pracemi v tabulce 5.1 vyplývá, že naše hodnoty jednotlivých poměrů jsou většinou v rozmezí uváděných publikovaných hodnot, ale z porovnání je zároveň patrný značný rozptyl publikovaných dat. Při porovnání

s publikovanými studii je nutné mít na paměti, že byly použity rozdílné měřicí parametry i odlišné vyšetřovací techniky.

Byly publikované práce, ve kterých byly měřeny absolutní koncentrace fosforových metabolitů transplantovaných ledvin (38), ale vzhledem k technickým obtížnostem většina autorů, stejně jako v naší práci, využívá měření relativních koncentrací ^{31}P metabolitů.

Parametr PME/Pi se ukazuje jako významný pro popis změn energetického metabolismu transplantovaných ledvin. V naší studii se nepotvrdil pokles relativní koncentrace βATP u skupiny pacientů s akutní rejekcí štěpu, jako to bylo pozorováno v pracích autora Chana *et al.* a nebyl pozorován vzestup metabolitu Pi a PDE u pacientů s akutní rejekcí, jako uvádí autor Grist *et al.* Není však zcela jasné, jestli rozdílné výsledky v porovnání s publikovanými pracemi vyplývají z odlišných podmínek čistě biochemických, technických či metodických. Je však jisté, že rozdílné vyšetřovací techniky ovlivní kvalitu i charakter získaných spekter, a tím následné statistické vyhodnocení.

Ve shodě s prací autora Klemma *et al.* (27) nebyl prokázán rozdíl v parametru PME/PDE mezi jednotlivými skupinami. Na obrázku 5.1 lze porovnat kvalitu spektra publikovaného v jeho práci (měřeného metodou ISIS) s naším spektrem, naměřeným metodou 2D-CSI. Z porovnání obou spekter naměřených z transplantovaných ledvin rozdílnými technikami vyplývá, že kvalita spekter je srovnatelná. Na obou spektrech lze dobře rozlišit 6 signálů výše zmíněných metabolitů a na našem spektru (5.1b) je navíc patrný nízký signál fosfokreatinu.



Obrázek 5.1: Porovnání spektra transplantované ledviny pacienta s dobrou funkcí štěpu měřeného metodou **a**) ISIS (autor Klemm (27)) a **b**) se spektrem pacienta z kontrolní skupiny v naší studii, měřeného metodou 2D-CSI.

V naší práci byl zaznamenán významný vzestup poměru PME/Pi, který signifikantně odlišoval skupinu pacientů s akutní rejkcí, a to jak od kontrolní skupiny, tak od všech ostatních vyšetřovaných skupin. Dle analýzy spekter vyplývá, že tento vzestup byl způsoben především vyšší intenzitou metabolitu PME. Vzestup PME je podle autora Klemma *et al.* (27) spojován se vzestupem membránového metabolismu fosfolipidy a proliferací buněk. Lze připustit, že vyšší koncentrace fosfomonoesterů odráží vyšší stupeň buněčného růstu, ke kterému dochází v infiltrovaném a zvětšeném štěpu ledviny při epizodě akutní rejkce.

Interpretace výsledků v naší práci ztěžuje skutečnost, že samotné skupiny pacientů nejsou homogenní. Mezi klinickými daty charakterizujícími pacienty nebyl například podchycen stav transplantovaného orgánu (věk dárce) ani klinický stav příjemce (délka předchozí dialyzační léčby atd.). Tento problém je ale řešitelný naměřením větší skupiny pacientů a navázáním užší spolupráce s klinickým pracovištěm, kde jsou potřebná data k dispozici.

Fosforová ³¹P MR spektroskopie prokázala změny v energetickém a fosfolipidovém metabolismu transplantovaných ledvin skupin pacientů s dysfunkcí štěpu. Pro klinickou aplikaci je důležité, že práce prokázala, že tato neinvazivní vyšetřovací metoda umožňuje na základě změn relativních koncentrací metabolitů rozlišit nejen dysfunkci štěpu na podkladě epizody akutní rejkce od ledvin s dobrou stabilní funkcí, ale také pacienty s akutní rejkcí od pacientů s tubulární nekrózou štěpu. Právě tento poznatek může diagnosticky pomoci a v některých případech ušetřit pacientům bioptické vyšetření.

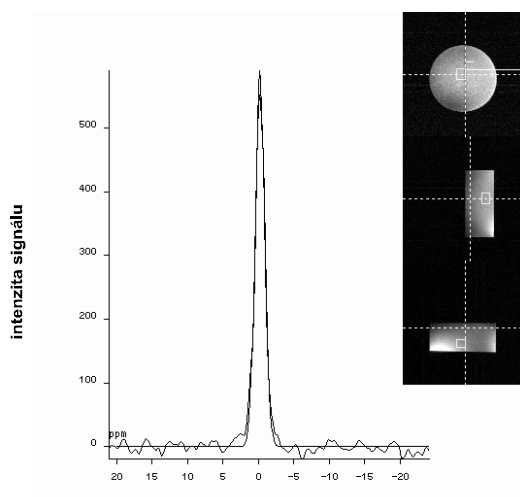
5.2 Metodické poznámky

Během vyšetřování se ukázalo, že přesnost a správnost měření fosforových spekter transplantovaných ledvin významně ovlivňuje umístění povrchové cívky a hloubka uloženého štěpu ledviny. Chybu MR spektroskopických vyšetření ovlivňuje nejvíce

nesprávná poloha cívky. Výsledkem je pak obtížně hodnotitelné spektrum, s nízkým poměrem signál/šum.

5.2.1 Vliv hloubky uložení ledviny od povrchové cívky

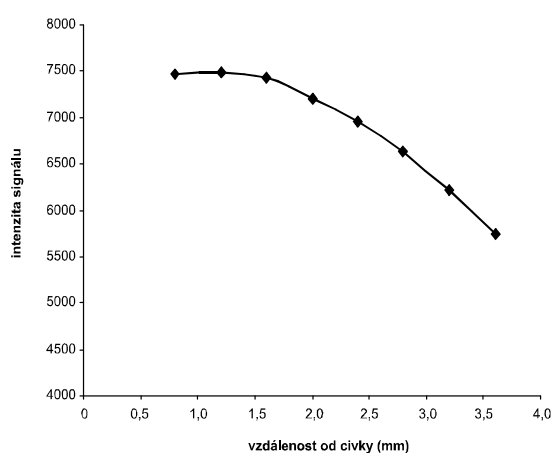
Vliv hloubky uložení ledviny jsme dokumentovali testem na fosforovém fantomu, který máme na oddělení k dispozici. Na fantomu obsahujícím 0,1 mol roztok fosforečnanu sodného byl testován vliv vzdálenosti ledviny od vyšetřovací cívky na získané spektrum, a tím vliv chybného výběru *volume of interest* (VOI). Při testu na fantomu byl použit shodný vyšetřovací i vyhodnocovací protokol jako v klinické části. Na obrázku 5.2 je ukázka spektra s jedním signálem odpovídajícím fosfátu obsaženém ve fantomu.



Obrázek 5.2: Spektrum získané z fosforového fantomu metodou 2D-CSI.

Během opakovaného vyhodnocování (8x) byla směrem od středu cívky posouvána oblast, ze které bylo spektrum měřeno, a to celkem o 3,2 cm (s jednotlivým posunem 4 mm). Z porovnání získaných spekter vyplývá, že došlo k poklesu intenzity signálu o 23 %. Klesající hodnoty intenzit fosfátu při rostoucí vzdálenosti od cívky byly vyneseny do grafu na obrázku 5.3. Tyto dílčí výsledky potvrzují, že měření povrchovou cívkou je technicky limitováno citlivostí s rostoucí vzdáleností od středu cívky.

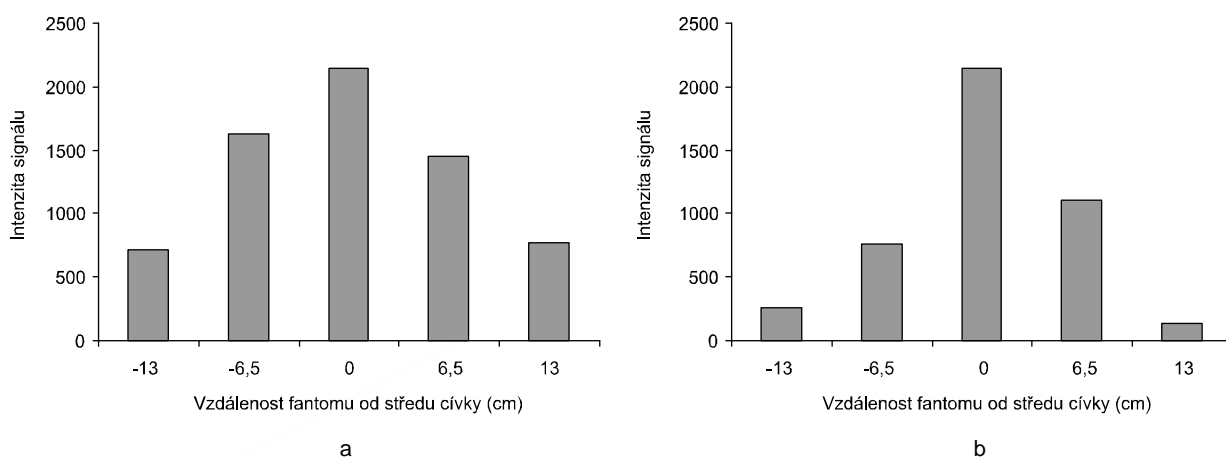
Vzdálenost středu ledviny od měřicí cívky byla proto v klinické části experimentu zaznamenávána pomocí parametru *shift-mean*. Jeho průměrná hodnota v této studii byla 5,7 cm (s minimem 3,5 cm a maximem 9,2 cm). Abychom předešli závažnější chybě, byly ze skupiny vyřazeni pacienti, kteří měli transplantovanou ledvinu uloženou hlouběji než 9 cm pod povrchem. K podobným závěrům dospěl i autor Grist *et al.* (36), který si stanovil limit hloubky uložení ledviny 10 cm, autor Heindel *et al.* (26) uvádí ve své práci průměrnou hloubku uložení štěpu ledviny 7,4 cm (s minimem 5,8 cm a maximem 9,7 cm). Korekce na hloubku nebyla v naší studii prováděna.



Obrázek 5.3: Vliv vzdálenosti měřeného objemu od povrchové cívky na intenzitu signálu.

5.2.2 Vliv vzdálenosti ledviny od středu cívky

Při umístování povrchové cívky nemusí být střed cívky přesně nad středem ledviny. Tento vliv byl testován opět na fosforovém fantomu, který byl posouván po cívce z jejího centra o 6,5 a 13 cm čtyřmi základními směry. Celkem bylo provedeno 9 měření. Vyhodnocené intenzity signálu jsou graficky zobrazeny na obrázku 5.4. Získané křivky odpovídají profilu povrchové cívky.



Obrázek 5.4: Test klesající intenzity signálu s rostoucí vzdáleností od středu cívk. Vyhodnocené intenzity signálu získaného z fantomu **a)** při poloze 13 cm a 6,5 cm od středu cívk vlevo a vpravo a **b)** při poloze 13 cm a 6,5 cm od středu cívk vpředu a vzadu.

Z výsledků těchto měření vyplývá, že kvalitu výsledných spekter významně ovlivňuje vzdálenost měřené ledviny od centra povrchové cívk. S problémem umístění jsme se setkali zejména u pacientů s nadváhou. Stejný negativní vliv mají i pohybové artefakty během vyšetření, které i přes fixaci cívk nelze zcela potlačit.

5.2.3 Omezení a nevýhody metody ^{31}P MRS

Z provedených klinických vyšetření metodou ^{31}P MRS vyplynula některá omezení a nevýhody. K naměření dostatečně kvalitních dat magnetickou rezonancí je nutné optimalizovat délku vyšetření. Při vyšetřování pacientů je nutné přihlídnout k aktuálnímu klinickému stavu pacienta a podle toho upravit délku vyšetření tak, aby to bylo dostatečně přínosné, ale pro pacienta ještě únosné. V této studii byla délka vyšetření kolem 20 min. a vyšetření bylo pacienty a dobrovolníky dobře tolerováno. Jako velmi důležitá se ukázala být spolupráce pacienta.

Určité omezení přináší vlastní metoda fosforové spektroskopie, a tím je relativně „chudé“ rozlišení metabolitů při *in vivo* měření. Fosforové spektrum transplantované ledviny při 1,5 T nabízí informace jen o relativně malém počtu metabolitů, které mají dostatečně mobilní molekuly. Jistou nevýhodou ^{31}P MR spektroskopie je také malá citlivost, která je dána magnetickými vlastnostmi fosforu. Ostatní metabolity, které by

mohly být zajímavé z pohledu nefrologa či biochemika, mají příliš široký signál pro detekci, nebo naopak při běžném měřicím čase mají signál příliš slabý.

Další omezení vyplývají ze zvolené metody 2D-CSI. U této metody se uplatňuje efekt parciálního objemu – tzv. *partial volume effect*, pro který není možné rozlišit děje odehrávající se na úrovni kůry a dřene a centrálního sinu ledviny. Lze však přepokládat, že procesy jako je akutní rejekce, mají difuzní charakter.

6. Závěr

Výsledky naší práce lze shrnout v těchto bodech:

- Detailní analýza ^{31}P MR spekter transplantovaných ledvin potvrdila, že ve fosforovém spektru získaném z transplantované ledviny můžeme sledovat 7 základních metabolitů, které popisují metabolické pochody, a to jak za normálních, tak patologických podmínek.
- Z porovnání spekter získaných z ledvin s rozdílnou funkcí bylo zjištěno, že se tato spektra kvalitativně liší. Metodou fosforové ^{31}P MR spektroskopie byly prokázány změny v energetickém a fosfolipidovém metabolismu transplantovaných ledvin skupin pacientů s dysfunkcí štěpu.
- Z výsledků klinické části vyplývá, že metoda fosforové spektroskopie je schopna na základě změn relativních koncentrací metabolitů rozlišit ledviny s dysfunkcí štěpu na podkladě epizody akutní rejekce od ledvin s dobrou stabilní funkcí štěpu.
- Skupina pacientů s diagnostikovanou nebo již léčenou epizodou akutní rejekce štěpu ledviny se významně odlišovala od ostatních sledovaných skupin – od skupiny pacientů s ATN a od skupiny pacientů s pozdní dysfunkcí štěpu.

Zhodnocení možností metody

Ačkoliv biopsie představuje zlatý standard v diagnostice dysfunkcí štěpů ledvin a stále je nezbytná pro definitivní stanovení diagnózy akutní tubulární nekrózy a akutní či chronické rejekce, je nutné hledat především neinvazivní metody, které by tuto metodu nahradily. Metoda ^{31}P MR spektroskopie, tím že je zcela neinvazivní a nepředstavuje pro pacienta žádnou radiční zátěž, je vhodným nástrojem pro diagnostiku a monitorování

stavu transplantovaného orgánu. *In vivo* měření relativních koncentrací metabolitů v transplantované ledvině umožňuje sledovat a hodnotit různé biochemické procesy, ke kterým v ledvině dochází. Tato metoda nabízí nový pohled a rozšiřuje možnosti diagnostiky dysfunkcí u transplantovaných ledvin, zejména v časném potransplantačním období.

Fosforová spektroskopie je perspektivní a šetrnou diagnostickou metodou, která umožňuje relativně snadno sledovat dynamický vývoj koncentrací metabolitů v čase, umožňuje provádět studie na velkých skupinách pacientů, a tak studovat nejrůznější vlivy na metabolismus transplantované ledviny.

Shrnutí závěrů práce

Výsledky této práce dokazují, že je možné studiem energetického metabolismu transplantované ledviny pomocí metody ^{31}P MR spektroskopie rozpoznat rozdílné podmínky, které vedou k dysfunkcím transplantované ledviny zejména v časném potransplantačním období. Metoda fosforové spektroskopie umožňuje neinvazivním způsobem zpřesnit stanovení diagnózy a tím i volbu vhodné léčby.

7. Příloha

7.1 Vyšetřovací protokol pro MR vyšetření

Protokol pro MRS vyšetření
oddělení MR, ZRIR IKEM, Vídeňská 1958/9 Praha 4

Název vyšetření: Transplantovaná ledvina

Použitá technika: $^1\text{H} / ^{31}\text{P}$ povrchová cívka

Uložení pacienta: Pacient vyšetřován v poloze na zádech s povrchovou cívkou umístěnou v místě transplantované ledviny; fixace suchými pásy

Protokol MRI:

31P-MRS

LEDVINY_CSI

Scout_CSI_ledviny (ledvina uložená v pravé kyčelní jámě)

Scout_CSI_ledviny_SIN (ledvina uložená v levé kyčelní jámě)

Úvodní obrázky (scout): T1 vážené obrázky s parametry: TR 15 msec, TE 6 msec, flip angle 30, FOV 450, 21 vrstev s tloušťkou 10 mm, celkový měřicí čas 1 min. Tyto obrázky naměřit ve všech třech rovinách. Doba vyšetření: 1 min 12 s

Protokol MR spektroskopie:

2D CSI_ledviny

1. scout (scout_sin)

Na obrázcích zobrazit transplantovanou ledvinu v sagitální rovině, v řezu, kde zaujímá největší objem. V této sagitální rovině nutno změnit rovinu z vrstvy horizontální na vrstvu vertikální (position). V second localizer nutné zkontrolovat umístění vrstvy v transversální rovině.

2. CSI_31P_ledviny

V sekvenci vhodné změnit tloušťku vrstvy ze 4 cm na 3 cm (parametry: TR 323 ms, FOV 320, počet akvizic 32, TE 3 ms). Před spuštěním sekvence je nutné přepnout měřicí povrchovou cívku z ^1H na ^{31}P . Doba vyšetření: 11 min 1 s

během měření zapsat: shift mean
frekvence (adjust – show actual)

během vyšetření provést : evaluate - grid – pozice 0 vůči ledvině (jen zkontrolovat)
evaluate - distance – zapsat hloubku uložení ledviny,
případně změřit velikost ledviny

8. Použitá literatura

1. Bloch F. Nuclear Induction. *Phys rev.* 70:460-474, 1946
2. Hájek M, Dezortová M, Liščák R, Vymazal J, Vladyka V. 1H MR spectroscopy of mesial temporal lobe epilepsies treated with Gamma knife. *European Radiology.* 2003;13(5):994-1000
3. Španiel F, Herynek V, Hájek T, Dezortová M, Horáček J, Hájek M, Kožený J, Dockery C, Hoschl C. Magnetic resonance relaxometry in monozygotic twins discordant and concordant for schizophrenia. *European Psychiatry: the Journal of the Association of European Psychiatrists.* 2005;20(1):41-44
4. Škoch A, Jirů F, Dezortová M, Krušinová E, Kratochvílová S, Pelikánová T, Grodd W, Hájek M. Intramyocellular lipid quantification from 1H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCModel technique. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2006;23(5):728-735
5. Kratochvilová S, Vyhnánovská P, Vlasáková Z, Hájek M, Skibová J, Pelikánová T. Metabolic characteristics of soleus muscle in relation to insulin action in the offspring of hypertensive parents. *Metabolism: Clinical & Experimental.* 2006;55(10):1388-96
6. Dezortová M, Taimr P, Škoch A, Špičák J, Hájek M. Etiology and functional status of liver cirrhosis by 31P MR spectroscopy. *World Journal of Gastroenterology.* 2005;11(44):26-31
7. Harantová P, Dezortová M, Tošner Z, Táborský P, Lácha J, Hájek M. 31P MR Spectroscopy of the Human Kidney Graft using the 2D-CSI Sequence. In: **Abstracts** 17th Annual Sci Meeting ESMRMB, Paris, Magma Suppl. 2000;1(11)286:655
8. Harantová P, Dezortová M, Tošner Z, Lácha J, Táborský P, Hájek M. 31P-MR Spectroscopy of the Human Kidney Graft by 2D-CSI Sequence. Preliminary Clinical Results. In: **Abstracts** 9th ISMRM Scientific meeting and the 18th ESMRMB Annual Meeting, Glasgow, Scotland UK, Proc. Intl. Soc. Magn. Reson. Med. 9: č. abstr. 1050, 2001

9. Trojan S. Lékařská fyziologie. 4. vyd. přeprac. a dopl. Praha : Grada, 2003
10. Masopust J. Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Část 1. Ledviny a močové cesty: 205-285, Praha, Karolinum, UK, 1998
11. obrázek modifikován dle: http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/6to/membr-casos/Fisiol-Nefron/Aparato-Urinario_archivos/image002.jpg
12. Teplan V. Metabolismus a ledviny. 1.vyd. Praha : Grada Publ., 2000
13. Kawaciuk I. Urologie obecná a speciální. 1. vyd. Jinočany : H&H, 1992
14. Obrázek převzat a upraven ze stránky Treatment methods for Kidney Failure, Kidney Transplantation z National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease, <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/transplant>
15. Matl I, Viklický O, Voska L, Lácha J, Teplan V, Vítko Š. Naše první zkušenosti s protokolární biopsií transplantovaných ledvin. Čas.Lék.čes. 2004;4:253-256
16. Kahan BD, Ponticelli C. Principles and practise of renal transplantation. Rejection and other renal complications: 1st ed. London : Dunitz, 2004
17. Allen R, Chapman JR. A manual of Renal Transplantation. 1st ed. London : Arnold, 1994
18. Hollenbeck M. New diagnostic techniques in clinical nephrology. Colour coded duplex sonography for evaluation of renal transplants--tool or toy for the nephrologist? Nephrology Dialysis Transplantation. 1994;9(12):1822-8
19. Eliáš P, Žižka J. Dopplerovská ultrasonografie. 1. vyd. Hradec Králové : Nucleus, 1998
20. Ullmann V. Odborný posudek: Komplexní vyhodnocování scintigrafických vyšetření v počítačové síti PC, 2001

21. Hricak H, Campos Z, Carroll P. Magnetic resonance imaging of the kidney. *World J of Urol.* 1992;10:154-160,
22. Young IR, Charles HC. MR spectroscopy Clinical Applications and techniques. London: Martin Dunitz LTD, 1996
23. Chakeres DW, Schmalbrock P. Fundamentals of Magnetic Resonance Imaging. Baltimore. Williams&Wilkins, 1992
24. Voet D, Voetova JG. Biochemie. 1.vyd. Praha : Victoria Publishing, 1995
25. Alberts B, et al. Molecular Biology of the cell. 4th ed. New York : Garland Sci., 2002
26. Heindel W, Kugel H, Wenzel F. Localized 31P MR spectroscopy of the transplanted human kidney in situ shows altered metabolism in rejection and acute tubular necrosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 1997;7(5):858-4
27. Klemm A, Rzanny R. 31P-magnetic resonance spectroscopy (31P- MRS) of human allografts after renal transplantation. *Nephrology, Dialysis, Transplantation.* 1998; 13(12): 3147-52
28. Kemp GJ, Thompson CH, Barnes PR, Radda GK. Comparisons of ATP turnover in human muscle during ischemic and aerobic exercise using 31P magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine.* 1994;31(3):248-58
29. Ratcliffe PJ, Moonen CHTW, Holloway PAH, Ledingham JGG, Radda GK. Acute renal failure in hemorrhagic hypotension: Cellular energetics and renal function. *Kidney Int.* 1986;30: 355-360
30. Thompson CH, Kemp GJ, Sanderson AL, Radda GK. Skeletal muscle mitochondrial function studied by kinetic analysis of postexercise phosphocreatine resynthesis. *Journal of Applied Physiology.* 1995;78(6):2131
31. Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K. NMR chemical shift imaging in three dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1982;79(11):3523-6

32. Maudsley AA, Hilal SK. Field inhomogeneity correction and data processing for spectroscopic imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1985;2(3):218-33
33. Tošner Z. Diplomová práce MFF UK, Praha, 1999
34. Sehr PA, Radda GK, Bore PJ, Sells RA. A model kidney transplant studied by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977; 77:195-202
35. Beckmann N, Hof RP, Rudin M. The role of magnetic resonance imaging and spectroscopy in transplantation: from animal models to man. *NMR in Biomedicine*. 2000;13(6):329-48
36. Grist TM, Charles HC, Sostman HD. Renal Transplant Rejection: Diagnosis with ³¹P MR Spectroscopy. *AJR*. 1991; 156:105-112
37. Seto K, Ikehira H, Obata T. Long-term assessment of posttransplant renal prognosis with ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Transplantation*. 2001;72:627
38. Kugel H, Wittsack HJ, Wenzel F, Stippel D, Heindel W, Lackner K. Non-invasive determination of metabolite concentrations in human transplanted kidney in vivo by ³¹P MR spectroscopy. *Acta Radiologica*. 2000;41(6):634
39. Boska MD, Meyerhoff DJ, Twieg DB, Karcymar GS, Mason GB, Werner MW. Image-guided ³¹P magnetic resonance spectroscopy of normal and transplanted human kidneys. *Kidney Int*. 1990;38:294-300
40. Chan L, Shapiro JI. Magnetic resonance study of renal transplantation. *Renal Physiology & Biochemistry*. 1989;2(3):181
41. Shapiro JI, Haugh CE, Weil R, Chan L. ³¹P nuclear magnetic resonance study of acute renal dysfunction on rat kidney transplants. *Magn Reson Med*. 1987;5:346-352

42. Kurková D, Herynek V, Gintelová J, Táborský P, Hájek M. Potential of ³¹P magnetic resonance spectroscopy in monitoring the viability of human renal grafts stored in Euro-Collins perfusion solution. *Physiological Research*. 1995;44(5):327-32
43. Niekisch MB, Von Elverfeldt D, El Saman A, Hennig J, Kirste G. Improved pretransplant assessment of renal quality by means of phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy using chemical shift imaging. *Transplantation*. 2004; 77(7):1041-5
44. Bretan PN Jr, Vigneron DB, Hricak H. Assessment of clinical renal preservation by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Urol*. 1987;137:146-150
45. Racek J. *Klinická biochemie*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 1999
46. Procházka B. *Biostatistika pro lékaře: principy základních metod a jejich interpretace*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 1999

9. Seznam vlastních publikací

1. publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace

Vyhnanovská P, Dezortová M, Herynek V, Táborský P, Viklický O, Hájek M: In Vivo 31P MR Spectroscopy of Human Kidney Grafts: Using the 2D-Chemical Shift Imaging Method. Transplantation Proceedings. 2011;43:1570-1575. IF 0,994 z r. 2009.

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

a) s IF

Kratochvílová S, **Vyhnanovská P**, Vlasáková Z, Hájek M, Skibová J, Pelikánová T: Metabolic characteristics of soleus muscle in relation to insulin action in the offspring of hypertensive parents. Metabolism. 2006;55(10):1388-96. IF 2,497.

Španiel F, Hájek T, Tintěra J, **Harantová P**, Dezortová M, Hájek M. Differences in fMRI and MRS in a monozygotic twin pair discordant for schizophrenia (case report). Acta Psychiatrica Scandinavica 2003;107(2):155-158. IF 2,356.

Tintěra J, **Harantová P**, Suchánek P, Adamová M, Hájek M, Poledne R: Quantification of intra-abdominal fat during controlled weight reduction: Assessment using water-suppressed breath-hold MRI technique. Physiol Res. 2004;53: 229-234. IF 1,104.

Škoch A, Jiráček D, **Vyhnanovská P**, Dezortová M, Fendrych P, Rolencová E, Hájek M: Classification of Calf Muscle MR Images by Texture Analysis. MAGMA. 2004;16(6):259-267. IF 1,431.

b) bez IF

Španiel F, Herynek V, Hájek T, Tintěra J, Horáček J, **Harantová P**, Dezortová M, Hájek M. Relaxometrie u monozygotních dvojčat diskordantních a konkordantních pro schizofrenii. Psychiatrie. 2003;7(3):18-20

Španiel F, Tintěra J, Hájek T, Dezortová M, **Harantová P**, Hájek M, Horáček J, Dockery DC, Kožený J. Language lateralization in monozygotic twins discordant for schizophrenia. Evidence from functional MRI. Psychiatrie 2003;7(4):301-303