

Příloha I - Publikace

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s impact faktorem

1. ŠEDIVÝ, P.; KIPFELSBERGER, M.C.; DEZORTOVÁ, M.; KRŠŠÁK, M.; DROBNÝ, M.; CHMELÍK, M.; RYDLO, J.; TRATTNIG, S.; HÁJEK, M.; VALKOVIČ, L. Dynamic ³¹P MR spectroscopy of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Medical Physics*. 2015, 42(4): 1678–1689. Dostupné z: DOI:10.1118/1.4914448 (IF = 2,496, 2015)
2. HÁJEK, M.; ŠEDIVÝ, P.; KOVÁŘ, J.; DEZORTOVÁ, M. Dynamická *in vivo* ³¹P MR spektroskopie člověka. *Chemické listy*. 2017, 111:516-523. ISSN 1213-7103. (IF = 0,387, 2016/2017)
Za článek udělena Preisova cena za nejlepší uvedenou publikaci v Chemických listech v roce 2017.
3. SEDIVY, P.; DEZORTOVA, M.; DROBNY, D.; VLASAKOVA Z.; HERYNEK V.; HAJEK M. Differences in muscle metabolism in patients with type I diabetes studied by rest and dynamic ³¹P MR spectroscopy. Differences in muscle metabolism in patients with type I diabetes studied by rest and dynamic ³¹P MR spectroscopy. *Physiol Res*. V tisku (pravděpodobně 2018, číslo 67(3)). (IF = 1.461, 2017)
4. SEDIVY, P.; DROBNY, M.; DEZORTOVA, M.; HERYNEK, V.; ROZTOCIL, K.; CERMAKOVA, H.; NEMCOVA, A.; DUBSKY, M.; HAJEK, M. ³¹P MR spectroscopy of patients with mild and serious lower limb ischemia. *International Angiology*. V tisku. (impakt 1,37, 2017).

b) bez impact faktoru

1. HEJLOVÁ, I.; DEZORTOVÁ, M.; ŠEDIVÝ, P.; DROBNÝ, M.; HÁJEK, M.; CAHOVÁ, M.; DAŇKOVÁ, H.; STICOVÁ, E.; TRUNEČKA, P. Metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD – výsledky pilotní studie. *Gastroent Hepatol*. 2016, 70(4):325-330. DOI:10.14735/amgh2016325.
2. NĚMCOVÁ, A.; DUBSKÝ, M.; JIRKOVSKÁ, A.; ŠEDIVÝ, P.; DROBNÝ, M.; HÁJEK, M.; DEZORTOVÁ, M.; BÉM, R.; FEJFAROVÁ, V.; PYŠNÁ, A. Syndrom diabetické nohy: význam MR spektroskopie lýtkových svalů pro hodnocení končetinové ischemie a efektu revaskularizace. *Vnitr Lek*. 2017, 63(4):236-241.

3. **ŠEDIVÝ, P.**; HERYNEK, V.; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; GÁLISOVÁ, A.; HÁJEK, M. ^{31}P a ^{19}F MR spektroskopie a zobrazování v IKEM. *Ces Radiol.* 2017, 71(4): 312–322. ISSN 1210-7883.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

a) s impact faktorem

1. DROBNÝ, M.; **ŠEDIVÝ P.**; DEZORTOVA, M.; WAGNEROVA.; D, HAJEK, M. Influence of breathing on the measurement of lipids in the myocardium by ^1H MR spectroscopy. *Phys Res.* 2015, 64(Suppl 3): S403-S409. (IF = 1,646, 2015)

b) bez impact faktoru

1. HÁJEK, M.; DROBNÝ, M.; **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M. ^1H MR spektroskopie – II. Stanovení tuků a citrát. *Ces Radiol.* 2017, 71(4): 305–311. ISSN 1210-7883.

3. Abstrakta v časopisech se vztahem k dizertační práci

a) abstrakta, která jsou plnohodnotnou součástí daného čísla časopisu

1. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; WAGNEROVÁ, D.; RYDLO, J.; ROZTOČIL, K.; HÁJEK, M. Dynamic ^{31}P MR spectroscopy in patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Kazuistiky v angiologii.* 2015, 2(1):30-31. ISSN 2336–27
2. DEZORTOVÁ, M.; **ŠEDIVÝ, P.**; DROBNÝ, M.; ROZTOČIL, K.; ČERMÁKOVÁ, H.; NĚMCOVÁ, A.; DUBSKÝ, M.; PEREGRIN, J.; HÁJEK, M. ^{31}P MR Spectroscopy in patients with peripheral artery occlusive disease. *Kazuistiky v angiologii.* 2017, 4(1):11. ISSN 2336–2790

b) abstrakta jako součásti supplements impaktovaných časopisů

1. **SEDIVY, P.**; DEZORTOVA, M.; DROBNY, M.; RYDLO, J.; VLASÁKOVÁ, Z.; HAJEK, M. 31P MR spectroscopy in patients with diabetes mellitus type 1. *Magn Reson Mater Phy.* 2013, 26(Suppl 1):279. DOI: 10.1007/s10334-013-0383-6
2. **SEDIVY, P.**; DEZORTOVA, M.; DROBNY, M.; RYDLO, J.; PEREGRIN, J.; CERMAKOVA, H.; ROZTOCIL, K.; HAJEK, M. Dynamic 31P MR Spectroscopy in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Magn Reson Mater Phy.* 2015, 28(Suppl 1):S167-168. DOI: 10.1007/s10334-015-0488-1
3. **SEDIVY, P.**; DROBNY, M.; DEZORTOVA, M.; HERYNEK, V.; RYDLO, J.; NEMCOVA, A.; PEREGRIN, J.; HAJEK, M. 31P MR spectroscopy findings in peripheral artery occlusive disease treatment. *Magn Reson Mater Phy.* 2016, 29(Suppl 1):S387-388. DOI: 10.1007/s10334-016-0570-3
4. **SEDIVY, P.**; DROBNY, M.; DEZORTOVA, M.; HEJLOVA, I.; CAHOV, M.; TRUNECKA, P.; HAJEK, M. Hepatic steatosis in patients after liver transplantation. *Magn Reson Mater Phy.* 2017, 30(Suppl 1):S141. DOI: 10.1007/s10334-017-0632-1

3. publikace v recenzním řízení, které jsou podkladem dizertace

1. MELENOVSKY, V.; HLAVATA, K.; **SEDIVY, P.**; DEZORTOVA, M.; BORLAUG, BA.; PETRAK, J.; KAUTZNER, J.; HAJEK, M. Skeletal muscle abnormalities and iron deficiency in chronic heart failure: An exercise 31P MR spectroscopy study of calf muscle. V recenzním řízení v *Circulation: Heart Failure* (impakt 6,372).

Mezinárodní kongresové příspěvky vzájemící se k obsahu dizertační práce

2013

1. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; VLASÁKOVÁ, Z.; HAJEK, M. 31P MR spectroscopy in patients with diabetes mellitus type 1. 30th Annual Scientific Meeting of European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, 3-5.10. 2013, Toulouse, Francie.

2014

2. **ŠEDIVÝ, P.**; KIPFELSBERGER, M.C.; DEZORTOVÁ, M.; KRŠŠÁK, M.; DROBNÝ, M.; CHMELÍK, M.; RYDLO, J.; TRATTNIG, S.; HAJEK, M.; VALKOVIČ, L. Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength (3 T and 7 T), and RF coil design. International Workshop „Magnetic Resonance Studies“, 26-28. 6. 2014, Sdoměřice u Bechyně, Česká republika.
3. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; WAGNEROVÁ, D.; RYDLO, J.; HAJEK, M. Dynamic ³¹P MR spectroscopy in IKEM. X nuclei meeting, 23-24.10.2014, Praha, Česká republika.

2015

4. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; WAGNEROVÁ, D.; RYDLO, J.; ROZTOČIL, K.; HAJEK, M. Dynamic ³¹P MR spectroscopy in patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. 40. angiologické dny, 19-21.2.2015, Praha, Česká republika.
5. **ŠEDIVÝ, P.**; KIPFELSBERGER, M.C.; DEZORTOVÁ, M.; KRŠŠÁK, M.; DROBNÝ, M.; CHMELÍK, M.; RYDLO, J.; TRATTNIG, S.; HAJEK, M.; VALKOVIČ, L. Reproducibility of dynamic phosphorus MRS of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength, and RF-coil design. 23rd Ann Meeting and Exhibition ISMRM, 30.5-6.6.2015, Toronto, Kanada.
6. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; WAGNEROVÁ, D.; RYDLO, J.; ROZTOČIL, K.; HAJEK, M. Dynamic 31P MR Spectroscopy in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. International Workshop „Magnetic Resonance Studies“. International Workshop „Magnetic Resonance Studies“, 21-23.5.2015, Semmering, Rakousko.
7. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; PEREGRIN, J.; CERMAKOVA, H.; ROZTOČIL, K.; HAJEK, M. Dynamic 31P MR Spectroscopy in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. 32nd Annual Scientific Meeting of European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, 1-3.10.2015, Edinburgh, Anglie.

8. DROBNÝ, M.; ŠEDIVÝ, P.; HERYNEK, V.; IBRAHIM, I.; VRATISLAVSKÁ, H.; DEZORTOVÁ, M.; HÁJEK, M. X-nuclei life in Prague 2015. X-nuclei Meeting, 22-23.10.2015, Vídeň, Rakousko.

2016

9. ŠEDIVÝ, P.; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; NĚMCOVÁ, A.; BÉM, R.; PEREGRIN, J.; ROZTOČIL, K.; ČERMÁKOVÁ, H.; HÁJEK, M. Diabetic patients with peripheral artery occlusive disease examined by dynamic 31P MR spectroscopy. International Workshop „Magnetic Resonance Studies“, 23-25.6.2016, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika.
10. SEDIVY, P.; DROBNY, M.; DEZORTOVA, M.; HERYNEK, V.; RYDLO, J.; NEMCOVA, A.; PEREGRIN, J.; HAJEK, M. 31P MR spectroscopy findings in peripheral artery occlusive disease treatment. No. 419, 33rd Annual Scientific Meeting of European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, 29.9-1.10.2017, Vídeň, Rakousko.
11. ŠEDIVÝ, P.; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; NĚMCOVÁ, A.; BÉM, R.; PEREGRIN, J.; ROZTOČIL, K.; ČERMÁKOVÁ, H.; HÁJEK, M. Dynamic 31P MR Spectroscopy in Ischemic Patients. X-nuclei Meeting, 13-14.10.2016, Bern, Švýcarsko.

2017

12. DEZORTOVÁ, M.; ŠEDIVÝ, P.; DROBNÝ, M.; ROZTOČIL, K.; ČERMÁKOVÁ, H.; NĚMCOVÁ, A.; DUBSKÝ, M.; PEREGRIN, J.; HÁJEK, M. ³¹P MR Spectroscopy in patients with peripheral artery occlusive disease. 42nd Czech Angiology Days ANGIO, 23-25.2. 2017, Praha, Česká republika.
13. SEDIVY, P.; DEZORTOVA, M.; DROBNY, M.; ROZTOCIL, K.; CERMAKOVA, H.; NEMCOVA, A.; DUBSKY, M.; PEREGRIN, J.; HAJEK, M. 31P MR spectroscopy of peripheral artery occlusive disease patients with and without diabetes. 25th Ann Meeting ISMRM, 22-27.5. 2017, Honolulu. USA.
14. SEDIVY, P.; DROBNY, M.; DEZORTOVA, M.; HEJLOVA, I.; CAHOVA, M.; TRUNECKA, P.; HAJEK, M. Effect of liver transplantation on muscle metabolism and the abdomen adipose tissue volume in diabetic and non-diabetic patients. 25th Ann Meeting ISMRM, 22-27.5. 2017, Honolulu, USA.
15. SEDIVY P, DROBNY M, DEZORTOVA M, HEJLOVA I, CAHOVA M, TRUNECKA P, HAJEK M. Hepatic steatosis in patients after liver transplantation. No. 145, 34th Ann Sci Meeting ESMRMB, 19-21.10. 2017, Barcelona, Španělsko.

České kongresové příspěvky vázající se k obsahu dizertační práce

2014

1. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; VLASÁKOVÁ, Z.; HÁJEK, M. Zátěžová fosforová (31P) MR spektroskopie lýtkového svalu při 3T a 7T. 7. výzkumné fórum Pyramida, 10.-12.1.2014, Jizerka.
2. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; VLASÁKOVÁ, Z.; HÁJEK, M. Zátěžová fosforová (31P) MR spektroskopie lýtkového svalu při 3T a 7T. 18. zasedání MR sekce, 18.-20.3.2014, Harrachov.

2015

3. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; WAGNEROVÁ, D.; RYDLO, J.; ROZTOČIL, K.; HÁJEK, M. Zátěžová 31P MR spektroskopie pacientů s ischemií dolních končetin. 8. výzkumné fórum Pyramida, 9.-11.1.2015, Jizerka.
4. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; WAGNEROVÁ, D.; RYDLO, J.; ROZTOČIL, K.; ČERMÁKOVÁ H.; HÁJEK, M. Zátěžová 31P MR spektroskopie pacientů s ischemií dolních končetin. XIX zasedání MR sekce, 17.-19.3.2015, Harrachov.
5. HÁJEK, M.; **ŠEDIVÝ, P.**; DROBNÝ, M.; DEZORTOVÁ, M. Dynamická 31P MR spektroskopie pro sledování ischemických změn dolních končetin. 26. kurz PTA – Belánovy dny, 24-25. 11. 2015, Praha.

2016

6. **ŠEDIVÝ, P.**; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; RYDLO, J.; NĚMCOVÁ, A.; BÉM, R.; PEREGRIN, J.; ROZTOČIL, K.; ČERMÁKOVÁ, H.; HÁJEK, M. Svalový metabolismus u pacientů s ICHDK před a po angioplastice. 9. výzkumné fórum Pyramida, 8.-10.1.2016, Jizerka.
7. **ŠEDIVÝ, P.** Dynamic phosphorus spectroscopy. IKEM and CEITEC Magnetic Resonance Imaging Workshop, 22.2.2016, Brno.

2017

8. **ŠEDIVÝ, P.** MR studie jater a svalů pacientů před a po Tx jater v grantu G249 (Genetický, transkriptomický a metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD/NASH). 10. Výzkumné fórum Pyramida, 6.-8.1.2017, Jizerka.

2018

9. **ŠEDIVÝ, P.**; DROBNÝ, M.; DEZORTOVÁ, M.; ROZTOČIL, K.; DUBSKÝ, M.; HÁJEK, M. Využití ³¹P MR spektroskopie u pacientů s ischemií dolních končetin. XXII. zasedání MR sekce, 13.-15.3.2018, Harrachov.

Impaktované publikace
vázající se k tématu dizertační práce

Dynamic ^{31}P MR spectroscopy of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design


Petr Šedivý, Monika Christina Kipfelsberger, Monika Dezortová, Martin Krššák, Miloslav Drobný, Marek Chmelík, Jan Rydlo, Siegfried Trattig, Milan Hájek, and Ladislav Valkovič

Citation: *Medical Physics* **42**, 1678 (2015); doi: 10.1118/1.4914448

View online: <http://dx.doi.org/10.1118/1.4914448>

View Table of Contents: <http://scitation.aip.org/content/aapm/journal/medphys/42/4?ver=pdfcov>

Published by the [American Association of Physicists in Medicine](#)



Earn ~14 CAMPEP CE Credits

ANNUAL QA FOR A LINAC!

Quality Content | Practical, Hands-on Experience | Peer-to-peer Instruction

April 17-18, 2015 [Register Now](#)

... *New* ...
TRAINING CENTER
WEBSITE

 **SUN NUCLEAR**
corporation

Dynamic ^{31}P MR spectroscopy of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design

Petr Šedivý

MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Monika Christina Kipfelsberger

High-Field MR Centre, Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria and Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna A-1090, Austria

Monika Dezortová^{a)}

MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Martin Krššák

High-Field MR Centre, Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria; Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine III, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria; and Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna A-1090, Austria

Miloslav Drobný

MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Marek Chmelík

High-Field MR Centre, Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria and Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna A-1090, Austria

Jan Rydlo

MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Siegfried Trattng

High-Field MR Centre, Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria and Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna A-1090, Austria

Milan Hájek

MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Ladislav Valkovič^{a)}

High-Field MR Centre, Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Medical University of Vienna, Vienna A-1090, Austria; Department of Imaging Methods, Institute of Measurement Science, Slovak Academy of Sciences, Bratislava 841 04, Slovakia; and Christian Doppler Laboratory for Clinical Molecular MR Imaging, Vienna A-1090, Austria

(Received 27 May 2014; revised 21 January 2015; accepted for publication 8 February 2015; published 17 March 2015)

Purpose: Dynamic phosphorus magnetic resonance spectroscopy (^{31}P MRS) during and after acute exercise enables the noninvasive *in vivo* determination of the mitochondrial capacity of skeletal muscle. Nevertheless, the lack of standardization in experimental setups leads to significant variations in published values of maximal aerobic capacity, even in the population of healthy volunteers. Thus, in this study, we aimed to assess the impact of the ergometer type (pneumatic and mechanical resistance construction), radiofrequency (RF)-coil diameter, and different magnetic field strengths (3 and 7 T) on the metabolic parameters measured by dynamic ^{31}P MRS during a plantar flexion isotonic exercise protocol within the same group of healthy volunteers.

Methods: Dynamic ^{31}P MRS measurements of the calf muscle in 11 volunteers (mean age, 36 ± 13 yrs; mean BMI, 23.5 ± 2.5 kg/m²), on a 3 T MR system with a custom-made mechanical ergometer in the first research laboratory (RL1) and on 3 and 7 T MR systems equipped with a commercial pneumatic ergometer in the second research laboratory (RL2), were performed at three different workloads. RF-coils differed slightly between the sites and MR systems used. The repeatability of the experimental protocol was tested in every setup. The basal concentrations of phosphocreatine

(PCr), exercise-induced depletion of PCr (ΔPCr), initial PCr resynthesis rate (V_{PCr}), and mitochondrial capacity (Q_{max}) were calculated and compared between the research sites and field strengths.

Results: High repeatability of the measurement protocol was found in every experimental setup. No significant differences at any workload were found in these metabolic parameters assessed at different magnetic field strengths (3 T vs 7 T), using the same ergometer (in RL2) and a similar RF-coil. In the inter-research laboratory comparison at the same field strength (3 T), but with using different ergometers and RF-coils, differences were found in the concentration of PCr measured at rest and in the drop in PCr signal intensity. These differences translated into difference in the value of mitochondrial capacity at a workload of 15% of maximal voluntary contraction (MVC) force (0.45 ± 0.16 mM/s vs 0.31 ± 0.08 mM/s, in the RL1 and RL2, respectively).

Conclusions: Metabolic parameters measured during exercise challenge by dynamic ^{31}P MRS do not depend upon the magnetic field strength used. For multicenter studies with different ergometers, it is important to set the same workload, measurement, and evaluation protocols, especially when the effects of very mild exercise (15% MVC) are to be compared. However, a higher workload (24% MVC) decreases the influence of imperfections and intersite differences for the assessed value of maximal mitochondrial capacity. © 2015 American Association of Physicists in Medicine. [<http://dx.doi.org/10.1118/1.4914448>]

Key words: energy metabolism, dynamic ^{31}P MR spectroscopy, ergometers, comparison, 3 T MRS, 7 T MRS, calf muscle

1. INTRODUCTION

In vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy (^{31}P MRS) is a noninvasive method that enables the assessment of concentrations of metabolites important for energy metabolism. Alterations in the levels of phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (Pi), and in pH values measured during dynamic exercise-recovery experiments in skeletal muscles have a direct relationship to aerobic and anaerobic metabolism, and thus, to muscle function. Furthermore, dynamic ^{31}P MRS can be used to calculate maximal oxidative flux (Q_{max}), defining mitochondrial capacity.¹ Therefore, in the last several decades, ^{31}P MRS has been used to describe normal physiology,² training status,^{3,4} and pathophysiology of various muscular diseases (e.g., Duchenne muscular dystrophy⁵ or mitochondrial myopathy⁶). In addition, the effects of systemic metabolic (e.g., diabetes mellitus^{7,8}) and cardiovascular (e.g., peripheral arterial disease^{9,10}) diseases on skeletal muscle oxidative capacity have been intensively studied with dynamic ^{31}P MRS.

Although exercise-recovery ^{31}P MRS experiments are used in many institutions for a range of applications, the published data on oxidative metabolism or mitochondrial capacity in healthy volunteers often differ between research laboratories.^{11–20} A few examples of such literature data are given in Table I.

This discrepancy is usually attributed to the different study population, measurement protocol, data processing method, or equipment used. The interindividual differences can, of course, play a major role in small studies, but their importance tends to decrease in larger studies. More important, most of the experiments use the sensitivity volume of the radiofrequency (RF) coil for signal localization. A different design or size of the RF-coils can cause not only the variation in the size of the sensitive volume within exercised muscle but can also

cause partial volume effects, including signal from adjacent nonexercising muscle groups.

In addition, there is also a large variation in another piece of hardware to consider. Next to commercially available MR-compatible ergometers, many custom-built devices^{21–24} have been designed and used. They can differ in the art of load calibration and ergonomics of the exercise movement. Recently, the use of ultrahigh field strengths (i.e., 7 T) has been promoted for ^{31}P MR experiments.^{25–28} The improved spectral resolution, increased signal-to-noise ratio (SNR) and fitting precision of the 7 T system (compared to 3 T), as well as the difference in saturation effects caused by field-dependent relaxation times of individual phosphorus metabolites, may also lead to some discrepancy in the evaluated metabolic parameters.

Thus, the study equipment used (e.g., the ergometer, the RF-coil, or the magnetic field) likely counts as the most probable source of differences for the whole experiment.

Therefore, the aim of this bicentric study was to investigate the potential influence of using either different ergometers and RF-coil designs or magnetic field strengths (3 and 7 T) on the variability in muscle metabolism parameters measured in the same pool of volunteers, using the identical exercise protocol.

2. MATERIALS AND METHODS

Eleven healthy volunteers (3f/8m; mean age, 36 ± 13 yrs; mean BMI, 23.5 ± 2.5 kg/m²; moderate physical activity; no smokers) were recruited for this study and provided written, informed consent in agreement with the local ethics committee regulations. Each volunteer underwent three ^{31}P MRS examinations on different experimental setups within one month. Whole-body MR systems (two 3 T and one 7 T) from the same manufacturer (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany), equipped with comparable dual-channel $^1\text{H}/^{31}\text{P}$

TABLE I. An interstudy comparison of τ_{PCr} (s) and Q_{max} (mM/s) of the calf muscle measured in healthy volunteers at different magnetic field strengths B_0 (T) using surface coils of different diameters and different experimental devices (ergometers).

n	Mean age	Ref.	B_0	coil	Ergo	WL	Protocol	τ_{PCr}	Q_{max}
14	33	11	1.5	6	not spec.	not spec.	3	44 ± 6	0.51 ± 0.09
17	31	12	1.5	15	cst.	3.5 kg	6	67 ± 14	0.65 ± 0.16
12	24 ± 6	13	1.5	11.5	com. pneu.	50% MVC	4	31 ± 19	0.47 ± 0.22
10	51 ± 9	14	1.8	8	cst. mech.	Pi/PCr=0.7	3	44 ± 11	0.73 ± 0.32
12	58 ± 11	15	2	6	mech.	10% LBM+	Till exh.	—	0.75 ± 0.18
14	25 ± 4	16	2	6	mech.	10% LBM+	Till exh.	—	1.07 ± 0.12
9	21 ± 2	17	2.1	8	cst. mech.	60% MVC	4	27 ± 7	—
27	33 ± 6	18	4.1	7	cst.	70% MVC	1.5	33 ± 12	0.59 ± 0.18
27	33 ± 6	18	4.1	7	cst.	100% MVC	1.5	33 ± 12	0.67 ± 0.19
7	28 ± 8	19	7	10.5	cst. pneu.	50% MVC	5	61 ± 10	—
10	41 ± 8	20	7	10	com. pneu.	25% MVC	6	46 ± 15	0.41 ± 0.14

Note: n , number of healthy volunteers; Ref., literature reference; B_0 , magnetic field strength; coil, diameter of the surface coil; ergo, properties of the experimental device (cst., custom build; com., commercial; mech., mechanical; pneu., pneumatic; not spec., not specified); WL, workload (LBM, lean body mass; +, increment; MVC, maximal voluntary contraction force); protocol, duration of exercise in minutes (exh., exhaustion).

surface coils (Rapid Biomedical, Rimpär, Germany) and an ergometer for plantar flexion exercise, were used in two different research laboratories (RL). In RL1, a Tim Trio MR system (3 T), equipped with a flexi, dual-tuned, $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ coil (11 cm diameter) and a home-built mechanical ergometer,²⁹ was used. The mechanical part of this ergometer consists of an aluminum construction behind the MR scanner with a holder for weights connected by an inflexible cord with the actual pedal depicted in Fig. 1(A). Displacement of the weights during exercise is measured with a potentiometer and WinATS software (Sysma, Aix-en-Provence, France) is used for signal recording.

In the RL2, an air pressure-based pneumatic ergometer (Trispect, Ergospect, Innsbruck, Austria) was used on a 3 T (Tim Trio) and a 7 T (Magnetom) MR systems equipped with a similar rigid, $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ coils (10 cm diameter) tuned to the frequency according to the magnetic field used. The axis of rotation was in this case aligned with the axis of the ankle [see Fig. 1(B)], contrary to the home-built ergometer at RL1 where the rotation axis was below the level of the foot. To ensure the same workloads on the ergometers in both RLs, workload calibration measurements were performed and a calibration curve was calculated between the weights and the air pressure used in the pneumatic pedal.

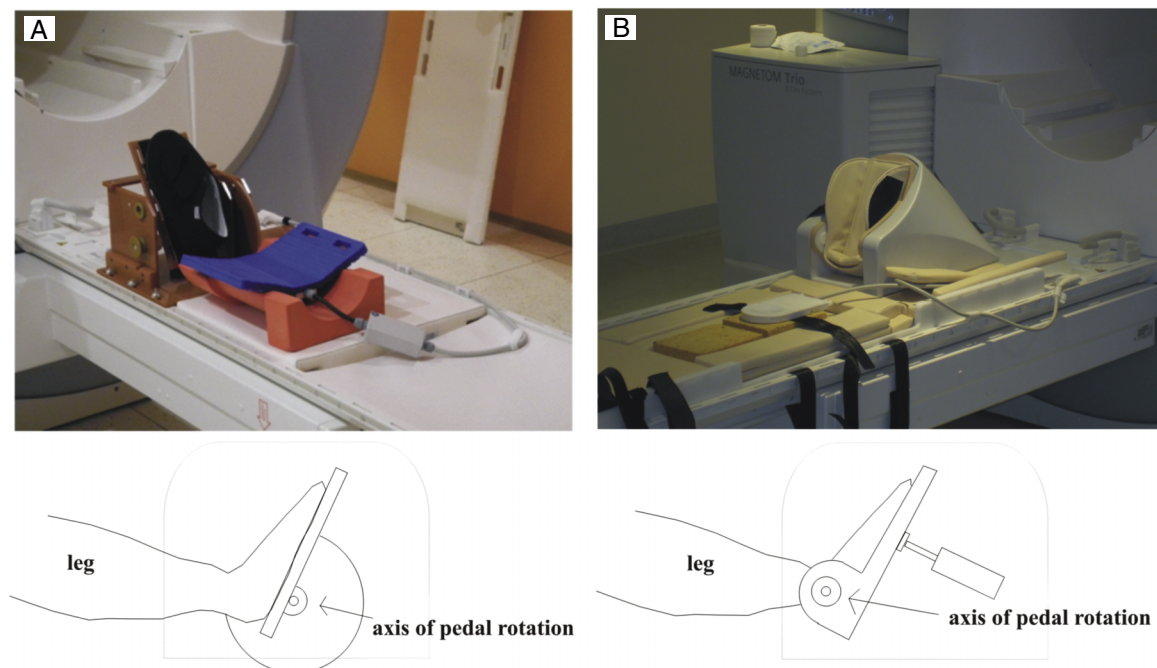


FIG. 1. Photos and simple schemes of the used ergometers; (A) custom-made ergometer of the RL1 and (B) commercial ergometer of the RL2. Position of the axis of pedal rotation in relation to the ankle is highlighted.

The volunteers were examined in a supine position with the coil fixed underneath the medial head of the left gastrocnemius muscle. The foot of the volunteers was strapped to the pedal of the ergometer, fixing the heel in a stable position, in both RLs. The position of the gastrocnemius muscle over the RF-coil was confirmed by a localizer MRI sequence. After shimming on the total proton water signal, a ³¹P MRS rectangular excitation pulse (duration 400 μs) was calibrated to a 90° flip angle (FA) by a series of several free induction decay (FID) acquisitions of total PCr signal.

The dynamic examination (2 min rest—6 min exercise—6 min recovery^{20,30}) was performed by the plantar flexion performed once in every repetition time (2 s) in three rounds, with three different, fixed workloads, i.e., pedal resistances: (I) 1.2 bars, (II) 1.8 bars, and (III) 2.4 bars (1.2 and 1.8 bars at RL2 correspond to 7 and 10.5 kg at RL1, respectively; a bar is the internal unit of pressure used by the designer of the pneumatic ergometer, 1 bar = 0.1 MPa). No higher weight than 10.5 kg was used in the RL1 due to the limitations of the ergometer. To objectively define the relative resistance of each workload for the study population, the maximal voluntary contraction (MVC) force during the plantar flexion of the calf muscle of each volunteer was measured outside the MR system using an in-house-developed exercise device (adapted from Ref. 21) with a fixed pedal. Acoustic synchronization was used to navigate the subject during the exercise period of the experiment. The interval between two consecutive exercises was at least 15 min to allow for a full metabolic recovery of the exercised muscles.

The nonlocalized acquisition sequence (FID) was identical for both 3 T systems (rectangular 400 μs excitation, acquisition delay (TE*) = 0.4 ms, TR = 2 s, vector size 1024) and for the 7 T system with the increase in acquisition bandwidth (5 kHz rather than 3 kHz) and difference in FA used (48° rather than 42°, Ernst angle for given TR and mean *T*₁ of PCr and Pi at a given *B*₀). A resting, partially relaxed (96%) ³¹P MR spectrum (TE* = 0.4 ms, TR = 15 s, 16 averages) was also acquired for the assessment of basal metabolite concentrations.

The repeatability of the described measurement protocol was investigated in each experimental setup (both RLs and both MR systems in RL2) by test–retest measurements. Five volunteers were recruited in each RL for the repeatability study. The exercise protocol was repeated twice for two workloads [(I) and (II)], within one session, including full repositioning, shimming, and data acquisition. Or, if not possible, the second measurement was performed on a consecutive day at the same time of the day, to avoid the diurnal changes in muscle energy metabolism.

To assess the impact of different designs, and, therefore sensitivity profiles, of the used RF-coils (flexi with 11 cm in diameter in RL1 and rigid with the diameter of 10 cm in RL2), maps of ³¹P signal from the calf muscle of five of the volunteers were measured and compared. Measurements were performed on the 3 T systems at both sites using a 3D chemical shift imaging (CSI) sequence with a volume of interest = 200 × 200 × 200 mm³, matrix = 12 × 12 × 12, weighted acquisition, and two averages. The rest of the parameters were

similar to the dynamic experiments: TE = 1 ms, TR = 2 s, flip angle = 42°, vector size 1024, bandwidth 3000 Hz, and rectangular excitation pulse duration 400 μs.

3. DATA EVALUATION

Quantification of the MR spectra was accomplished in jMRUI software using the AMARES time domain-fitting routine.³¹ After phasing the spectra, the peaks were fitted as single Lorentzians, except the adenosine triphosphate (ATP) signals, where the γ- and α-ATP were fitted as Lorentzian doublets and β-ATP as a triplet. No data filtering or zero-filling was performed prior to the spectra fitting.

The γ-ATP signal was used as a concentration reference, assuming a stable ATP concentration of 8.2 mM in the muscle tissue,^{32,33} because the usually used β-ATP signal is affected by the limited bandwidth of the excitation pulse at 7 T. Partial saturation correction was performed using previously published relaxation times at 3 and 7 T.²⁶

The chemical shift of Pi relative to PCr in parts per million (δ) was used to calculate the intracellular pH (Ref. 34) according to the Henderson-Hasselbalch equation

$$pH = 6.75 + \log\left(\frac{\delta - 3.27}{5.63 - \delta}\right). \quad (1)$$

To calculate the time constant of PCr recovery, the PCr concentration changes during the recovery period were fitted to a monoexponential function, expressed by

$$[PCr](t) = [PCr]_{\text{end_exercise}} + \Delta[PCr](1 - e^{-t/\tau_{PCr}}), \quad (2)$$

where *t* is time in seconds, [PCr]_{end_exercise} is the concentration of PCr at the end of exercise (mean of PCr concentrations measured during last 30 s of exercise), Δ[PCr] is the difference in the PCr concentration at rest and [PCr]_{end_exercise}, and τ_{PCr} is the time constant of the PCr recovery rate (s).

The initial PCr recovery rate (*V*_{PCr}) roughly representing the ATP turnover at the end of exercise was calculated as follows:

$$V_{PCr} = \frac{\Delta[PCr]}{\tau_{PCr}}. \quad (3)$$

The maximal oxidative flux (*Q*_{max}) was calculated according to the model of Michaelis and Menten, taking into account ADP at the end of exercise ([ADP]_{end}), *V*_{PCr}, and the Michaelis-Menten constant (*K*_m), which was assumed to be 30 μM,³⁵

$$Q_{\text{max}} = V_{PCr} \left(1 + \frac{K_m}{[ADP]_{\text{end}}}\right), \quad (4)$$

where the free cytosolic ADP concentration ([ADP]) was calculated according to the method described by Kemp,³⁶ assuming constant total creatine concentration throughout all measurements and 15% of total creatine [Cr] not being phosphorylated in the resting state³⁷

$$[ADP] = \frac{[ATP] \cdot [Cr]}{[PCr] \cdot H^+ \cdot K_{\text{eq}}}, \quad (5)$$

where H^+ is the concentration of proton ions and K_{eq} is the equilibrium constant.

The repeatability of the measurement was assessed as the coefficient of variation (CV) of calculated metabolic parameters. To evaluate the reliability of the experiment, an intra-class correlation parameter for two-way random factor model ($\text{ICC}_{2,1}$) was calculated according to Shrout and Fleiss.³⁸ All individual parameters were compared between the 3 and 7 T MR systems equipped with the similar RF-coil and the same ergometer, as well as between the 3 T systems in the two RLs (different ergometers and RF-coils) by agreement analysis of Altman and Bland.³⁹ A range of agreement was defined as mean bias ± 1.96 standard deviations. The SNR of the PCr signal at rest and at the end of exercise, the Cramer-Rao lower bounds (CRLB) of the PCr signal fitting and the fitting precision (r) of the PCr recovery were also compared between the 3 and 7 T data. The statistical analysis was performed using SPSS software (version 17.0; IBM SPSS, Chicago, IL).

The spatial variations in the PCr signal were calculated from the 3D ^{31}P CSI data using the fitting routine of the syngo MR software (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany).

Regions of interest (ROIs) were manually drawn over the soleus, gastrocnemius medialis, and gastrocnemius lateralis muscles (Fig. 2) on the proton anatomical images and then transposed to ^{31}P CSI PCr maps.

The increase in voxel size due to weighted acquisition was taken into account and the signal from the voxels adjacent to the border voxels was also used. The ratio of the signal within the monitored muscle groups to the total PCr signal measured by the coil was assessed. This calculation was performed with a custom-written software in MATLAB (Mathworks, Natick, MA).

4. RESULTS

4.A. The repeatability

The test-retest variability of the Q_{max} was in all setups under 13.5%, with even lower CVs, if workload II was used in comparison to workload I. Similarly, the calculated $\text{ICC}_{2,1}$ parameters of Q_{max} determination show very good to high reliability ($\text{ICC} = 0.88 - 0.97$) with an increased reliability at

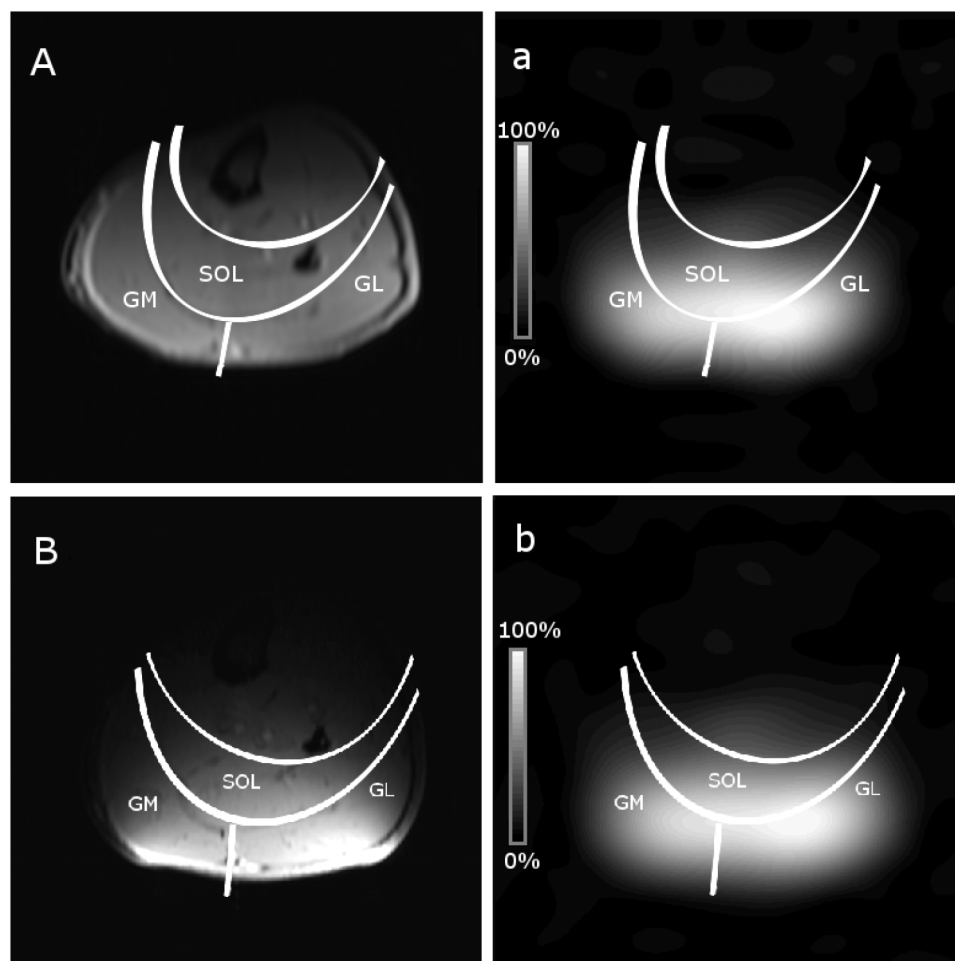


FIG. 2. Sensitivity map evaluation of both coils used in the same subject. [(A) and (a)] 11 cm flexi coil and [(B) and (b)] 10 cm rigid coil. [(A) and (B)] ^1H localizer image and [(a) and (b)] signal intensity map of the PCr signal calculated from the acquired 3D ^{31}P CSI. Manually drawn borders of ROIs used for analysis are depicted on both images for direct comparison (GM, gastrocnemius medialis; GL, gastrocnemius lateralis; and SOL, soleus muscle). Note that the outside voxels, adjacent to the muscle borders, contain signal from the muscles due to the increased voxel size. These voxels were therefore included in the analysis.

TABLE II. CVs and ICCs of the measurement protocol repeatability and reliability calculated for following parameters: PCr concentration (mM), PCr signal drop (%)—ratio of the $\Delta[\text{PCr}]$ to the $[\text{PCr}]$ at rest, τ_{PCr} (s), ρH at the end of exercise, V_{PCr} (mM/s), and Q_{max} (mM/s).

CV	B_0	WL	[PCr] (%)	PCr drop (%)	τ_{PCr} (%)	ρH (%)	V_{PCr} (%)	Q_{max} (%)
RL1	3 T	I	1.9	9.0	6.1	0.3	8.6	6.5
RL1	3 T	II	6.0	13.3	6.1	0.1	6.9	6.1
RL2	3 T	I	2.8	14.5	9.0	0.1	17.8	13.2
RL2	3 T	II	1.1	6.6	9.6	0.1	10.8	10.3
RL2	7 T	I	1.7	15.4	7.6	0.1	16.5	12.4
RL2	7 T	II	4.7	16.1	7.9	0.2	12.5	8.3
ICC _{2,1}	B_0	WL	[PCr]	PCr drop	τ_{PCr}	ρH	V_{PCr}	Q_{max}
RL1	3 T	I	0.95	0.94	0.98	0.79	0.94	0.94
RL1	3 T	II	0.82	0.94	0.96	0.93	0.99	0.97
RL2	3 T	I	0.95	0.83	0.80	0.78	0.89	0.92
RL2	3 T	II	0.97	0.99	0.83	0.98	0.97	0.94
RL2	7 T	I	0.98	0.95	0.81	0.96	0.92	0.88
RL2	7 T	II	0.95	0.85	0.96	0.88	0.90	0.91

workload II in comparison to workload I. More details on CVs and ICCs of all evaluated parameters are given in Table II.

4.B. The effect of magnetic field (7 T vs 3 T) in RL2

The use of a stronger magnetic field (7 T against 3 T) resulted in increased SNR of the PCr MRS signal at rest (655 ± 51 vs 270 ± 41) as well as at the end of exercise (559 ± 74 vs 245 ± 50 , 546 ± 60 vs 218 ± 44 , and 431 ± 102 vs 175 ± 43 for the workloads I–III, respectively) and improved fitting precision of the PCr signal (CRLB = $1.06\% \pm 0.44\%$ vs $1.22\% \pm 0.38\%$) and PCr recovery ($r = 0.962 \pm 0.049$ vs 0.828 ± 0.135). However, the limits of agreement were found to be exceptionally narrow between the measurements at 3 and 7 T systems for all of the measured parameters, using the same ergometer and RF-coils with an identical design. Agreement analysis of [PCr] and Q_{max} determination from the 3 and 7 T measurements in RL2 is depicted by Bland Altman plots in Fig. 3. Detailed information on the calculated metabolic parameters measured in the RL2 at 3 and 7 T is given in Table III.

4.C. The effect of different ergometers and RF-coil designs (RL1 vs RL2)

Representative time courses of the PCr signal intensity between the measurements at 3 T in RL1 and RL2 are depicted in Fig. 4.

The comparison of the determined metabolic parameters ([PCr] and Q_{max}), when different equipment (ergometer and RF-coils) in two RLs was used, is shown in Fig. 5 and more details are given in Table IV.

The measured PCr concentration at rest and the PCr drop were higher in RL1 (the mean bias well above zero). This difference resulted in higher values of V_{PCr} and Q_{max} at the workload I. On the other hand, the level of agreement was much higher (the mean bias closer to zero and narrower

range of agreement) at the workload II. The measures of mitochondrial capacity were found to increase with pedal resistance in both research laboratories.

According to the measured MVC values, the workloads used in our dynamic experiments represent in average $15\% \pm 5\%$ MVC, $24\% \pm 8\%$ MVC, and $32\% \pm 11\%$ MVC for workloads I–III, respectively.

The sensitivity maps of the coils used are depicted in Fig. 2. The results of the coil comparison showed that the flexi coil (11 cm in diameter) provided on average more signal from the gastrocnemius medialis as expected. More details on the sensitivity maps comparison are denoted in Table V.

5. DISCUSSION

In this study, we compared the parameters of muscle metabolism measured by dynamic ³¹P MRS under different experimental conditions. Measurements were performed in three experimental setups using two different ergometers, two different RF-coil designs, and three MR systems (two 3 T and one 7 T) in the same study group at three different workloads. Mechanical and pneumatic ergometers, in combination with RF-surface coils of different designs, were compared at 3 T and the influence of magnetic field strength (3 T vs 7 T) was tested with the same ergometer and a RF-coil of identical design. Our study thus reflects only the influence of the experimental equipment used and exercise intensity on the calculated metabolic parameters. Nonlocalized acquisition was used for its simplicity, robustness, and widespread use. Higher magnetic field strength generally improves the data quality and increases the reliability, but no significant differences between metabolic parameters were found in this respect. The different equipment used was found to have strong influence on the results, but only during exercise at lower workload (15% MVC). When higher workload was used (24% MVC), almost no differences were found in the measured mitochondrial capacity.

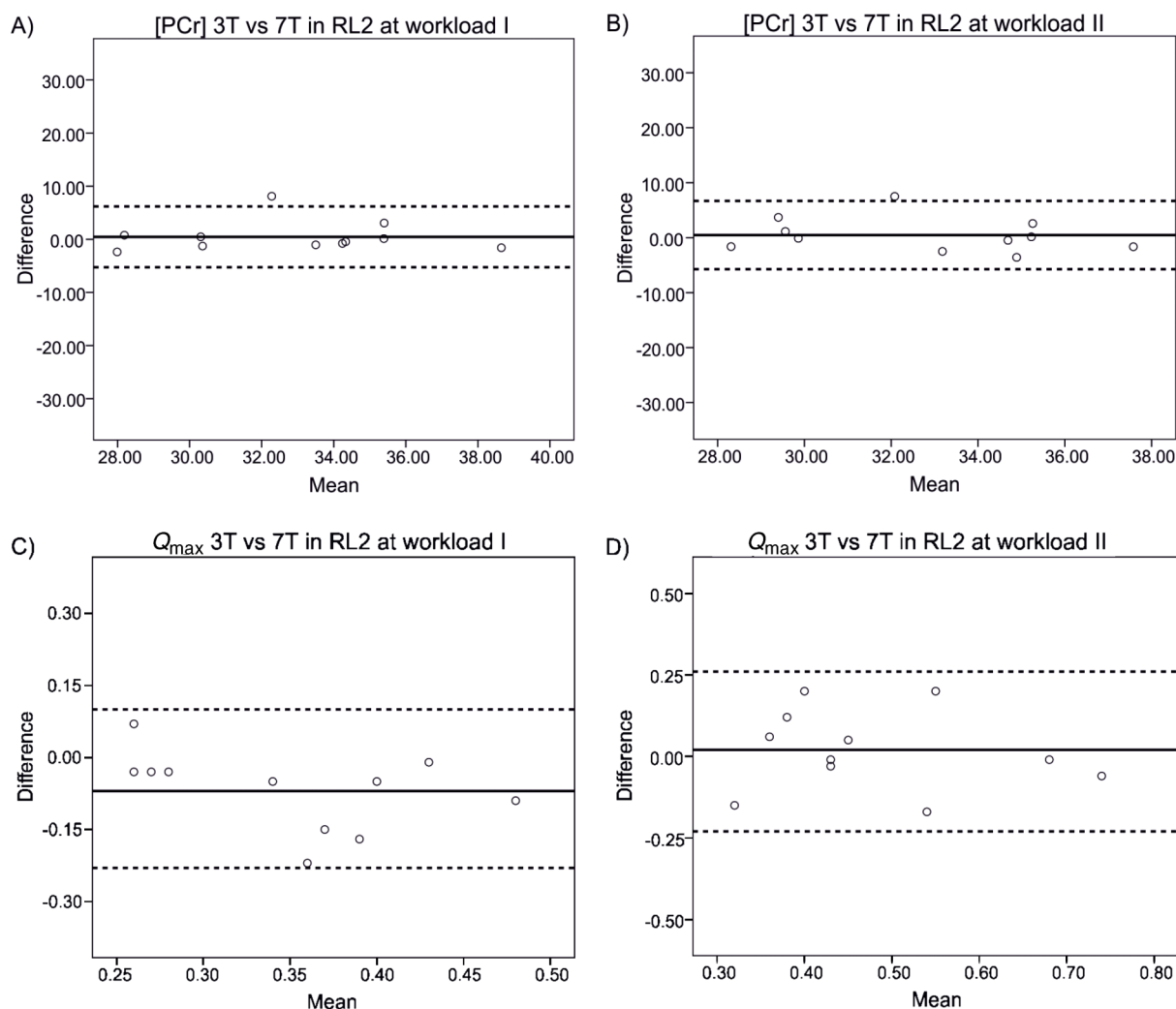


FIG. 3. Method agreement analysis of [PCr] [(A) and (B)] and Q_{max} [(C) and (D)] values measured at 3 and 7 T in the RL2 at workloads I and II depicted by Bland Altman plots. Full line represents the mean difference and the dashed lines border the limits of agreement (± 1.96 standard deviation of differences). (A) depicts the agreement in determination of [PCr] from measurements at 3 and 7 T at workload I and (B) at workload II. The Bland Altman plot (C) depicts the agreement in Q_{max} between 3 and 7 T measurements at workload I [and (D)] at workload II.

The repeatability of our experimental protocol in both RLs can be considered high, as the mean test–retest CV of the Q_{max} calculation was under 13.5% in any experimental setup. The CVs of Q_{max} were even lower (under 10.5%) in measurements with higher workload (24% MVC) in comparison to measurements when lower workload (15% MVC) was used. The evaluation of measurement reliability showed similar results

as the $ICC_{2,1}$ parameter for Q_{max} determination was 0.88–0.97 for all experimental setups, with higher values for higher workload (24% MVC).

As the measurements of the same healthy volunteers were performed in short time intervals without life-style intervention, physiological changes in metabolism were unlikely. Similarly, Layec *et al.*³⁰ reported high reproducibility

TABLE III. Dynamic parameters measured in RL2 using different magnetic field strengths. The data are given as mean \pm standard deviation.

Workload	I		II		III	
	3 T	7 T	3 T	7 T	3 T	7 T
B_0						
PCr conc. (mM)	33.0 \pm 3.8	32.5 \pm 3.6	33.0 \pm 3.2	32.5 \pm 3.8	32.2 \pm 3.4	31.2 \pm 3.1
PCr drop (%)	12 \pm 5	12 \pm 3	22 \pm 10	20 \pm 8	31 \pm 14	28 \pm 13
τ_{PCr} (s)	31 \pm 7	33 \pm 4	31 \pm 6	31 \pm 6	31 \pm 10	31 \pm 6
V_{PCr} (mM/s)	0.13 \pm 0.05	0.12 \pm 0.04	0.24 \pm 0.11	0.22 \pm 0.09	0.32 \pm 0.10	0.27 \pm 0.11
Q_{max} (mM/s)	0.31 \pm 0.08	0.30 \pm 0.07	0.49 \pm 0.15	0.47 \pm 0.15	0.57 \pm 0.11	0.49 \pm 0.13
pH	7.08 \pm 0.01	7.07 \pm 0.02	7.05 \pm 0.04	7.05 \pm 0.03	7.04 \pm 0.04	7.05 \pm 0.03

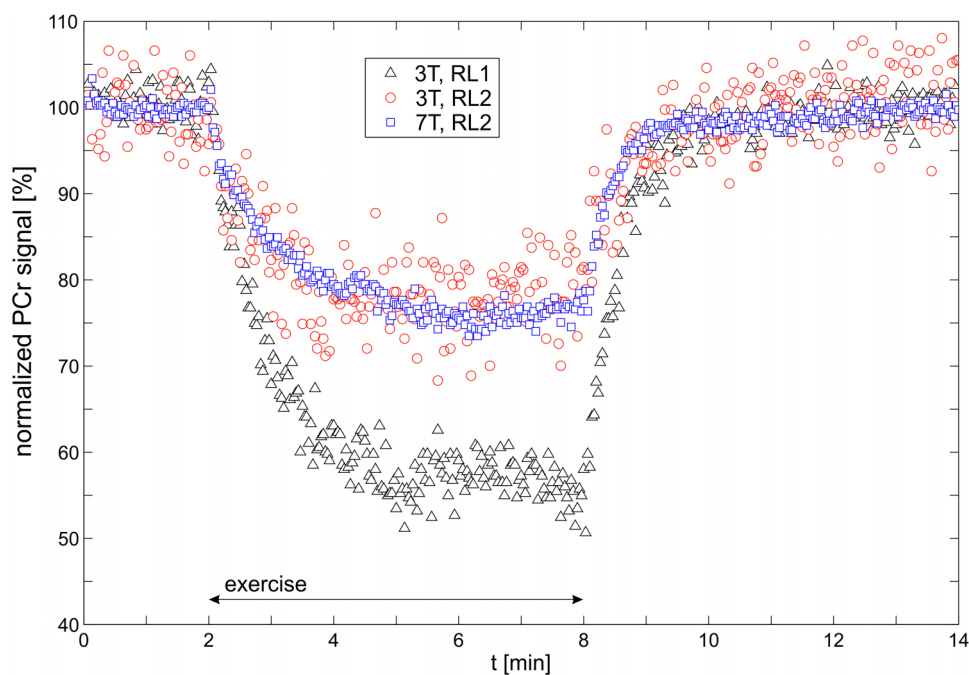


FIG. 4. Time courses of PCr signal, of the same volunteer, normalized to rest values (100%) from RL1 3 T and RL2 3 T data, with a workload of 1.8 bars. The 7 T data from the RL2 are also depicted, for direct comparison. For this volunteer, the measured PCr signal drop was 44%, 22%, and 23% for 3 T in RL1, 3 T in RL2, and 7 T in RL2, respectively. Other parameters given in the same order of used experimental setup: $\tau_{\text{PCr}} = 38, 35, \text{ and } 30 \text{ s}$; $V_{\text{PCr}} = 0.38, 0.21, \text{ and } 0.26 \text{ mM/s}$; and $Q_{\text{max}} = 0.60, 0.44, \text{ and } 0.54 \text{ mM/s}$.

of the nonlocalized ^{31}P MRS, even in examinations one-year apart, justifying the time delay (one month) between measurements performed in this study at the two institutions. It has been shown that the first exercise bout may potentially alter the parameters measured in the following bouts if strong acidification is present and time between bouts allowed for skeletal muscle relaxation is too short.⁴⁰ However, the workloads used in our study were not too strenuous, as proven by the relatively high pH values of over 7.0 at the end of exercise. Furthermore, Forbes *et al.*⁴¹ showed that the influence of previous exercise on intracellular $[\text{H}^+]$ became undetectable after 15 min of rest which is identical with the resting time interval chosen in our study. Therefore, we can assume fully recovered skeletal muscles at the beginning of the second and third round of exercise.

A comparison of our results with the results from studies applying similar exercise protocols (5–6 min of mild exercise, calf muscle) shows very good conformity regarding the time constant of PCr recovery ($\tau_{\text{PCr}} = 35 \pm 1 \text{ s}$, Meyerspeer *et al.*;⁴² $\tau_{\text{PCr}} = 30 \pm 2 \text{ s}$, Haseler *et al.*⁴³). Trends in metabolic parameters in relation to workload observed in our investigations are also in good agreement with previous reports on knee-extension exercise.³⁰ Layec *et al.*,³⁰ observed an increase in PCr depletion, V_{PCr} , and Q_{max} between mild and heavy exercise, with higher reliability of the results at a heavy workload. This is consistent with our data, where the mean values of PCr drop, V_{PCr} , and Q_{max} measured on all three MR systems also differed between workloads. The difference in Q_{max} between the low and mild pedal workload is even more pronounced compared to the difference between mild and heavy exercise, showing that the use of higher resistance (24% MVC) better

reveals the real mitochondrial capacity. As higher workloads provoke anaerobic metabolism presenting with lower pH at the end of exercise, special care was taken not to allow muscle acidification. Interpreting our data, we can assume that the exercise was performed under aerobic conditions.

5.A. Magnetic field strength

The 2.4-fold increase in the SNR of the PCr signal between 3 and 7 T found in this study is in good agreement with previous reports comparing ^{31}P MRS at these two fields.^{26,44} This improvement in SNR resulted into better spectra (CRLB = $1.06\% \pm 0.44\%$ vs $1.22\% \pm 0.38\%$) and recovery data fitting ($r = 0.962 \pm 0.049$ vs 0.828 ± 0.135), and therefore, more reliable calculation of mitochondrial capacity. However, these differences did not cause any discrepancies in the calculated parameters of τ_{PCr} and V_{PCr} . The values of mitochondrial capacity were also in agreement between 3 and 7 T measurements ($Q_{\text{max}} = 0.31 \pm 0.08, 0.49 \pm 0.15, \text{ and } 0.57 \pm 0.11$ vs $0.30 \pm 0.07, 0.47 \pm 0.15, \text{ and } 0.49 \pm 0.13 \text{ (mM/s)}$ for workloads I–III at 3 T vs 7 T, respectively, see Table III). These results suggest that even though low signal can be an issue in ^{31}P MRS, the data SNR of the PCr MRS signal achieved in our experimental protocol are sufficient to reliably determine the parameters of muscle metabolism, and that the experimental setup is more likely to be responsible for the discrepancies found when comparing results from RL1 and RL2.

5.B. Comparison of RF-coils and ergometers

In experiments performed at 3 T, significantly higher values of PCr concentration and depletion were found in

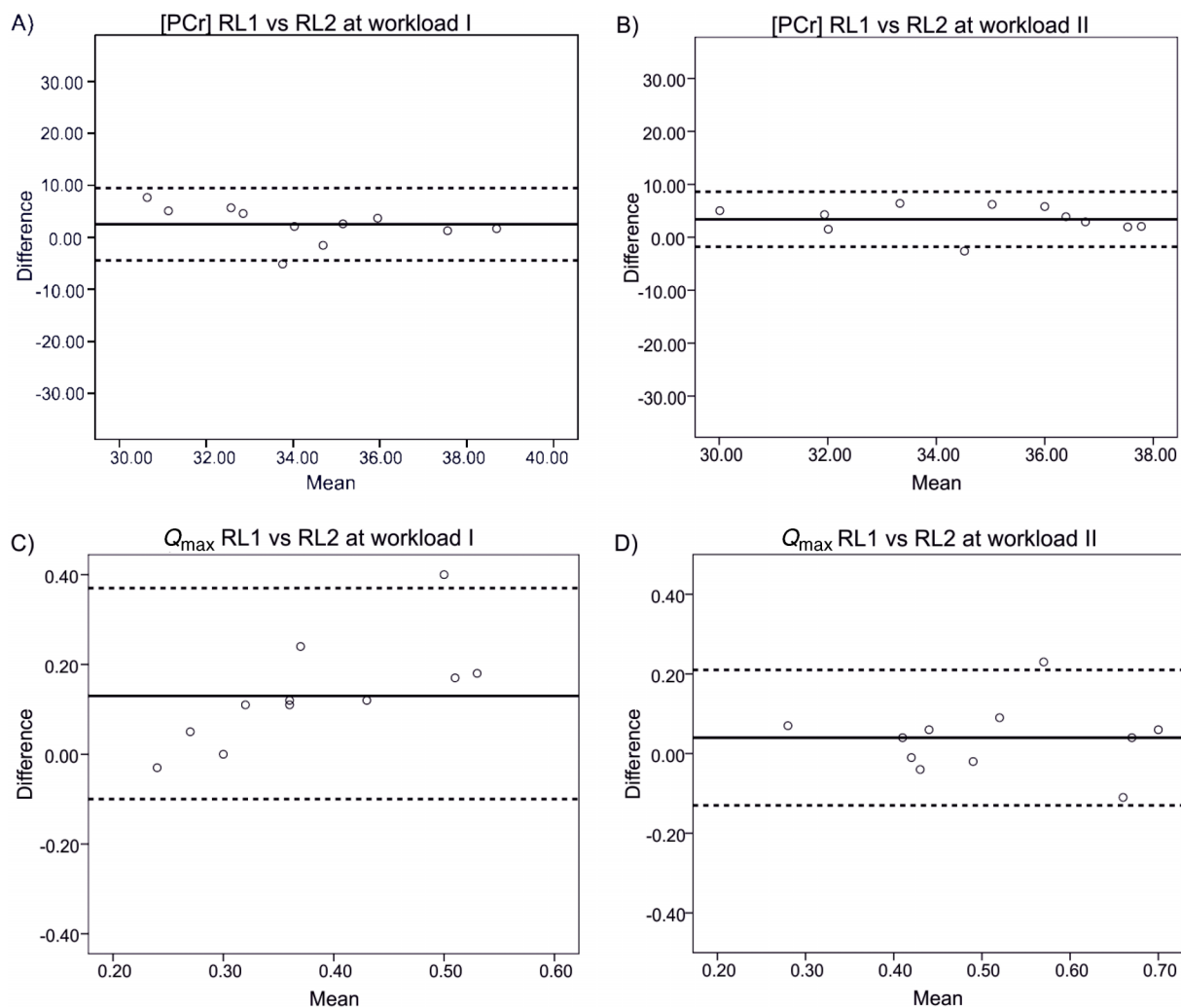


FIG. 5. Agreement analysis of [PCr] [(A) and (B)] and Q_{\max} [(C) and (D)] values determination from the data measured at 3 T systems in RL1 and RL2 at workloads I and II depicted by Bland Altman plots. Full line represents the mean difference and the dashed lines border the limits of agreement (± 1.96 standard deviation of differences). (A) depicts the agreement in measured [PCr] between RL1 and RL2 at workload I and (B) at workload II. The plot (C) depicts the Bland Altman agreement in Q_{\max} values between RL1 and RL2 measurements at workload I and (D) at workload II.

the RL1 compared to values from RL2. These differences yielded higher values of V_{PCr} and Q_{\max} . This was more pronounced in the examination with a lower workload (15% MVC), presenting also with slightly lower reproducibility (our data and Layec *et al.*³⁰). The limits of agreement for calculated Q_{\max} values were at workload II (24% MVC) exceptionally narrow (-0.13 – 0.21) showing good agreement

between the measurements using different equipment in RL1 and RL2.

Differences in PCr concentration were likely caused by the different geometry of the used RF-coils. The flexible construction and 1 cm extra in diameter (11 cm vs 10 cm) of the phosphorus channel caused a difference in the sensitivity volume of the RF-coil in the RL1. This was confirmed

TABLE IV. Dynamic parameters measured at 3 T using mechanical and pneumatic ergometers and different RF-coils in two different research laboratories.

Workload	I		II	
	RL1	RL2	RL1	RL2
PCr conc. (mM)	35.5 ± 2.7	33.0 ± 3.8	36.7 ± 2.7	33.0 ± 3.2
PCr drop (%)	20 ± 14	12 ± 5	33 ± 15	22 ± 10
τ_{PCr} (s)	34 ± 7	31 ± 7	41 ± 9	31 ± 6
V_{PCr} (mM/s)	0.21 ± 0.12	0.13 ± 0.05	0.30 ± 0.13	0.24 ± 0.11
Q_{\max} (mM/s)	0.45 ± 0.16	0.31 ± 0.08	0.53 ± 0.15	0.49 ± 0.15
pH	7.04 ± 0.04	7.08 ± 0.01	7.02 ± 0.04	7.05 ± 0.04

TABLE V. Coil sensitivity maps evaluation: Muscle-specific PCr signal/total PCr signal (M/T).

Coil Muscle	Flexi (11 cm in diameter)–RL1			Rigid (10 cm in diameter)–RL2		
	Gastrocnemius lateralis	Gastrocnemius medialis	Soleus	Gastrocnemius lateralis	Gastrocnemius medialis	Soleus
M/T (%)	22.6 ± 5.2	27.6 ± 8.8	27.8 ± 7.2	25.0 ± 8.0	23.2 ± 7.1	26.2 ± 2.5

by the measured ³¹P sensitivity maps of both coils used at 3 T. The flexible coil of RL1 provides better coverage of the calf, and therefore, on average, more signal from the gastrocnemius medialis and soleus muscles. The facts that the concentration of PCr is higher in the gastrocnemius medialis⁴⁵ and that the gastrocnemius medialis is the most involved muscle during plantar flexion¹⁹ support the hypothesis that this difference in sensitivity could be partly responsible for the differences in measured PCr concentration and depletion. However, imperfectly reproduced positioning of the coil can also contribute to these differences and in spite of good repeatability of the measurement has to be considered as a limitation of the current study.

The differences in RF-coil sensitivity can become overcome by using localization schemes for signal acquisition, especially at higher field strengths that provide enough SNR. Several approaches have been suggested recently (e.g., single-voxel MRS,⁴² slab-selective MRS,^{20,46} or frequency-selective MR imaging^{47,48}). However, the nonlocalized acquisition is, at the moment, the most commonly used method, and was, therefore, also used in this comparison study. Further investigation of the intercenter comparability using localized techniques might be beneficial in the future.

Moreover, the greater PCr drop in the RL1 could have also been caused by the different construction of the pedal, which could translate into a different gastrocnemius-specific workload. Although care was taken to set similar pedal resistance in both institutions, the possibility of pedal movement of the mechanical ergometer over a greater angular range could cause higher total work done. Furthermore, while the design and construction of the pneumatic ergometer enables rotation directly in the ankle axis, resulting in a more natural pushing of the pedal and less motion artifacts, the custom-made ergometer has its axis of rotation underneath the ankle, inducing a more complex motion, possibly leading to higher PCr depletion. Therefore, the motion flexibility that is needed for pedaling in RL1 does not allow better fixation of the ankle, introducing more concentric contraction. This could also explain the higher τ_{PCr} values at the mechanical ergometer, which became visible at higher pedal resistance (24% MVC).

In addition to the already mentioned imperfect repositioning of the surface coil, another subject-related limitation of our study has to be considered. Fixed values of workload were used rather than setting the workload levels according to an individual's MVC, leading to intersubject differences in PCr depletion at the same workload. The MVC of all subjects was also measured and ranged 10%–25% MVC, 16%–39% MVC, and 21%–54% MVC for workloads I, II,

and III, respectively. However, the differences in metabolic parameters at specific workloads were analyzed and only minimal intersubject variability was observed.

Furthermore, there was no absolute quantification performed in this study, and thus, the concentrations of PCr and total creatine used to calculate [ADP] and consecutively Q_{max} were only estimated, based on the literature data. In particular, the estimate of constant [Cr] throughout all measurements and that 15% of total [Cr] is not being phosphorylated at rest might not be valid for every exercise protocol.³³ However, this assumption is commonly used for exercise protocols similar to the one used in this study,^{20,30,49} and as it was used to analyze datasets measured in every experimental setup, it should not influence the results of our comparison.

Nevertheless, all these noted limitations did not substantially influence the assessed mitochondrial capacity, and our results show that the differences in used equipment no longer played a significant role at a higher workload (24% MVC).

6. CONCLUSION

Our results show that several factors must be considered in the determination of measures of mitochondrial capacity based on dynamic ³¹P MRS examination. Next to similar measurements and evaluation protocols, a comparable exercise workload, based on calibration measurements as well as on the individual ergometer design, must be used for multicenter studies. To overcome small discrepancies in the exercise intensity, a moderately high workload (24% MVC) is beneficial, as it provides comparable measures of mitochondrial capacity. Attention must also be paid to the sensitive volume of the RF-coils used, as it can influence the calculation of metabolite concentrations, and, subsequently mitochondrial capacity. Furthermore, we conclude that the increase of the magnetic field from 3 to 7 T improves the data quality, but it does not affect the determination of mitochondrial capacity.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Project Nos. IGA MH CR NT11275-6, MHCZ-DRO 00023001IKEM Vienna Spots of Excellence of the Wiener Wissenschafts-und Technologie-Fonds (Grant No. #FA102A0017—Vienna Advanced Clinical Imaging Center to S.T.), the OeNB Jubilaumsfond (Grant No. #15455 to L.V.), the program AKTION Austria-Czech Republic (Grant No. #66p3), and the Slovak Grant Agencies (Grant Nos. VEGA #2/0013/14 and APVV #0513-10).

- ^{a)} Authors to whom correspondence should be addressed. Electronic addresses: mode@ikem.cz; Telephone: +420-23605 5245; Fax: +420-24172 8224 and ladislav.valkovic@meduniwien.ac.at; Telephone: +431-40400-37720; Fax: +431-40400-76310.
- 1 G. J. Kemp and G. K. Radda, "Quantitative interpretation of bioenergetic data from ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: An analytical review," *Magn Reson Q.* **10**, 43–63 (1994).
 - 2 J. J. Prompers, J. A. Jeneson, M. R. Drost, C. C. Oomens, G. J. Strijkers, and K. Nicolay, "Dynamic MRS and MRI of skeletal muscle function and biomechanics," *NMR Biomed.* **19**, 927–953 (2006).
 - 3 G. Layec, A. Bringard, Y. Le Fur, C. Vilmen, J. P. Micallef, S. Perrey, P. J. Cozzone, and D. Bendahan, "Comparative determination of energy production rates and mitochondrial function using different ³¹P MRS quantitative methods in sedentary and trained subjects," *NMR Biomed.* **24**, 425–438 (2004).
 - 4 L. Valkovič, B. Ukropcová, M. Chmelík, M. Baláž, W. Bogner, A. I. Schmid, I. Frollo, E. Zemková, I. Klimeš, J. Ukropec, S. Trattnig, and M. Krššák, "Interrelation of ³¹P-MRS metabolism measurements in resting and exercised quadriceps muscle of overweight-to-obese sedentary individuals," *NMR Biomed.* **26**, 1714–1722 (2013).
 - 5 R. J. Newman, P. J. Bore, L. Chan, D. G. Gadian, P. Styles, D. Taylor, and G. K. Radda, "Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy," *Br. Med. J.* **284**, 1072–1074 (1982).
 - 6 T. Taivassalo, E. A. Shoubridge, J. Chen, N. G. Kennaway, S. Dimauro, D. L. Arnold, and R. G. Haller, "Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: Physiological, biochemical, and genetic effects," *Ann. Neurol.* **50**, 133–141 (2001).
 - 7 S. F. Praet, H. M. De Feyter, R. A. Jonkers, K. Nicolay, C. van Pul, H. Kuipers, L. J. van Loon, and J. J. Prompers, "³¹P MR spectroscopy and in vitro markers of oxidative capacity in type 2 diabetes patients," *Magn. Reson. Mater. Phys., Biol. Med.* **19**, 321–331 (2006).
 - 8 G. J. Crowther, J. M. Milstein, S. A. Jubrias, M. J. Kushmerick, R. K. Gronka, and K. E. Conley, "Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin-dependent (type 1) diabetes," *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **284**, E655–E662 (2003).
 - 9 L. J. Hands, M. H. Sharif, G. S. Payne, P. J. Morris, and G. K. Radda, "Muscle ischaemia in peripheral vascular disease studied by ³¹P-magnetic resonance spectroscopy," *Eur. J. Vasc. Surg.* **4**, 637–642 (1990).
 - 10 R. Esterhammer, M. Schocke, O. Gorny, L. Posch, H. Messner, W. Jaschke, G. Fraedrich, and A. Greiner, "Phosphocreatine kinetics in the calf muscle of patients with bilateral symptomatic peripheral arterial disease during exhaustive incremental exercise," *Mol. Imaging Biol.* **10**, 30–39 (2008).
 - 11 S.-F. Ko, C.-C. Huang, M.-J. Hsieh, S.-H. Ng, C.-C. Lee, C.-C. Lee, T.-K. Lin, M.-C. Chen, and L. Lee, "³¹P MR Spectroscopic: Assessment of muscle in patients with myasthenia gravis before and after thymectomy: Initial experience," *Radiology* **247**, 162–169 (2008).
 - 12 S. Khushu, P. Rana, T. Sekhri, G. Sripathy, and R. P. Tripathi, "Bio-energetic impairment in human calf muscle in thyroid disorders: A ³¹P MRS study," *Magn. Reson. Imaging* **28**, 683–689 (2010).
 - 13 G. Layec, L. J. Haseler, J. Hoff, C. R. Hart, X. Liu, Y. Le Fur, E.-K. Jeong, and R. S. Richardson, "Short-term training alters the control of mitochondrial respiration rate before maximal oxidative ATP synthesis," *Acta Physiol.* **208**, 376–386 (2013).
 - 14 D. M. Mancini, G. Walter, N. Reichek, R. Lenkinski, K. K. McCully, J. L. Mullen, and J. R. Wilson, "Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure," *Circulation* **85**, 1364–1373 (1992).
 - 15 R. Lodi, D. J. Taylor, S. J. Tabrizi, D. Hilton-Jones, M. V. Squier, A. Seller, P. Styles, and A. H. Schapira, "Normal in vivo skeletal muscle oxidative metabolism in sporadic inclusion body myositis assessed by ³¹P-magnetic resonance spectroscopy," *Brain* **121**, 2119–2126 (1998).
 - 16 R. Lodi, G. J. Kemp, F. Muntoni, C. H. Thompson, C. Rae, J. Taylor, P. Styles, and D. J. Taylor, "Reduced cytosolic acidification during exercise suggests defective glycolytic activity in skeletal muscle of patients with Becker muscular dystrophy. An in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study," *Brain* **122**, 121–130 (1999).
 - 17 T. Yoshida, D. Abe, and Y. Fukuoka, "Phosphocreatine resynthesis during recovery in different muscles of the exercising leg by ³¹P-MRS," *Scand. J. Med. Sci. Sports* **23**, e313–e319 (2013).
 - 18 D. E. Larson-Meyer, B. R. Newcomer, G. R. Hunter, D. R. Joannise, R. L. Weinsier, and M. M. Bamman, "Relation between in vivo and in vitro measurements of skeletal muscle oxidative metabolism," *Muscle Nerve* **24**(12), 1665–1676 (2001).
 - 19 M. Meyerspeer, S. Robinson, C. I. Nabuurs, T. Scheenen, A. Schoisengeier, E. Unger, G. J. Kemp, and E. Moser, "Comparing localized and nonlocalized dynamic ³¹P magnetic resonance spectroscopy in exercising muscle at 7 T," *Magn. Reson. Med.* **68**, 1713–1723 (2012).
 - 20 L. Valkovič, M. Chmelík, I. Just Kukurová, M. Jakubová, M. C. Kipfelsberger, P. Krumpolec, M. Tušek Jelenc, W. Bogner, M. Meyerspeer, J. Ukropec, I. Frollo, B. Ukropcová, S. Trattnig, and M. Krššák, "Depth-resolved surface coil MRS (DRESS)-localized dynamic ³¹P-MRS of the exercising human gastrocnemius muscle at 7 T," *NMR Biomed.* **27**, 1346–1352 (2014).
 - 21 M. Meyerspeer, M. Krššák, G. J. Kemp, M. Roden, and E. Moser, "Dynamic interleaved ¹H/³¹P STEAM MRS at 3 Tesla using a pneumatic force-controlled plantar flexion exercise rig," *Magn. Reson. Mater. Phys., Biol. Med.* **18**, 257–262 (2005).
 - 22 J. A. Jeneson, J. P. Schmitz, P. A. Hilbers, and K. Nicolay, "An MR-compatible bicycle ergometer for in-magnet whole-body human exercise testing," *Magn. Reson. Med.* **63**, 257–261 (2010).
 - 23 G. Layec, A. Bringard, C. Vilmen, J. P. Micallef, Y. L. Fur, S. Perrey, P. J. Cozzone, and D. Bendahan, "Accurate work-rate measurements during in vivo MRS studies of exercising human quadriceps," *Magn. Reson. Mater. Phys., Biol. Med.* **21**, 227–235 (2008).
 - 24 K. Tschiesche, M. Rothamel, R. Rzanny, A. Gussew, P. Hiepe, and J. R. Reichenbach, "MR-compatible pedal ergometer for reproducible exercising of the human calf muscle," *Med. Eng. Phys.* **36**, 933–937 (2014).
 - 25 H. Lei, K. Ugurbil, and W. Chen, "Measurement of unidirectional Pi to ATP flux in human visual cortex at 7 T by using in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14409–14414 (2003).
 - 26 W. Bogner, M. Chmelik, A. I. Schmid, E. Moser, S. Trattnig, and S. Gruber, "Assessment of ³¹P relaxation times in the human calf muscle: A comparison between 3 T and 7 T in vivo," *Magn. Reson. Med.* **62**, 574–582 (2009).
 - 27 J. P. Wijnen, W. J. van der Kemp, M. P. Luttje, M. A. Korteweg, P. R. Luijten, and D. W. Klomp, "Quantitative ³¹P magnetic resonance spectroscopy of the human breast at 7 T," *Magn. Reson. Med.* **68**, 339–348 (2012).
 - 28 L. Valkovič, M. Chmelík, I. Just Kukurová, M. Krššák, S. Gruber, I. Frollo, S. Trattnig, and W. Bogner, "Time-resolved phosphorous magnetization transfer of the human calf muscle at 3 T and 7 T: A feasibility study," *Eur. J. Radiol.* **82**, 745–751 (2013).
 - 29 P. Sedivý, M. Dezortova, M. Drobny, J. Rydlo, Z. Vlasakova, and M. Hajek, in *Proceedings of the ESMRMB 2013*, Toulouse (2013), p. 356.
 - 30 G. Layec, A. Bringard, Y. Le Fur, C. Vilmen, J. P. Micallef, S. Perrey, P. J. Cozzone, and D. Bendahan, "Reproducibility assessment of metabolic variables characterizing muscle energetics in vivo: A ³¹P-MRS study," *Magn. Reson. Med.* **62**, 840–854 (2009).
 - 31 L. Vanhamme, A. van den Boogaart, and S. Van Huffel, "Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge," *J. Magn. Reson.* **129**, 35–43 (1997).
 - 32 D. J. Taylor, P. Styles, P. M. Matthews, D. A. Arnold, D. G. Gadian, P. Bore, and G. K. Radda, "Energetics of human muscle: Exercise-induced ATP depletion," *Magn. Reson. Med.* **3**, 44–54 (1986).
 - 33 G. J. Kemp, M. Meyerspeer, and E. Moser, "Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ³¹P MRS: A quantitative review," *NMR Biomed.* **20**, 555–565 (2007).
 - 34 R. B. Moon and J. H. Richards, "Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance," *J. Biol. Chem.* **248**, 7276–7278 (1973).
 - 35 G. J. Kemp, "Interactions of mitochondrial ATP synthesis and the creatine kinase equilibrium in skeletal muscle," *J. Theor. Biol.* **170**, 239–246 (1994).
 - 36 G. J. Kemp, D. J. Taylor, and G. K. Radda, "Control of phosphocreatine resynthesis during recovery from exercise in human skeletal muscle," *NMR Biomed.* **6**, 66–72 (1993).
 - 37 G. J. Kemp, M. Roussel, D. Bendahan, Y. Le Fur, and P. J. Cozzone, "Interrelations of ATP synthesis and proton handling in ischaemically exercising human forearm muscle studied by ³¹P magnetic resonance spectroscopy," *J. Physiol.* **535**, 901–928 (2001).
 - 38 P. E. Shrout and J. L. Fleiss, "Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability," *Psychol. Bull.* **86**, 420–428 (1979).
 - 39 D. G. Altman and J. M. Bland, "Measurement in medicine: The analysis of method comparison studies," *The Statistician* **32**, 307–317 (1983).
 - 40 T. Yoshida and H. Watari, "Changes in intracellular pH during repeated exercise," *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **67**, 274–278 (1993).
 - 41 S. C. Forbes, G. H. Raymer, J. M. Kowalchuk, R. T. Thompson, and G. D. Marsh, "Effects of recovery time on phosphocreatine kinetics during repeated bouts of heavy-intensity exercise," *Eur. J. Appl. Physiol.* **103**, 665–675 (2008).

- ⁴²M. Meyerspeer, T. Scheenen, A. I. Schmid, T. Mandl, E. Unger, and E. Moser, "Semi-LASER localized dynamic ³¹P magnetic resonance spectroscopy in exercising muscle at ultra-high magnetic field," *Magn. Reson. Med.* **65**, 1207–1215 (2011).
- ⁴³L. J. Haseler, A. P. Lin, and R. S. Richardson, "Skeletal muscle oxidative metabolism in sedentary humans: ³¹P-MRS assessment of O₂ supply and demand limitations," *J. Appl. Physiol.* **97**, 1077–1081 (2004).
- ⁴⁴P. Parasoglou, D. Xia, G. Chang, and R. R. Regatte, "3D-mapping of phosphocreatine concentration in the human calf muscle at 7 T: Comparison to 3 T," *Magn. Reson. Med.* **70**, 1619–1625 (2013).
- ⁴⁵L. Valkovič, W. Bogner, M. Gajdošík, M. Považan, I. Just Kukurová, M. Krššák, S. Gruber, I. Frollo, S. Trattinig, and M. Chmelík, "One-dimensional image-selected in vivo spectroscopy localized phosphorus saturation transfer at 7 T," *Magn. Reson. Med.* **72**, 1509–1515 (2014).
- ⁴⁶G. Walter, K. Vandenborne, K. K. McCully, and J. S. Leigh, "Noninvasive measurement of phosphocreatine recovery kinetics in single human muscles," *Am. J. Physiol.-Cell. Physiol.* **272**, C525–C534 (1997).
- ⁴⁷R. L. Greenman and H. A. Smithline, "The feasibility of measuring phosphocreatine recovery kinetics in muscle using a single-shot ³¹P RARE MRI sequence," *Acad. Radiol.* **18**, 917–923 (2011).
- ⁴⁸P. Parasoglou, D. Xia, G. Chang, and R. R. Regatte, "Dynamic three-dimensional imaging of phosphocreatine recovery kinetics in the human lower leg muscles at 3 T and 7 T: A preliminary study," *NMR Biomed.* **26**, 348–356 (2013).
- ⁴⁹A. I. Schmid, V. B. Schrauwen Hinderling, M. Andreas, M. Wolzt, E. Moser, and M. Roden, "Comparison of measuring energy metabolism by different ³¹P-magnetic resonance spectroscopy techniques in resting, ischemic, and exercising muscle," *Magn. Reson. Med.* **67**, 898–905 (2012).

DYNAMICKÁ *IN VIVO* ^{31}P MR SPEKTROSKOPIE ČLOVĚKA

Věnováno 30. výročí zavedení MR metod v IKEM.

MILAN HÁJEK^a, PETR ŠEDIVÝ^{a,b}, JAN KOVÁŘ^a a MONIKA DEZORTOVÁ^a

^a Oddělení klinické a experimentální MR spektroskopie, Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie (ZRIR), Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM), Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4, ^b 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

milan.hajek@ikem.cz, petr.sedivy@ikem.cz,
jan.kovar@ikem.cz, monika.dezortova@ikem.cz

Došlo 12.5.17, přijato 14.6.17.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: *in vivo* dynamická ^{31}P MR spektroskopie, energetický metabolismus svalu, pH svalu, mitochondriální kapacita

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. *In vivo* ^{31}P MR spektroskopie
 - 1.2. ^{31}P MR spektrum kosterních svalů v klidu a při fyzické zátěži
 - 1.3. Technika měření spekter *in vivo* dynamickou ^{31}P MR spektroskopií
 - 1.4. Zpracování dynamických ^{31}P MR spekter
2. Metabolické děje a ^{31}P MR spektroskopie v klidu a při fyzické zátěži
 - 2.1. Základní rovnice pro zpracování dat dynamické ^{31}P MR spektroskopie
 - 2.2. Informace ze spekter získaných dynamickou ^{31}P MR spektroskopií
3. Aplikace *in vivo* ^{31}P MR spektroskopie
4. Závěr

1. Úvod

Z fyziologického hlediska je svalová kontrakce popsána jako stahování a uvolňování svalů na základě aktivace pohybu myozinových vláken podél aktinových struktur v sarkomerách. Tyto aktinové molekulární motory ve svém důsledku umožňují dva základní typy svalové práce – izometrickou a izotonickou. Izotonická práce je založena na prodlužování nebo zkracování svalů proti stálému nebo měnícímu se odporu, naopak izometrická je

založena na měření svalového napětí. Z makroskopického hlediska lze tuto práci měřit několika typy ergometrů a tato měření umožňují provádění řady fyziologických studií a případně i hodnocení klinického stavu pacientů.

Z molekulárního hlediska je palivem aktinových molekulárních motorů adenosintrifosfát (ATP), jehož hydrolyza na adenosindifosfát (ADP) a anorganický fosfát (Pi) způsobuje konformační změny myozinu a tím i mikroskopický posun těchto vláken podél aktinu. Sledování změn koncentrací sloučenin fosforu zapojených do syntézy a degradace makroergních sloučenin umožňuje *in vivo* fosforová (^{31}P) MR spektroskopie. Tato metoda patří mezi neinvazivní metody magnetické rezonance, kde především zobrazování magnetickou rezonancí dosáhlo největšího rozšíření v klinické praxi. Spektroskopické MR metody, především protonová (^1H) MR spektroskopie jsou v současné době nejčastěji využívány jako výzkumné metody nebo speciální metody doplňující zobrazovací MR vyšetření v klinické a experimentální medicíně.

Předkládaný přehledný článek představuje tuto mezioborovou biomedicínskou metodu a popisuje metodiky měření a zpracování *in vivo* dynamických ^{31}P MR vyšetření kosterních svalů člověka.

1.1. *In vivo* ^{31}P MR spektroskopie

^{31}P MR spektroskopie *in vivo* byla poprvé popsána v 80. letech minulého století a vzhledem k jednoduchosti získání ^{31}P MR spekter z tkání a *in vivo* spekter svalů malých laboratorních zvířat přispěla významně k popisu energetického metabolismu svalů^{1,2}. Na konci 80. let byly již k dispozici celotělové MR tomografy, které umožnily vyšetřování lidských svalů, a v tomto období také vznikly základní publikace věnované této problematice^{3–6}. Další rozvoj metodiky nastal po roce 2010 s rozšířením klinických celotělových MR tomografů pracujících se super a ultra vysokým magnetickým polem (3T, 7T), které umožňují efektivnější *in vivo* MR spektroskopii a zobrazování jiných jader než jsou protony^{7,8}.

V současnosti jsou klinické MR tomografy běžně dodávány s hardwarem a softwarem pro *in vivo* ^1H MR spektroskopii. Na některých specializovaných pracovištích jsou k tomuto hardwaru přidávány multinukleární jednotky, které umožňují měření i dalších izotopů (X-nuclei MR). Pro klinické experimenty je nejrozšířenější sledování izotopu ^{31}P , které se stalo součástí standardního klinického vyšetření pacientů se svalovým postižením. V tab. I jsou uvedeny parametry čtyř nejčastěji sledovaných izotopů MR spektroskopii v humánní medicíně.

Izotop ^{31}P má jaderný spin rovný $\frac{1}{2}$ a 100% přírodní zastoupení. Není bez zajímavosti, že první *in vivo* MR spektra tkání byla naměřena vysoko rozlišující ^{31}P NMR

Tabulka I

MR rezonanční frekvence (f_0) a receptivita klinicky využitelných nuklidů

Nuklid	Spin	Přírodní zastoupení	γ [$10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$]	Receptivita ^a	f_0 (3T) [MHz]
^1H	1/2	~ 100 %	267	1	128
^{13}C	1/2	1,20 %	67	$1,8 \cdot 10^{-4}$	32
^{23}Na	3/2	~ 100 %	71	0,092	34
^{31}P	1/2	~ 100 %	108	0,066	52

^a Receptivita = $\gamma_x^3 / \gamma_{1\text{H}}^3 \cdot Z_x / Z_{\text{H}}$, Z – přírodní zastoupení daného isotopu; γ – gyromagnetický poměr

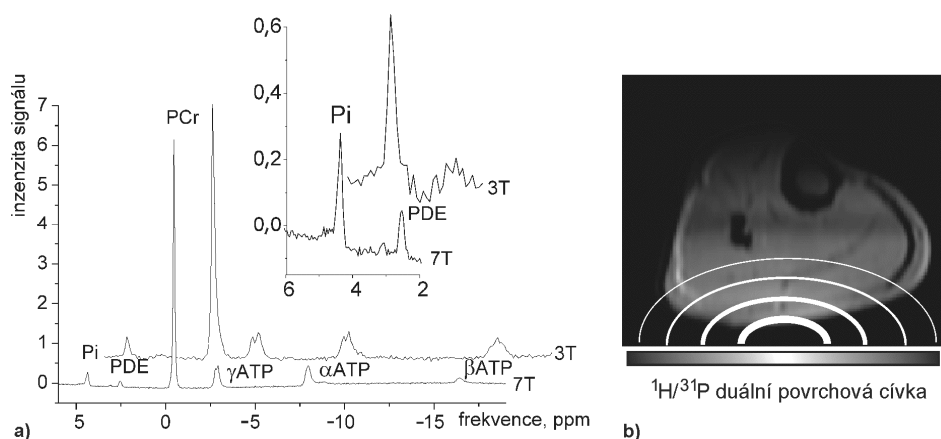
spektroskopii již před více než 40 lety². Bylo to díky skutečnosti, že v živých tkáních je jen omezený počet metabolitů s dostatečnou koncentrací pro měření ^{31}P *in vivo* MR spekter a žádný z těchto metabolitů se výrazně neodlišuje svou koncentrací tak, jako je tomu v případě ^1H MR spektroskopie, kdy o několik řádů silnější signál vody byl po řadu let omezujícím faktorem aplikace *in vivo* ^1H MR spektroskopie. Detegovatelné metabolity fosforu pozorovatelné ^{31}P MRS na celotělových tomografech jsou především makroergní fosfáty zapojené do energetického metabolismu a sloučeniny metabolismu membránových fosfolipidů^{9–11}.

1.2. ^{31}P MR spektrum kosterních svalů v klidu a při fyzické zátěži

V naměřeném ^{31}P MR spektru kosterního svalu (viz obr. 1) jsou nejnápadněji identifikovatelné signály fosfokreatinu (PCr), adenosintrifosfátu (ATP) (3 multiplety – α , β , γ – od každého atomu fosforu v této molekule) a anorganického fosfátu (Pi), a to i při 1,5T. Kromě těchto signálů lze ve spektrech pozorovat širší signály odpovídající řadě sloučenin, např. fosfodiesterům (PDE – glycerolfosfocho-

lin, glycerolfosfoethanolamin aj.) a fosfomonoesterům (PME – fosfocholin, fosfoethanolamin, adenosin monofosfát, glukosa-6-fosfát aj.), viz tab. II. Tyto signály se překrývají a jejich identifikace se sice zlepšuje s přechodem k vyšším polím, ale je obtížná i při magnetickém poli 7T.

Klidové ^{31}P MR spektrum lýtkových svalů tak, jak je uvedeno na obr. 1, se při fyzické zátěži svalu výrazně mění a pro zpracování dat a jejich interpretaci je nezbytné zaznamenat časové změny chemických posunů a intenzit signálů, obvykle v průběhu několika minut cvičení, viz obr. 2. Tento způsob získání ^{31}P spekter se také nazývá dynamická nebo zátěžová ^{31}P MR spektroskopie. Celé vyšetření při cvičení je rozděleno do tří částí. V klidovém stavu jsou intenzity signálů konstantní a získané hodnoty koncentrací nebo intenzit signálů slouží jako počáteční hodnoty pro další výpočty. Při cvičení dochází k poklesu PCr a zvyšování intenzity signálu Pi. Po ukončení cvičení se signály vracejí do původního stavu. V tomto časovém úseku jsou také pozorovatelné změny v oblastech signálů PME a PDE, ale tyto změny se obvykle nesledují vzhledem k nízké intenzitě signálů. Časový průběh změn intenzit signálů se používá pro sledování metabolického stavu svalu pro experimentální nebo klinické účely.

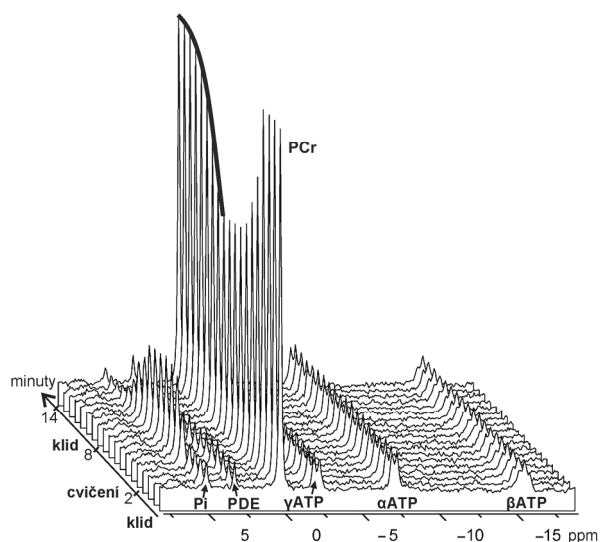


Obr. 1. a) Klidové ^{31}P MR spektrum z lýtkového svalu při 3T a 7T zdravého dobrovolníka. Spektra byla měřena duální $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ povrchovou cívkou (průměr 11 cm; 16 akvizic; repetiční čas 15 s; náběr signálu z volné precese); b) Příčný ^1H MR obraz lýtky. Signál ^{31}P je lokalizován povrchovou cívkou z objemu vrchlíku s poloměrem stejným jako má cívka

Tabulka II
Chemické posuny hlavních MR viditelných fosforových metabolitů^{11,29–31}

Fosforová sloučenina	δ
ATP- α	-7,52 (3400*; 47**)
ATP- β	-16,26 (3900*; 55**)
ATP- γ	-2,48 (5500*; 62**)
PCr	0,00 (6700*; 350**)
Pi	5,02 (6900*; 153**)
PDE	2,76 a 3,20 (8600*; 414**)
PME	5,88 a 6,78 (8100*)
ADP- α	-7,05
ADP- β	-3,09
AMP	6,33
Nikotinamidadenin dinukleotid (NADH)	-8,3
2,3-Difosfoglycerát	6,6 & 5,5
Glukosa-6-fosfát	7,20
Glukosa-1-fosfát	5,15
Glycerol-1-fosfát	7,02
Fruktosa-6-fosfát	6,64
Fosfoethanolamin	6,78
Fosfocholin	5,88
Glycero-3-fosfocholin	2,80
1,2-Dihexadekanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	2,18
Glycero-3-fosfoethanolamin	3,30
1,2-Dihexadekanoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin	2,80
Fosfoenolpyruvát	2,06

Chemické posuny jsou vztaženy k signálu fosfokreatinu; vodné roztoky, pH 7; (Relaxační časy nejdůležitějších metabolitů³² při 3T jsou uvedeny v závorkách: *T1 [ms]; **T2 [ms])

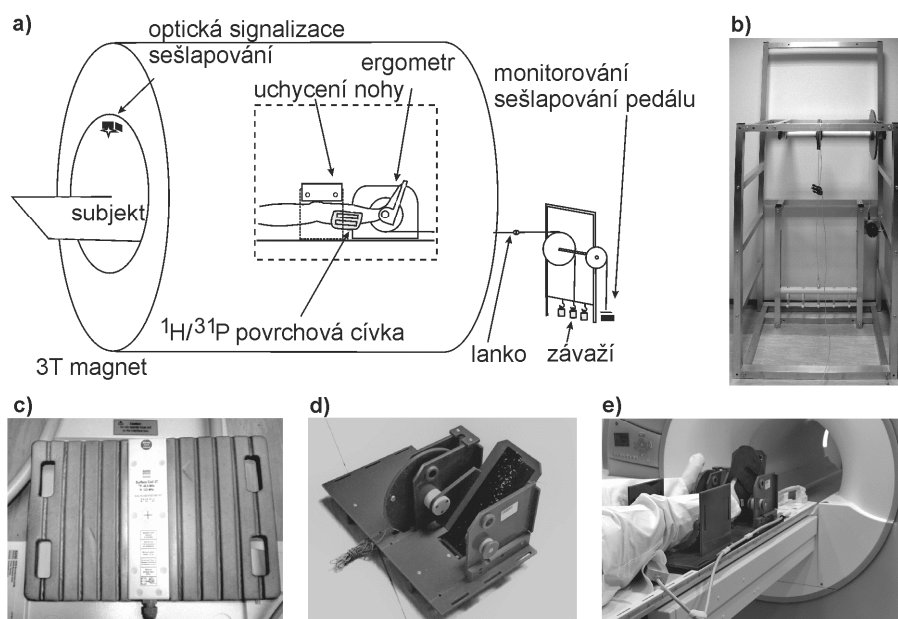


Obr. 2. Kumulovaný graf (stack plot) dynamické ³¹P MR spektroskopie (výběr 4 spekter před zahájením cvičení, 7 spekter během cvičení a 8 spekter z klidové periody po cvičení), náběr signálu z volné precese

1.3. Technika měření spekter *in vivo* dynamickou ³¹P MR spektroskopií

Technika měření *in vivo* ³¹P MR spekter na celotělových tomogramech se od technik vysoko rozlišující NMR spektroskopie liší především konstrukcí snímacích cívek a použitím ergometrů, které jsou nezbytné pro dosažení metabolických změn v měřené tkáni. Jak již bylo řečeno výše, receptivita ³¹P je značně menší než protonů, a proto se pro *in vivo* ³¹P MR spektroskopii využívají povrchové cívky, které mohou měřit signál z dostatečně velkého objemu a z minimální vzdálenosti od vyšetřované oblasti. Jejich nevýhodou je citlivost závislá na vzdálenosti tkáně od cívky (viz obr. 1) a tento fakt ztěžuje hlavně kvantitativní interpretaci^{8,12,13}.

Hlavním instrumentáři dynamické *in vivo* ³¹P MR spektroskopie je MR kompatibilní ergometr s ³¹P cívkou. Jeho hlavní odlišností od běžných sportovních nebo klinických ergometrů je jeho konstrukce z nemagnetických materiálů. Vzhledem k průměru tunelů celotělových MR tomografů (50–70 cm) musí být konstrukce ergometrů relativně subtilní, ale pevná a musí umožňovat pohyb vyšetřo-



Obr. 3. a) Schéma zapojení MR kompatibilního ergometru; b) konstrukce nosiče závaží a monitorování zátěže; c) duální $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ povrchová cívka (Rapid, Německo); d) pedálový systém ergometru; e) fotografie umístění zařízení a vyšetřovaného subjektu před magnetem tomografu, (vyšetření probíhá uvnitř magnetu)

vané končetiny. Konstrukce ergometru by měla umožňovat kvantitativní měření vykonané práce, regulaci zátěže a v neposlední řadě zaručovat komfort vyšetřovaného subjektu během vyšetření, které by nemělo přesáhnout 60 minut. MR kompatibilní ergometry jsou buď mechanické, nebo pneumatické. Jsou dostupné komerčně, ale řada pracovišť používá vlastní konstrukce¹⁴. V celotělových MR tomografech se nejčastěji provádí měření lýtkových a stehenních svalů. Celá řada studií však byla provedena i na horizontálních experimentálních tomografech s průměrem tunelu kolem 20 cm, a to zvláště při zátěži svalů předloktí (např. cvičení prsty rukou¹⁵).

Příkladem ergometru pro 3T MR tomograf je jeho konstrukce v IKEM uvedená na obr. 3.

1.4. Zpracování dynamických ^{31}P MR spekter

Zpracování spekter se provádí běžně dostupným softwarem a pro fosforovou MRS je typické používání poměrů intenzit signálu jednotlivých metabolitů a to jak na základě integrace jednotlivých oblastí ve spektru, tak výšek jednotlivých signálů. K tomu slouží jednak firemní software přímo na MR tomografech nebo off line software. V *in vivo* MR spektroskopii jsou nejoblíbenějšími programy jMRUI (cit.¹⁶), LCModel (cit.¹⁷) a další.

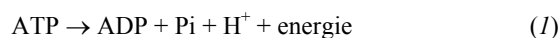
Měření absolutních koncentrací je obtížné vzhledem k používání povrchových cívek, kde hraje roli např. závislost sklápěcího úhlu radiofrekvenčního pulzu na vzdálenosti vyšetřovaného místa od cívky, vliv excitačního profilu cívky nebo nehomogenita vyšetřované oblasti. Doporučovány jsou techniky externího standardu nebo modelová-

ní excitačního profilu^{8,12,13}. Pro absolutní kvantifikaci lze také použít molární koncentraci ATP ve svalu známou z biochemických stanovení, tj. 8,2 mmol l^{-1} . Tato hodnota je ovšem jen orientační a lze ji použít jen u zdravých subjektů⁷.

2. Metabolické děje a ^{31}P MR spektroskopie v klidu a při fyzické zátěži

2.1. Základní rovnice pro zpracování dat dynamické ^{31}P MR spektroskopie

Při každé svalové práci dochází k hydrolyze ATP, která je popsána sumární rovnicí:

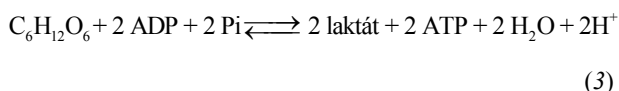


Ve svalu je relativně stálá zásoba ATP (8,2 mmol l^{-1}) a okamžitý úbytek ATP je kompenzován hydrolyzou fosfokreatinu v reakci katalyzované kreatinkasou (2). Ta však postačí pokrýt potřebu ATP jen po dobu 7 až 10 sekund.



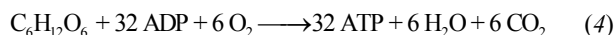
PCr tak udržuje stálou koncentraci ATP pro svalové kontrakce, než se rozběhnou další metabolické pochody poskytující ATP. Tento mechanismus je také aktivní v klidovém stavu, kdy je energie spotřebovávána především na udržení teploty svalu.

Syntéza ATP v kosterním svalu je zprostředkována dvěma mechanismy – anaerobní a aerobní glykolýzou. První mechanismus, který dlouhodobě hradí úbytek ATP, je anaerobní glykolýza. Je to několikastupňový proces, který lze sumarizovat jako tvorbu dvou molekul ATP z jedné molekuly glukosy, jak ukazuje sumární rovnice:



Výhodou anaerobní glykolýzy je její rychlost. Nevýhodou této metabolické dráhy je její nízká účinnost (získá pouze 2 molekuly ATP z 1 molekuly glukosy) a generování přebytku H^+ a s tím spojený následný pokles pH svalu, tedy acidóza.

Druhým hlavním mechanismem tvorby ATP je oxidativní fosforylace. Tato metabolická dráha funguje jak při zátěži, tak po jejím skončení, nepůsobuje pokles pH svalu a je dána mitochondriálním dýcháním. Probíhá ve dvou stupních – oxidativní glykolýzou a Krebsovým cyklem. Sumární rovnice ukazuje, že tímto způsobem lze z jedné molekuly glukosy získat o řád více molekul ATP než v anaerobní glykolýze.



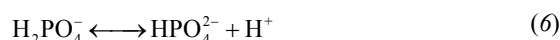
Rovnice (1)–(4) sumarizují základní biochemické děje spojené se svalovou činností. Detailně se jednotlivé reakční stupně popisují metabolickými toky (metabolic fluxes). V energetickém metabolismu svalu to jsou nejčastěji metabolické toky popisující vznik ATP z PCr ($\text{ATP}_{\text{flux_PCr}}$), z anaerobní glykolýzy ($\text{ATP}_{\text{flux_gl}}$) a z oxidativní fosforylace ($\text{ATP}_{\text{flux_ox}}$). Podobně jsou parametrem $\text{H}_{\text{ef_flux}}$ popisovány metabolické toky volných H^+ směrem z cytosolu svalových buněk.

2.2. Informace ze spekter získaných dynamickou ^{31}P MR spektroskopií

Obr. 4 představuje průběh změn intenzit signálů PCr a Pi experimentálně získaných přímo ze spekter dynamické MR spektroskopie. Tyto intenzity signálů jsou úměrné koncentracím metabolitů v měřené tkáni. Kromě těchto změn intenzit signálů sloučenin PCr, Pi vystupujících v rovnicích (1)–(5), lze použít pro výpočet pH a koncentrace volného hořčíku změny chemických posunů v průběhu fyzické zátěže. Výpočet intracelulárního pH ve svalu lze provést podle modifikované Hendersonovy-Hasselbachovy rovnice^{1,4}:

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{p}} + \log \left[\frac{(\delta_{\text{Pi}} - \delta_{\text{HP}})}{(\delta_{\text{p}} - \delta_{\text{Pi}})} \right] = 6,77 + \log \left[\frac{(\delta_{\text{Pi}} - -3,23)}{(5,7 - \delta_{\text{Pi}})} \right] \quad (5)$$

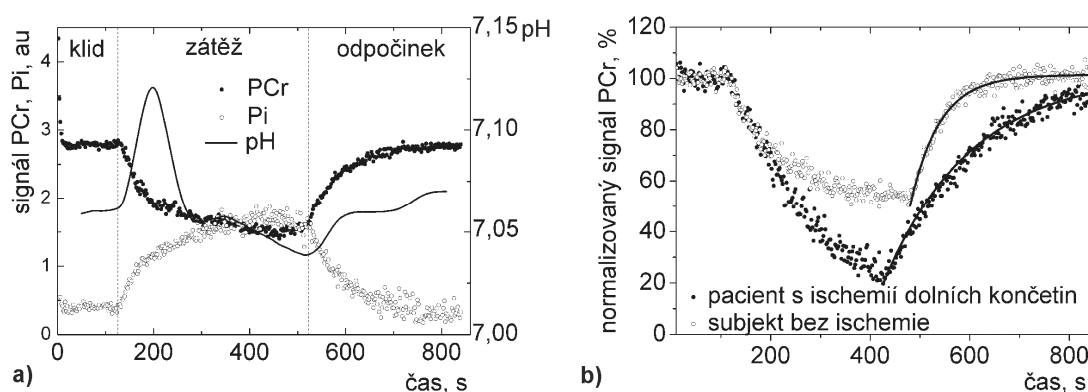
kde K_{p} je disociační konstanta pro rovnováhu:



δ_{Pi} je rozdíl chemických posunů Pi a PCr (PCr slouží jako interní standard s chemickým posunem = 0 ppm), δ_{HP} a δ_{p} jsou limitní posuny protonizovaného a volného Pi.

Podobně lze využít i chemické posuny signálů αATP a βATP pro výpočet koncentrace hořčíku ve svalové tkáni pro zpřesnění popisu reakcí katalyzovaných kreatinkinasou a adenylátkinasou^{9,15,18}.

Experimentálně zjištěný průběh změn koncentrací metabolitů a pH na obr. 4 popisuje tři metabolické pochody, popsané sumárními rovnicemi (1)–(4). V klidovém stavu se koncentrace Pi, PCr a pH nemění. Po začátku cvičení klesá intenzita signálu PCr a roste signál Pi podle rovnice (2). Současně po krátkou dobu roste pH, protože H^+ ionty jsou spotřebovávány v reakci katalyzované kreatinkinasou. Po několika sekundách se začne uplatňovat anaerobní glykolýza, která produkuje H^+ a pH mírně klesá až do ukončení cvičení jako důsledek vzájemného působení



Obr. 4 a) Časový průběh změn intenzit signálů PCr, Pi a pH před, při a po cvičení u typického netrévaného zdravého dobrovolníka – popis viz text; b) průběh změn PCr u pacienta se závažnou ischemií dolní končetiny a dobře kompenzovaného pacienta po Tx jater. U ischemie jsou kvantitativní ukazatele signifikantně odlišné od hodnot kompenzovaného pacienta nebo kontrolních hodnot $Q_{\text{max_ADP}} [\text{mmol s}^{-1}]$: $0,24 < 0,66 \approx 0,57 \pm 0,24$; $\tau_{\text{PCr}} [\text{s}]$: $197 > 57 \approx 44 \pm 19$; (vyšetření pacientů a dobrovolníků bylo provedeno v souladu se schválením etickou komisí IKEM a TN)

ni anaerobní a aerobní glykolýzy. Po ukončení cvičení se uplatňuje pouze aerobní glykolýza, pH stoupá společně s poklesem Pi a růstem PCr podle reverzní rovnice (2). Zhruba po šesti minutách klidu jsou hodnoty Pi, PCr a pH na původních hodnotách. Změny intenzit β ATP demonstrovány grafem na obr. 2 stejně jako intenzity PDE kolísají a nelze je použít pro kvantitativní hodnocení dat vzhledem k velké experimentální chybě.

Pro kvantitativní popis dynamického ^{31}P MR experimentu, který umožňuje porovnání různých subjektů nebo experimentů, se používá několik parametrů. Jak již bylo výše zmíněno, při vyšetřování kosterního svalu při zátěži je nejvýhodnější sledování změn ^{31}P signálů po fyzické zátěži. Po cvičení probíhá doplňování koncentrace ATP aerobní metabolickou dráhou. Příspěvek anaerobního metabolismu se považuje za zanedbatelný⁶. Současně se reverzní kinasovou reakcí vrací intenzita signálu PCr do klidových hodnot a matematickou analýzou průběhu návratu se získají informace o mitochondriální syntéze ATP. Návrat intenzit signálu PCr do rovnovážného stavu je popsán exponenciální rovnicí:

$$[\text{PCr}](t) = [\text{PCr}]_{e_ex} + \Delta[\text{PCr}](1 - e^{-t/\tau_{\text{PCr}}}) \quad (7)$$

kde $[\text{PCr}]_{e_ex}$ je koncentrace PCr na konci cvičení (obvykle je to koncentrace měřená během posledních 30 s cvičení), $\Delta[\text{PCr}]$ je rozdíl koncentrací v klidu a na konci cvičení $[\text{PCr}]_{e_ex}$. τ_{PCr} je časová konstanta charakterizující rychlost návratu (relaxaci) PCr do klidového stavu, která se získá fitováním experimentálních hodnot.

Počáteční rychlost resyntézy PCr – V_{iPCr} , která charakterizuje oxidativní fosforylační tok¹⁹ $\text{ATP}_{\text{flux_PCr}}$ (vyjma bazálního příspěvku), je popsána vztahem:

$$V_{\text{iPCr}} \approx \text{ATP}_{\text{flux_PCr}} = [\text{PCr}] / \tau_{\text{PCr}} \quad (8)$$

Nejdůležitější kvantitativní veličinou popisující metabolický stav svalu je mitochondriální kapacita svalu²⁰ – Q_{max} (9). Je to maximální rychlost oxidativní syntézy ATP v mitochondriích, kterou jsou schopny mitochondrie dosáhnout. Tento parametr je závislý jen na počtu mitochondrií a jejich oxidativních schopnostech a je nezávislý na velikosti svalu.

V prvním způsobu výpočtu Q_{max} se vychází z lineárního modelu stanovení maximální rychlosti oxidativní syntézy ATP, který předpokládá lineární vztah mezi V_{iPCr} a velikostí poklesu PCr. Při extrapolaci na 100% pokles PCr by V_{iPCr} mělo odpovídat mitochondriální kapacitě (Q_{max_1}):

$$Q_{\text{max}_1} = [\text{PCr}]_{\text{klid}} / \tau_{\text{PCr}} \quad (9)$$

Tento model má však řadu omezení^{6,21} a jeho význam je pouze orientační.

Nejčastěji se získává mitochondriální kapacita z rychlosti resyntézy PCr pomocí rovnice Michaelise-Mentenové pro enzymatickou reakci:

$$Q_{\text{max_ADP}} = V_{\text{iPCr}}(1 + K_m/[ADP]_{e_ex}) = \text{ATP}_{\text{flux_PCr}}(1 + K_m/[ADP]_{e_ex}) \quad (10)$$

kde $K_m = 30 \mu\text{M}$ je konstanta Michaelise-Mentenové pro kreatin kinasovou reakci. Hodnoty koncentrace ADP na konci cvičení $[ADP]_{e_ex}$ se získají výpočtem z rovnice:

$$[ADP]_{e_ex} = [\text{Cr}][\text{ATP}]/[\text{PCr}][\text{H}^+] K_{\text{CK}} \quad (11)$$

kde rovnovážná konstanta kreatin kinasové reakce K_{CK} je přibližně rovna $\approx 1,66 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Při výpočtu ADP se vychází z předpokladu^{7,13}, že celková koncentrace kreatinu $[\text{Cr}]$ v klidu je přibližně 42 mM nebo že klidový podíl PCr k celkovému obsahu kreatinu je 85 % při konstantní koncentraci ATP 8,2 mM.

Mitochondriální kapacita a další parametry popsané rovnicemi (7) – (11) se nejčastěji používají pro charakterizaci metabolismu kosterního svalu v klinických aplikacích. Nicméně i pro tento nejjednodušší hyperbolický model reakce Michaelise-Mentenové platí řada omezení – např. rychlostní konstanta resyntézy ATP se může měnit v průběhu zátěže a konstanta K_m se liší pro různé typy buněk.

Pro mitochondriální syntézu ATP, která vykazuje sigmoidní kinetiku, byl navržen model vycházející z Hillovy rovnice, který upravuje rovnici (11) konstantou n (Hillova konstanta)^{6,19}. Tato obecnější forma rovnice zahrnuje i příspěvek bazální mitochondriální kapacity Q_b , tj. příspěvek oxidativního metabolismu svalu v klidu:

$$Q_{\text{max}_n} = (\text{ATP}_{\text{flux_PCr}} + Q_b) \{1 + (K_m/[ADP]_{e_ex})^n\} \quad (12)$$

Hodnota $\text{ATP}_{\text{flux_PCr}}$ se získá ze vztahu (11).

Odlíšný přístup k výpočtu Q_{max} nabízí model založený na termodynamickém popisu mitochondriálních funkcí blízko rovnováhy (non equilibrium thermodynamics – NET). Model vychází ze vztahu pro volnou energii oxidativní syntézy ATP:

$$\Delta G_{\text{ATP}} = \Delta G^0_{\text{ATP}} + RT \ln ([ADP][\text{Pi}]/[\text{ATP}]) \quad (13)$$

Pro výpočet Q_{max} byl navržen vztah ve tvaru:

$$Q_{\text{max}_G} = (\text{ATP}_{\text{flux_PCr}} + Q_b) \{A \cdot \exp[\Delta G_{\text{ATP}} - C/(RT)] - 1\} / \{A \cdot \exp[\Delta G_{\text{ATP}} - C/(RT)] + B\} A \quad (14)$$

kde A je konstanta = 1 pro nejjednodušší přeměnu substrátu na produkt, B je konstanta vztahující se k termodynamické reverzibilitě a C je volná energie ATP při nulové V_{iPCr} .

Hodnoty parametrů získané z rovnic (5) – (14) tvoří soubor základních hodnot pro studium metabolismu svalu pomocí ^{31}P MR spektroskopie. Je nutné poznamenat, že absolutní hodnoty mitochondriálních kapacit Q_{max_G} , Q_{max_n} , $Q_{\text{max_ADP}}$, Q_{max_1} vypočtené podle vztahů (9) – (14) nejsou porovnatelné. Pro kvantitativní výpočty se používá řada konstant, které byly a jsou získávány různými způsoby. Tab. III sumarizuje hodnoty konstant používané pro výpočet parametrů energetického metabolismu svalů.

Jak již bylo uvedeno výše, vztahy (5) – (14) jsou platné pro čisté nebo převažující aerobní syntézu ATP po ukončení zátěže a návratu svalu do klidového stavu.

Pokud se provádí detailní analýza dat získaných po začátku cvičení, je nezbytné uvažovat o příspěvku tvorby ATP anaerobním mechanismem a do tohoto experimentálního modelu zahrnout vliv změny koncentrace H^+ (změny pH). Jak ukazuje obr. 4, závislost pH v průběhu cvičení je dost složitá, protože při kreatin kinasové reakci se H^+ ionty spotřebovávají a anaerobní glykolýza naopak H^+ produkuje. Množství H^+ závisí na účinnosti oxidativní fosforylace

Tabulka III

Parametry používané pro řešení rovnic (10) – (14)

Veličina		Hodnota	Jednotka	Lit.
K_m	Konstanta Michaelise-Mentenové	30	μM	4
n	Hillova konstanta	~ 2	–	19
Q_b	Bazální mitochondriální kapacita	1,5–2,4	mM min^{-1}	7
ΔG^0_{ATP}	Volná energie ATP	–32	kJ M^{-1}	15
K_{CK}	Rovnovážná konstanta kreatin kinasové reakce	$1,66 \cdot 10^9$	M^{-1}	33
[Cr]+[PCr]	Celková koncentrace kreatinu	42	mM	13
[ATP]	Klidová koncentrace ATP	8,2	mM	13
[PCr]/([Cr]+[PCr])	Klidový poměr fosfokreatinu vůči celkové koncentraci kreatinu	0,85	–	15

a celkové změny popisuje parametr $H_{\text{ef_flux}}$. Kromě toho množství volných H^+ reguluje pufrací schopnost buněk popisovaná parametrem H_{pufer} . Obě tyto veličiny jsou funkcí koncentrace PCr a pH a dají se dopočítat^{5,6,22}.

Rychlost syntézy ATP anaerobní glykolýzou $\text{ATP}_{\text{flux_gl}}$ za předpokladu, že při anaerobní glykolýze připadá na jeden mol ATP 2/3 molu H^+ a kreatinová a oxidativní fosforylace produkují g a m molů H^+ lze vypočítat následující rovnicí. Parametry g a m jsou závislé na pH.

$$\text{ATP}_{\text{flux_gl}} = 3/2 (H_{\text{ef_flux}} + H_{\text{pufer}} - g\text{ATP}_{\text{flux_PCr}} - m\text{ATP}_{\text{flux_Ox}}) \quad (15)$$

3. Aplikace *in vivo* ^{31}P MR spektroskopie

Dynamická ^{31}P MR spektroskopie společně s měřením klidových hodnot koncentrací fosforových metabolitů nachází zajímavé uplatnění v biomedicině. Díky rozsáhlému teoretickému zázemí, které je k dispozici od 90. let minulého století, lze na různých modelech sledovat energetický metabolismus kosterního svalu. Práce založené na ^{31}P MR spektroskopii významně přispěly k popisu metabolických drah. K tomu pomohly i klinické studie svalů různých pacientů prováděné od druhé poloviny 80. let minulého století a to hlavně u méně častých svalových onemocnění jako např. Mc Ardleho onemocnění, Duchennova a Beckerova dystrofie a další^{23–25}. Je nutné poznamenat, že řada nálezů je nespecifická, a proto je pro klinické účely výhodné kombinovat výsledky ^{31}P MR spektroskopie s ostatními klinickými metodami a výsledky získanými u kontrolních skupin.

V posledních několika letech se obnovil zájem o použití dynamické ^{31}P MR spektroskopie hlavně v souvislosti se studiem metabolického syndromu^{26–28}, a to především diabetu a obezity a při sledování výsledků léčby ischemických onemocnění, kdy běžné klinické přístupy neposkytují dostatečné výsledky. Z porovnání průběhu a velikosti změn Q_{max} , τ_{PCr} a dalších parametrů u pacientů a z jejich porovnání s kontrolními hodnotami lze upřesňovat diagnostiku tak, jako je uvedeno na příkladu v obr. 4b.

4. Závěr

Dynamická *in vivo* ^{31}P MR spektroskopie je unikátní vyšetřovací metoda kosterního svalstva, která umožňuje *in vivo* kvantifikovat metabolické pochody fosforových metabolitů. Pro svoji neinvazivnost se hodí zvláště pro biomedicinské a klinické studie a poskytuje řadu informací nezbytných pro pochopení biochemických pochodů v živých tkáních.

Studie byla podpořena MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“) a GA UK (projekt č. 315), Česká republika.

LITERATURA

1. Moon R. B., Richards J. H.: *J. Biol. Chem.* 248, 7276 (1973).
2. Houtl D. I., Busby S. J., Gadian D. G., Radda G. K., Richards R. E., Seeley P. J.: *Nature* 252, 285 (1974).
3. Kemp G. J., Taylor D. J., Radda G. K.: *NMR Biomed.* 6, 66 (1993).
4. Kemp G. J., Radda G. K.: *Magn. Reson. Q.* 10, 43 (1994).
5. Kemp G. J.: *Mitochondrion* 4, 629 (2004).
6. Kemp G. J., Ahmad R. E., Nicolay K., Prompers J. J.: *Acta Physiol.* 213, 107 (2015).
7. Valkovic L., Chmelik M., Krssak M.: *Anal Biochem.* 529, 193 (2017).
8. Meyerspeer M., Robinson S., Nabuurs C. I., Scheenen T., Schoisengeier A., Unger E., Kemp G. J., Moser E.: *Magn. Reson. Med.* 68, 1713 (2012).
9. Argov Z., Löfberg M., Arnold D. L.: *Muscle Nerve* 23, 1316 (2000).
10. Solga S. F., Horska A., Clark J. M., Diehl A. M.: *Liver Int.* 25, 490 (2005).
11. van der Kemp W. J., Stehouwer B. L., Runge J. H., Wijnen J. P., Nederveen A. J., Luijten P. R., Klomp

- D. W.: *Front. Oncol.* 6, 29 (2016).
12. Tosner Z., Dezortova M., Tintera J., Hajek M.: *MAGMA* 13, 40 (2001).
 13. Kemp G. J., Meyerspeer M., Moser E.: *NMR Biomed.* 20, 555 (2007).
 14. Sedivy P., Kipfelsberger M. C., Dezortova M., Krssak M., Drobny M., Chmelik M., Rydlo J., Trattnig S., Hajek M., Valkovic L.: *Med. Phys.* 42, 1678 (2015).
 15. Kemp G. J., Roussel M., Bendahan D., Le Fur Y., Cozzone P. J.: *J. Physiol. (London)* 535, 901 (2001).
 16. jMRUI. Software for the clinical and biomedical MRS. <http://www.jmru.eu/>, staženo 10.5.2017.
 17. LCMoDel. <http://s-provencher.com/lcmoDel.shtml>, staženo 10.5.2017.
 18. Hajek M., Palyzova D., Korinek M., Kurkova D.: *Physiol. Res.* 51, 159 (2002).
 19. Jeneson J. A., Schmitz J. P., van den Broek N. M., van Riel N. A., Hilbers P. A., Nicolay K., Prompers J. J.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E774 (2009).
 20. Kemp G. J.: *J. Theor. Biol.* 170, 239 (1994).
 21. Kemp G. J., Brindle K. M.: *Diabetes* 61, 1927 (2012).
 22. Kemp G. J., Taylor D. J., Styles P., Radda G. K.: *NMR Biomed.* 6, 73 (1993).
 23. Lodi R., Kemp G. J., Muntoni F., Thompson C. H., Rae C., Taylor J., Styles P., Taylor D. J.: *Brain* 122, 121 (1999).
 24. Kemp G. J., Taylor D. J., Dunn J. F., Frostick S. P., Radda G. K.: *J. Neurol. Sci.* 116, 201 (1993).
 25. Newman R. J., Bore P. J., Chan L., Gadian D. G., Styles P., Taylor D., Radda G. K.: *Br. Med. J.* 284, 1072 (1982).
 26. Scheuermann-Freestone M., Madsen P. L., Manners D., Blamire A. M., Buckingham R. E., Styles P., Radda G. K., Neubauer S., Clarke K.: *Circulation* 107, 3040 (2003).
 27. Petersen K. F., Dufour S., Shulman G. I.: *PLoS Med.* 2, e233 (2005).
 28. Wu F. Y., Tu H. J., Qin B., Chen T., Xu H. F., Qi J., Wang D. H.: *Chin. Med. J. (Engl.)*, 125, 281 (2012).
 29. de Graaf R. A.: *In Vivo NMR Spectroscopy. Principles and Technique*, 2. vyd. J. Wiley, Chichester 1998.
 30. Merchant T. E., Glonek T.: *J. Lipid Res.* 31, 479 (1990).
 31. Hájek M., Horská A., Belán A., Táborský P., Grosmanová A.: *Prakt. Lék.* 70, 538 (1990).
 32. Rodgers C. T., Clarke W. T., Snyder C., Vaughan J. T., Neubauer S., Robson M. D.: *Magn. Reson. Med.* 72, 304 (2014).
 33. Harkema S. J., Meyer R. A.: *Am. J. Physiol.* 272, C491 (1997).

M. Hájek, P. Šedivý, J. Kovář, and M. Dezortová
(MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague): Dynamic in vivo ³¹P Magnetic Resonance Spectroscopy in Humans

The constructions of super high (3T) and ultra high field (7T) magnetic resonance (MR) imagers in the past decade have enabled many MR imaging and spectroscopy experiments with other nuclei than protons. The paper summarizes the basis of *in vivo* dynamic ³¹P MR spectroscopy for biomedical and clinical applications. The calculations of quantitative parameters of muscular metabolism, such as pH, mitochondrial capacity, ADP concentration, time constant of phosphocreatine recovery and others, are shown. The construction of ergometers for the whole body magnetic resonance systems is described. Examples of typical data processing and evaluation are demonstrated.



Dr. Milan Hájek
MR Spectroscopy, MR Unit
Department of Diagnostic and Interventional Cardiology
Institute for Clinical and Experimental Medicine
Víteňská 1958/9
140 00 Praha 4

Ref. číslo rukopisu: **933745**

Název článku: **Differences in muscle metabolism in patients with type I diabetes – influence of gender and nephropathy studied by ³¹P MR spectroscopy**

Autoři: **Sedivy P. et al.**

Praha, 16. 1. 2018

Vážený pane doktore,

Váš článek bude publikován pravděpodobně v čísle 3/2018, svazku 67 Physiological Research.

S
pozdravem

MUDr. Josef Zicha, DrSc.

vedoucí redaktor

**PHYSIOLOGICAL
RESEARCH**

**FYZIOLOGICKÝ
ÚSTAV AV ČR**

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Víteňská 1083

142 20 Praha 4

Fax: +420 241 062 164

physres@fgu.cas.cz

www.biomed.cas.cz/physiolres

Differences in muscle metabolism in patients with type I diabetes – influence of gender and nephropathy studied by ³¹P MR spectroscopy

Petr Sedivy^{1,2}, Monika Dezortova¹, Miloslav Drobny¹, Zuzana Vlasakova³, Vit Herynek¹,
Milan Hajek¹

¹)MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²) 1st Medical Faculty of Charles University, Prague, Czech Republic

³)Center of Diabetology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Corresponding Author:

Ing. Milan Hájek, DrSc.

MR-Unit

Department of Diagnostic and Interventional Radiology

Institute for Clinical and Experimental Medicine

Videnská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic

e-mail: miha@medicon.cz

Phone: +420-236055245

Short title: Dynamic 31P MR spectroscopy in DM1 patients

Summary

Introduction

Type I diabetes mellitus (DM1) is a complex disease with adverse effects on organs and tissues despite compensation by insulin treatment. The goal of our study was to study how kidney diseases change ^{31}P MR parameters of muscle metabolism in DM1 patients with respect to gender.

Materials and Methods

51 DM1 patients (19m/14f without and 13m/5f with nephropathy) and 26 (14m/12f) healthy volunteers were successfully examined using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy at 3T tomograph at rest, and during and after a calf muscle exercise. The exercise consisted of a six-minute plantar flexion using a pedal ergometer followed by a six-minute recovery.

Results

It is reflected by reduced relative β -ATP and increased Pi and phosphodiester signals to phosphocreatine (PCr) at rest and prolongation of the PCr recovery time after the exercise.

Measurement on healthy volunteers indicated differences between males and females in pH at the rest and after the exercise only. These differences between patients groups were not significant.

Conclusions

We have proven that nephropathy affects the metabolism in diabetic patients and our results confirm significant difference between patients with and without nephropathy. Gender differences in pH were observed only between male and female healthy volunteers.

Keywords

Magnetic Resonance Spectroscopy, Diabetes Mellitus Type 1, Energy Metabolism

Introduction

Phosphorous magnetic resonance spectroscopy (^{31}P MRS) is a noninvasive method allowing for in vivo investigation of energy metabolism in muscles based on detecting ^{31}P signals originated from phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (Pi), adenosine triphosphate (ATP), phosphodiester (PDE), phosphomonoesters (PME) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Valkovič et al. 2017, Argov et al. 2000). In addition, intramyocellular pH can be determined from chemical shift differences between PCr and Pi (Moon and Richards 1973). During dynamic ^{31}P MRS, physical exercise and measurement of ^{31}P MR spectra from muscle are combined (Sedivy et al. 2015, Kemp et al. 2015, Kemp and Radda 1994).

During a physical exercise, the muscle uses energy from ATP which is immediately resynthesized from PCr through creatine-kinase reaction. PCr drop is stopped by two mechanisms that produce ATP during exercise. The first mechanism is anaerobic glycolysis that provides ATP during the exercise activity. It generates protons and causes a decrease in muscle pH (Kemp et al. 2001, Robergs et al. 2004). The second process is oxidative phosphorylation which continues after the exercise. During exercise and recovery period changes of PCr, Pi and pH are monitored and other important parameters as mitochondrial capacity could be calculated (Q_{\max}) (Kemp and Radda 1994). Mitochondrial capacity expresses the maximal possible extent of mitochondrial aerobic metabolism. A high mitochondrial capacity calculated from ^{31}P MRS is associated with a good function of mitochondria and correlates well with oxidative capacity of mitochondria isolated from muscle biopsies (Lanza et al. 2011).

Patients with type I diabetes mellitus (DM1) suffer from the lack of insulin due to the autoimmune destruction of the insulin-producing beta cells in the pancreas. Insulin regulates the uptake of glucose into muscle cells via the GLUT-4 transporter. Insulin also promotes

glycogen, lipid and protein synthesis in muscle cells, while suppressing lipolysis and gluconeogenesis from muscle amino acids; therefore, it is closely related to energy metabolism (Wilcox 2005).

Even in the case of insulin substitution therapy, glycemia in DM1 patients often oscillates between hyper- and hypoglycemic levels. Poorly managed DM1 may lead eventually to cardiovascular diseases, diabetic neuropathy, retinopathy, nephropathy or a diabetic foot syndrome (Brownlee 2001). A number of DM1 patients also exhibit insulin resistance (Bergman *et al.* 2012, Cree-Green *et al.* 2015) and higher deposition of intramyocellular lipids (IMCL) (Perseghin *et al.* 2003) similarly as in DM2 patients owing to impaired mitochondrial metabolism (Szendroedi *et al.* 2008, Petersen *et al.* 2004).

Changes in mitochondrial metabolism in DM1 were proven by *in vitro* studies, which revealed changes in mitochondrial gene expression (Antonetti *et al.* 1995, Karakelides *et al.* 2007) with a reduction in ATP production. The change of mitochondrial function in diabetes mellitus is explained by glucose toxicity (Rossetti *et al.* 1995, Rabol *et al.* 2009), lipotoxicity (Perseghin *et al.* 2003), the effect of chronic hyperinsulinemia (Karakelides *et al.* 2007) or by reduced nutrient delivery due to limited insulin action and glucose transport (Yki-Jarvinen *et al.* 1990) or as a result of a reduced muscle blood flow and oxygen supply attributable to microangiopathy (Cree-Green *et al.* 2015).

Only a few dynamic *in vivo* studies were performed on type I diabetes mellitus (Cree-Green *et al.* 2015, Crowther *et al.* 2003, Item *et al.* 2011). A significantly decreased mitochondrial capacity was found in DM1 patients (males only) compared to controls (Crowther *et al.* 2003). Mean mitochondrial capacity in female patients did not change in comparison with female controls (Item *et al.* 2011) but a negative correlation between the value of glycosylated hemoglobin and the individual mitochondrial capacity was noted. Although specific differences were described separately for males and females (Crowther *et al.* 2003, Item *et al.*

2011), these studies did not compare males and females directly and provided somewhat contradictory results.

One of the most serious complications of diabetes mellitus is nephropathy. It is characterized as insufficient kidney function; it means that concentrations of several ions, creatine, urea, etc. are increasing in blood. Also metabolism of amino acids is negatively affected and patients suffer from the erythropoietin and vitamin D deficiency. In this condition the skeletal muscles are atrophied (Fahal 2014) and energy metabolism is impaired (Táborský et al. 1993, Kemp et al. 1995). Nephropathy patients have bigger drop of PCr and pH during exercise (Kemp et al. 1995) and lower PCr/Pi ratio at rest (Táborský et al. 1993).

The aim of our study was to answer the following two questions:

- 1) Can we see gender specific differences in the rest and dynamic ^{31}P parameters in our DM1 patients and controls?
- 2) How nephropathy in DM1 patients changes the rest and dynamic ^{31}P parameters?

Methods

Subjects

Overall 59 diabetic patients (38m/21f) were recruited for the study from our Department of diabetology according to their clinical examinations and laboratory results. In addition 12 healthy females (Cf) and 14 healthy males (Cm) participated in the study as control groups. Based on questionnaire none of them was an active sportsman and all had predominantly sedentary jobs.

The subjects were divided into subgroups according the gender (male - m; female - f) and clinical diagnosis (controls - C; patients without nephropathy - DM1; patients with nephropathy - DM1N), see Table 1. Subjects with a low workload during the exercise (drop of PCr lower than 15 %) were excluded (6m/2f patients) from the study. Diabetic patients were

treated by insulin substitution therapy; patients with nephropathy suffered from kidney failure and were on a waiting list for kidney transplantation. The age, BMI, glycosylated hemoglobin (HbA1c) and creatinine from blood samples (results from clinical reports) of all subgroups are listed in Table 1.

In addition, ten healthy volunteers were examined to assess the quality measurement of the ^{31}P MR spectroscopy of the calf muscle at rest: five of them were examined three times in independent sessions and five volunteers once with three measurements. Long-term reproducibility of the dynamic protocol for the assessment of mitochondrial capacity was tested on two healthy subjects (25 and 65 years old): 3 and 5 dynamic ^{31}P MRS examinations were performed in three and five subsequent weeks in the same time of the day.

All subjects were informed about the examination protocol and they signed their consent with the study. The study was approved by the local ethics committee. All subjects also filled out a questionnaire about their physical condition, sport activities and living habits.

MR examination

MR examinations were performed using a whole-body 3T MR system TRIO (Siemens, Erlangen, Germany) with a dual-channel $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ surface coil (Rapid Biomedical, Rimpar, Germany). All subjects were examined in a supine position with the coil fixed under the musculus gastrocnemius. The positioning of the muscle over the coil was verified using a localizer sequence. ^{31}P MR spectra at rest were acquired by a non-localized acquisition sequence FID with the following parameters: acquisition delay $\text{TE}^* = 0.4$ ms, $\text{TR} = 15$ s, number of acquisitions $\text{NA} = 16$, vector size of 1024. Magnetic field homogeneity was optimized by the localized shimming of the water signal.

Dynamic ^{31}P MR spectra were obtained by the FID sequence with the following parameters: $\text{TE}^* = 0.4$ ms, $\text{TR} = 2$ s, $\text{NA} = 1$, vector size of 1024; number of measurements = 420. Our

standard exercise examination protocol was divided into three parts: a two-minute rest period, a six-minute exercise period and a six-minute recovery period. The exercise was performed with a home-built ergometer by the plantar flexion twice per repetition time (2 s) with a power below 60% of maximal power that had been measured by dynamometer, for more details see (Sedivy *et al.* 2015). Acoustic synchronization was used to navigate the subjects during the exercise period of the experiment.

Spectra evaluation

Spectra were analyzed by the AMARES time domain fitting routine (drawing upon prior knowledge) (Vanhamme *et al.* 1997) in the jMRUI 5.0 software package. Lorentzian line shapes were used for the fitting of singlets of PCr, Pi, PDE (glycerol-3-phosphorylcholine and glycerol-3-phosphorylethanolamine), PME (phosphorylcholine and phosphorylethanolamine) and NADH signals. The ATP peaks were fitted as two doublets (α -ATP, and γ -ATP) and a triplet (β -ATP). Integral intensities were related to total integral of the whole spectra.

The relative chemical shift of Pi and PCr (δ in ppm) was used to calculate the intracellular pH according to the Henderson-Hasselbalch equation (Moon and Richards 1973):

$$\text{pH} = 6.75 + \log [(\delta\text{P}_i - 3.27)/(5.63 - \delta\text{P}_i)] \quad (1)$$

The PCr changes during the recovery period were fitted by a mono-exponential function to evaluate the PCr recovery rate:

$$[\text{PCr}](t) = [\text{PCr}]_{\text{e_ex}} + \Delta[\text{PCr}](1 - e^{-t/\tau_{\text{PCr}}}) \quad (2)$$

where t is time, $[\text{PCr}]_{\text{e_ex}}$ is the PCr amount at the end of the exercise, $\Delta[\text{PCr}]$ is the difference in the PCr amount at rest and at the end of the exercise, and τ_{PCr} is the time constant of the PCr recovery rate.

The initial PCr recovery rate (V_{iPCr}) roughly representing the ATP turnover at the end of the exercise was calculated as follows:

$$V_{iPCr} = [PCr]/\tau_{PCr} \quad (3)$$

Mitochondrial capacity Q_{max} was calculated according to the model of Michaelis & Menten, taking into account adenosine diphosphate at the end of the exercise activity ($[ADP]_{e_ex}$, V_{iPCr} , and the Michaelis-Menten constant (K_m), which was assumed to be 30 μ M (Kemp 1994):

$$Q_{max_ADP} = V_{iPCr} (1 + K_m/[ADP]_{e_ex}) \quad (4)$$

where $[ADP]_{e_ex}$ was calculated according to the method described by Kemp (Kemp *et al.* 1993), assuming constant total creatine concentration throughout all measurements and 15% of total creatine not being phosphorylated in the resting state (Boska 1994)

$$[ADP]_{e_ex} = [Cr][ATP]/[PCr][H^+] K_{CK} \quad (5)$$

where $[H^+]$ is the concentration of proton ions and K_{CK} is the equilibrium constant.

Absolute concentrations of PCr necessary for evaluation were calculated from PCr/ β -ATP ratios assuming constant ATP concentration of 8.2 mM in the muscle tissue (Kemp *et al.* 2007, Taylor *et al.* 1986).

Statistical evaluation

For the comparison of individual parameters of the patient and control groups, statistics was done using the Prism6 software. According to the Shapiro-Wilk normality tests, parametric or non-parametric multiple comparison (ANOVA Sidak's multiple comparisons and/or Kruskal-Wallis) was undertaken (the probability level of $p < 0.05$ was considered as statistically significant). As some data did not follow normal distribution, Spearman's correlation analysis was conducted (the probability level of $p < 0.005$ was considered as statistically significant).

Results

An initial test on healthy volunteers revealed that the reproducibility of metabolic ratios measurements at rest are: β -ATP/ P_{tot} - 3%, P_i/P_{tot} - 6%, PDE/P_{tot} - 8%, PCr/ P_i - 8%, pH - 0.2%. The reproducibility of Q_{max} and τ_{PCr} was found 10%, and 25%, resp.

Groups of patients and controls did not significantly differ in terms of the mean age and BMI independently of gender (see Table 1). As expected, the creatinine was significantly higher in patient groups with nephropathy from the others. Similarly, significantly higher values of HbA1c were found in DM1 and DM1N groups compared to healthy controls.

The results of ^{31}P MR spectroscopy at rest and exercise are summarized in Tables 2 and 3. Signal intensities of PCr, P_i , β -ATP, and PDE related to the total spectrum integral (P_{tot}) and pH were evaluated at rest. Significantly decreased β -ATP/ P_{tot} and increased P_i/P_{tot} and PDE/P_{tot} ratios were observed in nephropatic DM1 patients to controls; β -ATP/ P_{tot} was also able to distinguish groups of patients with and without nephropathy. When dividing groups according to gender, only the β -ATP/ P_{tot} ratio was significantly different between male groups of nephropatic patients and controls. In addition, we found significantly higher pH in male control group compared to female healthy controls. These gender effects were not observed in patients groups.

The six-minute exercise was sufficient to create equilibrium between the consumption and creation of PCr in most of the subjects, and the six-minute recovery period was also sufficient to fully restore the PCr signal intensity to the original values in both controls and patients (see Figure 1). We found prolongation of τ_{PCr} in patients in the order of $C < DM1 < DM1N$. However, statistical significance was seen only between the control and nephropathy groups. In addition, a significantly lower pH was found in DM1 patients compared to controls. When dividing groups according to gender only trends in dynamic parameters were observed due to

a high variance in groups of patients. Measurement on healthy volunteers revealed differences between males and females only in pH after the exercise, similarly as at rest. The differences in pH between Cm and DM1m were observed, see Table 3.

Correlation analysis

The length of the disease correlated with the patients' age ($r = 0.46$; $p = 0.0001$, Spearman's r coefficients and corresponding p values). An increasing BMI correlated with the age ($r = 0.338$; $p = 0.003$) and was coincidental with the length of the disease ($r = 0.46$; $p = 0.0006$). From rest ^{31}P MRS parameters $\beta\text{-ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ positively correlated with $\text{PDE}/\text{P}_{\text{tot}}$ ($r = 0.475$; $p = 0.0001$) and $\beta\text{-ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ negatively correlated with age ($r = -0.425$; $p = 0.0001$). From dynamic ^{31}P MRS parameters pH after exercise negatively correlated with HbA1c ($r = -0.376$; $p = 0.001$).

Discussion

^{31}P MR spectroscopy at rest and under exercise is an interesting tool for investigating energy metabolism in muscles but it has some limitations. A different physical effort of each subject may influence the results. A low drop of the PCr signal (ΔPCr) may indicate an insufficient depletion of PCr and also brings an additional error into the calculation. Therefore, only subjects with $\Delta\text{PCr} > 15\%$ were included in the study. A higher workload helps determine correct mitochondrial capacity but may provoke anaerobic metabolism and acidosis which can inhibit oxidative phosphorylation while also affecting the results (Robergs *et al.* 2004). This was probably reflected by prolonged time of PCr recovery τ_{PCr} in subjects with a lower pH after the exercise (significant negative correlation between these two parameters was observed too). Moreover, acidosis may be another marker related to the DM1 disease and probably depends on sex. We found a significant difference between the pH values of male and female

controls. It is in agreement with the findings described for quadriceps muscles (Schunk et al. 1999). Crowther (Crowther *et al.* 2003) described decreased pH values in DM1 males; on the other hand, Item (Item *et al.* 2011) found no change in the DM1 females. Our findings are similar but without statistical significance.

Although one would expect a substantial impairment of the energy metabolism in relation to diabetes, we did not find any significant differences in metabolite ratios measured at rest between controls and diabetic patients without nephropathy (DM1m, DM1f, DM1). The DM1N group (all patients with nephropathy) had higher Pi/P_{tot} and PDE/P_{tot} while having lower $\beta\text{-ATP}/P_{tot}$ in comparison to healthy controls. In addition, DM1N group was distinguished from DM1 group in $\beta\text{-ATP}/P_{tot}$. However, when we differentiated patients according to sex, the only $\beta\text{-ATP}/P_{tot}$ was significantly lower in only males (Cm vs. DM1mN). In females' groups a similar trend in $\beta\text{-ATP}/P_{tot}$ was visible. Thus we can assume that the $\beta\text{-ATP}/P_{tot}$ ratio can be the best marker to separate patients with and without nephropathy.

Decreased ATP and increased Pi can be generally associated with kidney failure and uremia (Nishida *et al.* 1991, Taborsky *et al.* 1993). Similar metabolite changes were also described in mitochondrial disorders (Mattei *et al.* 2004) and indicate a reducing phosphorylation potential. It is in agreement with negative correlation between age and $\beta\text{-ATP}/P_{tot}$. Positive correlation between age and PDE/P_{tot} can be considered consistent with an increasing BMI (Valkovic *et al.* 2016). In addition, the pH decrease after the exercise and an increase of Pi/P_{tot} negatively influence τ_{PCr} .

Similar gender changes as at rest were observed in pH after the exercise between male and female controls. This difference was not observed in respect of the patients. Pooled data of the males and females without severe nephropathy (DM1) as well as the DM1m group only had a decreased pH after the exercise compared with the control group, which is probably related to

the increased demand for PCr supply reflected also by a higher (but not statistically significant) drop of the PCr signal.

We should mention that an increased variation of obtained experimental data can also be explained by the variability of a patient's physical condition. Although all subjects filled in a questionnaire concerning their physical conditions, there was difficult to find out an objective parameter which could help with the explanation of the data variability. Thus, only qualitative trends have to be discussed. It is the case of e.g. longer recovery time τ_{PCr} in all DM1 groups compared to controls which reflects a decreased mitochondrial capacity. From this qualitative point of view, our findings of V_{iPCr} and Q_{max} in the DM1 females are not consistent with the finding outlined in Item (Item *et al.* 2011), neither did we find any significant correlation of glycosylated hemoglobin reported in that paper.

Lower V_{iPCr} and mitochondrial capacity Q_{max} in the case of the DM1 male patients compared to DM1 females without kidney failure suggests that male metabolism is influenced by DM1 more than female metabolism. However, the fact that we did not observe a similar difference in patients with severe nephropathy remains unexplained; we may speculate that severe metabolic impairment smoothed moderate gender differences.

It is known that females have a lower efficiency in the effective use of ATP for muscle contraction (Mattei *et al.* 1999). We hypothesize that the lower efficiency is related to a different proportion of muscle fibers between males and females which could also cause a different (smaller) effect of DM1 on the muscle metabolism in females.

Gender differences may also reflect DM1-related changes in levels of several important hormones and factors affecting skeletal muscle atrophy, growth, and regeneration (Krause *et al.* 2011) and hypothetically may differ in males and females.

Conclusion

We have proven that nephropathy further negatively affects the energy metabolism in diabetic patients. It is reflected by reduced relative β -ATP and increased Pi and PDE signals to P_{tot} at rest and prolongation of the PCr recovery time after the exercise. Gender specific changes can be seen in healthy subjects in pH values both at rest and after the exercise. We have not confirmed any significant gender differences in the DM1 patients by ^{31}P MR spectroscopy in our groups of patients.

Acknowledgements

The study was supported by the project Grant Agency of Charles University (project No. 315) and MHCZ-DRO 00023001IKEM.

References

- ANTONETTI DA, REYNET C, KAHN CR: Increased expression of mitochondrial-encoded genes in skeletal muscle of humans with diabetes mellitus. *J Clin Invest* **95**:1383-1388, 1995.
- ARGOV Z, LÖFBERG M, ARNOLD DL: Insights into muscle diseases gained by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Muscle Nerve* **23**: 1316-34, 2000.
- BERGMAN BC, HOWARD D, SCHAUER IE, MAAHS DM, SNELL-BERGEON JK, ECKEL RH, PERREAULT L, REWERS M: Features of hepatic and skeletal muscle insulin resistance unique to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: 1663-1672, 2012.
- BOSKA M: ATP production rates as a function of force level in the human gastrocnemius/soleus using ³¹P MRS. *Magn Reson Med* **32**: 1-10, 1994.
- BROWNLEE M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**: 813-820, 2001.
- CREE-GREEN M, NEWCOMER BR, BROWN MS, BAUMGARTNER AD, BERGMAN B, DREW B, REGENSTEINER JG, PYLE L, REUSCH JE, NADEAU KJ: Delayed skeletal muscle mitochondrial ADP recovery in youth with type 1 diabetes relates to muscle insulin resistance. *Diabetes* **64**: 383-392, 2015.
- CROWTHER GJ, MILSTEIN JM, JUBRIAS SA, KUSHMERICK MJ, GRONKA RK, CONLEY KE: Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin-dependent (type 1) diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**: E655-662, 2003.

- DEVRIES DA, MARSH GD, RODGER NW, THOMPSON RT: Metabolic response of forearm muscle to graded exercise in type II diabetes mellitus: effect of endurance training. *Can J Appl Physiol* **21**:120-33, 1996.
- FAHAL IH: Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. *Nephrol Dial Transplant* **29**: 1655-65, 2014.
- ITEM F, HEINZER-SCHWEIZER S, WYSS M, FONTANA P, LEHMANN R, HENNING A, WEBER M, BOESIGER P, BOUTELLIER U, TOIGO M: Mitochondrial capacity is affected by glycemic status in young untrained women with type 1 diabetes but is not impaired relative to healthy untrained women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**: R60-66, 2011.
- KARAKELIDES H, ASMANN YW, BIGELOW ML, SHORT KR, DHATARIYA K, COENEN-SCHIMKE J, KAHL J, MUKHOPADHYAY D, NAIR KS: Effect of insulin deprivation on muscle mitochondrial ATP production and gene transcript levels in type 1 diabetic subjects. *Diabetes* **56**: 2683-2689, 2007.
- KEMP GJ: Interactions of mitochondrial ATP synthesis and the creatine kinase equilibrium in skeletal muscle. *J Theor Biol* **170**: 239-46, 1994.
- KEMP GJ, AHMAD RE, NICOLAY K, PROMPERS JJ: Quantification of skeletal muscle mitochondrial function by ³¹P magnetic resonance spectroscopy techniques: a quantitative review. *Acta Physio* **213**: 107-144, 2015.
- KEMP GJ, MEYERSPEER M, MOSER E: Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by ³¹P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed* **20**: 555-565, 2007.
- KEMP GJ, RADDA GK: Quantitative interpretation of bioenergetic data from ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q* **10**: 43-63, 1994.

- KEMP GJ, ROUSSEL M, BENDAHAN D, LE FUR Y, COZZONE PJ: Interrelations of ATP synthesis and proton handling in ischaemically exercising human forearm muscle studied by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *J Physiol* **535**: 901-928, 2001.
- KEMP GJ, TAYLOR DJ, RADDA GK: Control of phosphocreatine resynthesis during recovery from exercise in human skeletal muscle. *NMR Biomed* **6**:66-72, 1993.
- KEMP GJ, THOMPSON CH, TAYLOR DJ, RADDA GK: ATP production and mechanical work in exercising skeletal muscle: a theoretical analysis applied to ³¹P magnetic resonance spectroscopic studies of dialyzed uremic patients. *Magn Reson Med* **33**: 601-9, 1995.
- KRAUSE MP, RIDDELL MC, HAWKE TJ: Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric Diabetes* **12**: 345-664, 2011.
- LANZA IR, BHAGRA S, NAIR KS, PORT JD: Measurement of human skeletal muscle oxidative capacity by ³¹P-MR spectroscopy: a cross-validation with in vitro measurements. *J Magn Reson Imaging* **34**: 1143-1150, 2011.
- MATTEI JP, BENDAHAN D, COZZONE P: P-31 magnetic resonance spectroscopy. A tool for diagnostic purposes and pathophysiological insights in muscle diseases. *Reumatismo* **56**: 9-14, 2004.
- MATTEI JP, BENDAHAN D, ROUSSEL M, LEFUR Y, COZZONE PJ: Gender modulates the energy cost of muscle contraction in untrained healthy subjects. A ³¹P magnetic resonance spectroscopy analysis. *FEBS Lett* **450**:173-177, 1999.
- MOON RB, RICHARDS JH: Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *J Biol Chem* **248**: 7276-7578, 1973.
- NISHIDA A, KUBO K, NIHEI H: Impaired muscle energy metabolism in uremia as monitored by ³¹P-NMR. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* **33**: 65-73, 1991.

- PERSEGHIN G, LATTUADA G, DANNA M, SERENI LP, MAFFI P, DE COBELLI F, BATTEZZATI A, SECCHI A, DEL MASCHIO A, LUZI L: Insulin resistance, intramyocellular lipid content, and plasma adiponectin in patients with type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**: E1174-1181, 2003.
- PETERSEN KF, DUFOUR S, BEFROY D, GARCIA R, SHULMAN GI: Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* **350**: 664-671, 2004.
- RABOL R, HOJBERG PM, ALMDAL T, BOUSHEL R, HAUGAARD SB, MADSBAD S, DELA F: Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 1372-1378, 2009.
- ROBERGS RA, GHIASVAND F, PARKER D: Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**: R502-516, 2004.
- ROSSETTI L: Glucose Toxicity - the Implications of Hyperglycemia in the Pathophysiology of Diabetes-Mellitus. *Clinical and Investigative Medicine* **18**: 255-260, 1995.
- SCHUNK K, PITTON M, DÜBER C, KERSJES W, SCHADMAND-FISCHER S, THELEN M. Dynamic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy of the quadriceps muscle: effects of age and sex on spectroscopic results. *Invest Radiol*. **34**:116-125, 1999.
- SEDIVY P, KIPFELSBERGER MC, DEZORTOVA M, KRSSAK M, DROBNY M, CHMELIK M, RYDLO J, TRATTNIG S, HAJEK M, VALKOVIC L: Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys* **42**: 1678-1689, 2015.
- SZENDROEDI J, RODEN M: Mitochondrial fitness and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* **51**: 2155-2167, 2008.

- TABORSKY P, SOTORNIK I, KASLIKOVA J, SCHUCK O, HAJEK M, HORSKA A: 31P magnetic resonance spectroscopy investigation of skeletal muscle metabolism in uraemic patients. *Nephron* **65**: 222-226, 1993.
- TAYLOR DJ, STYLES P, MATTHEWS PM, ARNOLD DA, GADIAN DG, BORE P, RADDA GK: Energetics of human muscle: exercise-induced ATP depletion. *Magn Reson Med* **3**: 44-54, 1986.
- VALKOVIČ L, CHMELÍK M, KRŠŠÁK M: In-vivo 31P-MRS of skeletal muscle and liver: A way for non-invasive assessment of their metabolism. *Anal Biochem* **529**: 193-215, 2017.
- VALKOVIC L, CHMELIK M, UKROPCOVA B, HECKMANN T, BOGNER W, FROLLO I, TSCHAN H, KREBS M, BACHL N, UKROPEC J, TRATTNIG S, AND KRSSAK M: Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content. *Scientific reports* **6**: 20087, 2016.
- VANHAMME L, VAN DEN BOOGAART A, VAN HUFFEL S: Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* **129**: 35-43, 1997.
- WILCOX G. INSULIN AND INSULIN RESISTANCE: *Clin Biochem Rev* **26**: 19-39, 2005.
- YKI-JARVINEN H, SAHLIN K, REN JM, KOIVISTO VA: Localization of rate-limiting defect for glucose disposal in skeletal muscle of insulin-resistant type I diabetic patients. *Diabetes* **39**:157-167, 1990.

Tables

Table 1. Age, body mass index (BMI), disease length, and selected biochemical data (glycosylated hemoglobin - HbA1c, and creatinine evaluated from blood tests) of the evaluated groups of patients and controls. Mean values \pm standard deviations are listed.

Subject group	Age (years)	BMI (kg/m ²)	Length of the disease (years)	HbA1c (%)	Creatinine (μ mol/L)
Cm (14)	32 \pm 9	26 \pm 4	0	3.1 \pm 0.1	84 \pm 8
DM1m (19)	35 \pm 11	24 \pm 4	12 \pm 8	7.2 \pm 1.8	81 \pm 13
DM1mN (13)	44 \pm 9	27 \pm 4	28 \pm 6	7.1 \pm 1.5	491 \pm 360
Cf (12)	40 \pm 10	25 \pm 4	0	3.7 \pm 0.3	70 \pm 7
DM1f (14)	38 \pm 13	27 \pm 4	17 \pm 13	7.5 \pm 1.5	64 \pm 11
DM1fN (5)	33 \pm 7	24 \pm 4	22 \pm 5	7.4 \pm 1.9	503 \pm 225
C (26)	36 \pm 10	25 \pm 4	0	3.4 \pm 0.4	77 \pm 11
DM1 (33)	36 \pm 12	25 \pm 4	18 \pm 10	7.3 \pm 1.7	74 \pm 15
DM1N (18)	41 \pm 9	26 \pm 4	26 \pm 6	7.2 \pm 1.6	494 \pm 321

Cm – control males, Cf - control females, C - control males and females, DM1m - diabetic males, DM1f - diabetic females, DM1 - diabetic males and females, DM1mN - diabetic males with nephropathy, DM1fN – diabetic females with nephropathy, DM1N - diabetic males and females with nephropathy; significant differences ($p < 0.05$) are labeled

Table 2. Metabolic concentrations of phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (Pi), adenosine triphosphate (signal of the second phosphate, β -ATP), and phosphodiester (PDE) related to total integral of the phosphorous spectra (P_{tot}), and pH measured at rest evaluated for the patients' groups and controls. Mean values \pm standard deviations are listed.

Subject group	PCr/P_{tot}	Pi/P_{tot}	β-ATP/P_{tot}	PDE/P_{tot}	pH
Cm	0.49 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.101 \pm 0.009	0.050 \pm 0.017	7.047 \pm 0.032
DM1m	0.50 \pm 0.03	0.07 \pm 0.02	0.101 \pm 0.015	0.051 \pm 0.019	7.032 \pm 0.022
DM1mN	0.50 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.083 \pm 0.004	0.069 \pm 0.021	7.032 \pm 0.018
Cf	0.50 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.093 \pm 0.007	0.053 \pm 0.020	7.019 \pm 0.026
DM1f	0.49 \pm 0.04	0.08 \pm 0.03	0.089 \pm 0.011	0.056 \pm 0.015	7.019 \pm 0.019
DM1fN	0.50 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.083 \pm 0.004	0.058 \pm 0.023	7.040 \pm 0.020
C	0.497 \pm 0.0214	0.063 \pm 0.016	0.097 \pm 0.009	0.052 \pm 0.018	7.03 \pm 0.030
DM1	0.494 \pm 0.0334	0.071 \pm 0.022	0.096 \pm 0.015	0.053 \pm 0.017	7.03 \pm 0.022
DM1N	0.497 \pm 0.0248	0.078 \pm 0.015	0.085 \pm 0.009	0.066 \pm 0.022	7.03 \pm 0.019

Cm - control males, Cf - control females, C - control males and females, DM1m - diabetic males, DM1f - diabetic females, DM1 - diabetic males and females, DM1mN - diabetic males with nephropathy, DM1fN - diabetic females with nephropathy, DM1N - diabetic males and females with nephropathy; significant differences ($p < 0.05$) are labeled

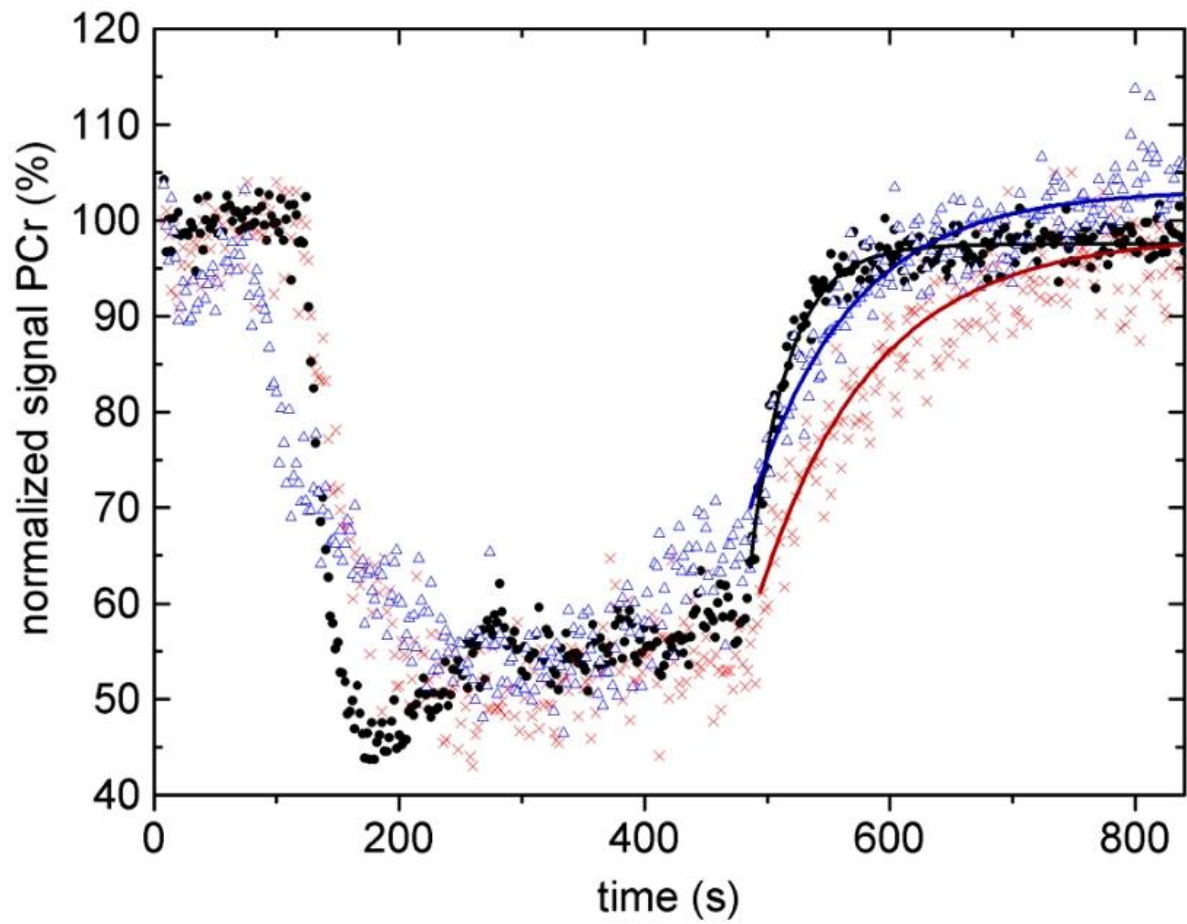
Table 3. Dynamic parameters – recovery time of phosphocreatine after exercise (τ_{PCr}), drop of phosphocreatine during exercise (ΔPCr), speed of PCr replenishment (V_{iPCr}), mitochondrial capacity (Q_{max}), and pH after exercise of the patients' groups and controls. Mean values \pm standard deviations are listed.

Subject group	τ_{PCr} (s)	ΔPCr (%)	V_{iPCr} (mmol/s)	Q_{max} (mmol/s)	pH after exercise
Cm	53 \pm 24	36 \pm 18	0.32 \pm 0.12	0.58 \pm 0.21	7.002 \pm 0.169
DM1m	60 \pm 29	42 \pm 18	0.25 \pm 0.09	0.50 \pm 0.17	6.876 \pm 0.197
DM1mN	87 \pm 70	45 \pm 21	0.30 \pm 0.14	0.51 \pm 0.19	6.895 \pm 0.219
Cf	42 \pm 11	38 \pm 11	0.42 \pm 0.18	0.71 \pm 0.25	6.945 \pm 0.155
DM1f	61 \pm 23	45 \pm 16	0.36 \pm 0.12	0.63 \pm 0.16	6.826 \pm 0.134
DM1fN	80 \pm 56	41 \pm 17	0.31 \pm 0.15	0.52 \pm 0.24	6.970 \pm 0.174
C	48 \pm 19	36 \pm 14	0.36 \pm 0.16	0.64 \pm 0.23	6.976 \pm 0.162
DM1	60 \pm 26	43 \pm 17	0.30 \pm 0.11	0.55 \pm 0.17	6.855 \pm 0.173
DM1N	85 \pm 65	44 \pm 20	0.30 \pm 0.14	0.51 \pm 0.20	6.916 \pm 0.206

Cm – control males, Cf - control females, C - control males and females, DM1m - diabetic males, DM1f - diabetic females, DM1 - diabetic males and females, DM1mN - diabetic males with nephropathy, DM1fN – diabetic females with nephropathy, DM1N - diabetic males and females with nephropathy; significant differences ($p < 0.05$) are labeled

Figure captions

Fig. 1. Typical changes in phosphocreatine (PCr) during the rest – exercise – recovery periods during the examination of a female control (black), DM1 patient without (blue) and with (red) nephropathy.





INTERNATIONAL ANGIOLOGY

Editorial Office

Sent by e mail: miha@medicon.cz

March 19, 2018

Dear Dr. Sedivy and Authors,

Thank you for submitting your **Manuscript 3943 "31P MR spectroscopy of patients with mild and serious lower limb ischemia"**, by Sedivy P. et al.

I am pleased to inform you that your submission; has received positive comments and can be accepted for publication in "International Angiology.

The publishers will be in contact with you in due course; regarding the proofs, which will be sent to you prior to the publication date, along with the official copyright forms.

When you receive your manuscript in a typeset format; (if you have resubmitted your article), please ensure that you are proofing the final version; which I will forward, to the publisher's in due course. Your article has also been edited.

Thank you again for considering "International Angiology Journal" for your submission.

Yours sincerely,

Andrew Nicolaidis

Professor A N Nicolaidis MS, FRCS PhD (Hon)
Editor in Chief

³¹P MR spectroscopy of patients with mild and serious lower limb ischemia

^{1,2}Petr Sedivy, ^{1,2}Miloslav Drobny, ¹Monika Dezortova, ¹Vit Herynek, ³Karel Roztocil,
³Helena Cermakova, ⁴Andrea Nemcova, ⁴Michal Dubsky, ¹Milan Hajek*

¹MR-unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

³Transplant Surgery Department, Transplant Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁴Department of Diabetes, Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Correspondence:

Dr. Milan Hajek

MR-unit

Department of Diagnostic and Interventional Radiology

Institute for Clinical and Experimental Medicine

Videnska 1958/9

14021 Prague

Czech Republic

e-mail: miha@medicon.cz

Number of words (abstract): 227

Number of Figures: 3

Number of Tables: 3

Number of references: 37

Abstract

Background

^{31}P MR spectroscopy is a technique for undertaking a comprehensive evaluation of muscle metabolism. The goal of the study was to compare patients with mild and serious lower limb ischemia measured by ^{31}P MR spectroscopy at rest and during exercise.

Materials and methods

16 nondiabetic mild peripheral arterial occlusive disease (PAOD) patients, 23 diabetic PAOD patients with serious ischemia and 19 healthy controls were examined by rest and dynamic ^{31}P MR spectroscopy at the 3T MR system equipped with an MR-compatible home-made pedal ergometer. Signal intensity ratios of phosphorous metabolites to the sum of all ^{31}P intensities (P_{tot}) and pH were obtained at rest. The PCr drop (ΔPCr), time recovery constant of PCr (τPCr), pH at the end of the exercise (pH_{end}), and mitochondrial capacity (Q_{max}) were calculated from dynamic MR spectra.

Results

Diabetic PAOD patients with serious ischemia differed from controls in both rest (PCr/Pi , $\beta\text{ATP}/P_{\text{tot}}$, pH) and dynamic (Q_{max} , pH_{end} , τPCr) parameters. PAOD patients with mild ischemia differed from controls only in Q_{max} and pH_{end} . Rest parameters of the nondiabetic PAOD patients did not differ from control values excluding rest pH which was higher in both patient groups.

Conclusion

A combination of rest and dynamic ^{31}P MR spectroscopy can distinguish all three groups of subjects. On the other hand, examination at rest is sufficient for differentiation between patients' groups and verification of serious ischemia.

Keywords:

Magnetic Resonance Spectroscopy, Peripheral Vascular Diseases, Diabetes Mellitus, Muscle, Energy Metabolism

Introduction

An increased number of human diseases that affect skeletal muscles are studied using different techniques and a demand exists to use non-invasive methods to describe metabolism of muscles in vivo. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) in combination with magnetic resonance imaging (MRI) offers not only noninvasive information about muscle morphology but also insight into muscular metabolism which covers mitochondrial oxidative phosphorylation, glycolysis and creatine and adenylate kinase activity. It is predominantly ^{31}P MR spectroscopy which is a powerful tool for the non-invasive investigation of muscular oxidative metabolism and its limitations. Dynamic ^{31}P MR spectroscopy data can be used to calculate mitochondrial capacity Q_{\max} , time constant of PCr recovery (τPCr) or to evaluate pH changes during workload. Rest ^{31}P MR spectroscopy provides quantitative parameters that characterize the basal muscle metabolism. ¹⁻³

The effect of the reduction of blood supply to muscle metabolism has been described in healthy volunteers in occlusive experiments by ^{31}P MR spectroscopy in several studies. ⁴⁻⁷ Reduced blood supply limits the oxidative muscle metabolism and causes acidosis due to anaerobic glycolysis. Similar results ⁸⁻¹¹ were found in patients with peripheral artery occlusive disease (PAOD) in which chronic ischemia causes claudication and restricts the walking distance. With the progression and duration of ischemia the incidence of ulcers formation, limb gangrene and amputation of lower extremity increases. One of the diseases which is often involved in forming critical ischemia is diabetes mellitus. ¹²

It is known that diabetes negatively affects oxidative muscle metabolism since its onset. It was found that young patients with type 2 diabetes (T2D) had decreased mitochondrial capacity ¹³ similarly as was observed in uncomplicated patients with type 1 diabetes (T1D). ¹⁴ Furthermore, prolonged and poorly controlled diabetes leads to microangiopathy, neuropathy and nephropathy complications. Microangiopathy causes a further reduction of blood flow in

the muscle and neuropathy leads to muscle weakness,¹⁵ lower regenerative capacity of muscle tissue, formation of foot ulcer and gangrene. In diabetic patients it is difficult to find a suitable, non-invasive and accurate method for assessing ischemia and tissue damage of the lower limb because several standard methods do not work for diabetic patients. Ankle brachial index (ABI) or CT angiography could be misleading due to mediocalcinosis that diabetic patients often suffer from.¹² On the other hand, exercise stress tests such as claudication distance on a treadmill can be influenced by neuropathy or the subjective feelings of the patients. Transcutaneous oxygen tension measurement (T_{cp}O₂) which is often used in diabetic patients indicates only skin perfusion in the position of electrodes and its lower value can be caused by e.g. edema, excess consumption of oxygen from inflammation, etc.¹⁶

From this perspective, ³¹P MR spectroscopy is an interesting technique for undertaking a comprehensive evaluation of PAOD in diabetic patients, although the parameters from rest and dynamic ³¹P MR spectroscopy do not always clearly correlate with other commonly used diagnostic methods (ABI, treadmill test, tissue perfusion).^{11,17,18}

Our study tested two hypotheses: i) the rest and dynamic MR spectroscopy parameters can distinguish groups of PAOD patients with mild or serious ischemia and healthy controls; ii) ³¹P MR examination at the rest is sufficient for clinical description of PAOD patient groups.

Materials and Methods

Subjects

- a) Control group (CG) - 19 healthy volunteers (moderately physically active without any signs of diabetes and presence of claudication or other symptoms of PAOD).
- b) Nondiabetic mild-to-moderate PAOD patient group (PA) - 16 subjects (selection patients' criteria: presence of calf muscle claudication; ischemia verified by an angiology specialist; absence of defects, rest pain and diabetes).
- c) Diabetic patients with serious ischemia (DPA) – 23 subjects (selection patients' criteria: non-healing trophic skin defects; considerable infrapopliteal stenosis verified angiographically). Detailed characterization of the subjects is listed in Table 1. All subjects were informed about the course of the examination and they signed an informed consent with the study. The study was approved by the local ethical committee in accordance with the Declaration of Helsinki.

MR examination

MR examinations were performed at the 3T MR system (TRIO, Siemens, Erlangen, Germany) with a dual-channel $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ surface coil (Rapid Biomedical, Germany). All subjects were examined in a supine position with the coil fixed under the m. gastrocnemius. The positioning of the coil was verified using a standard localizer sequence.

^{31}P MR spectra at rest were acquired by the non-localized free induction decay sequence with the following parameters: acquisition delay $\text{TE}^* = 0.4$ ms, repetition time (TR) = 15 s, 16 acquisitions, vector size = 1024, acquisition time = 4 minutes. Magnetic field homogeneity was optimized manually.

Dynamic ^{31}P MRS examination was performed using a home-made ergometer. 19 ^{31}P MR spectra were obtained by the same sequence as at rest with the following changes of

parameters: TR = 2 s, 1 acquisition, 420 measurements. The exercise protocol was divided into three parts: rest-exercise-recovery = 2-6-6 mins. The total examination time did not exceed 30 minutes. The maximal voluntary force (MVF) was measured using pedal dynamometer in healthy controls and PA groups before the exercise. In DPA, MVF was difficult to measure due to pain in diabetic ulcers and the measurement was not considered ethical. The exercise was performed by the plantar flexion during TR with a standardized load of 7.3 kg. This model of exercise examination was used according to the studies described by Kemp,^{20,21} Conley,²² Rossiter.²³ Optical synchronization was used to navigate the subjects during the exercise period of the examination.

Spectra evaluation

Spectra were analyzed by the AMARES time domain fitting routine (using prior knowledge)²⁴ in the jMRUI 5.0 software package. Lorentzian line shapes were applied for fitting the following singlets: phosphocreatine (PCr: 0 ppm), inorganic phosphate (Pi: 4.94 ppm), phosphodiester signals (PDE: glycerol-3-phosphorylcholine and glycerol-3-phosphorylethanolamine; 2.99 and 3.51 ppm). The adenosine triphosphate (ATP) peaks were fitted as two doublets (α : -7.35 ppm; γ : -2.28 ppm) and a triplet (β : -15.5 ppm). The relative chemical shift of Pi and PCr (δ in ppm) was used to calculate the intracellular pH according to the equation²⁵ $\text{pH} = 6.75 + \log[(\delta - 3.27)/(5.63 - \delta)]$.

Spectra obtained during the exercise and recovery periods were used to calculate a drop of PCr (ΔPCr), time constant of PCr recovery (τ_{PCr}), PCr initial recovery rate (V_{PCr}), pH at the beginning and at the end of the exercise (pH , pH_{end}). Mitochondrial capacity Q_{max} was calculated according to the model of Michaelis & Menten, for details see.¹⁹ The βATP signal was used as a concentration reference, assuming a stable ATP concentration of 8.2 mM in the

muscle tissue healthy control, ²⁶ concentration of ATP in patients was corrected used $\beta\text{ATP}/P_{\text{tot}}$ ratio.

Spectrum at the rest and PCr values measured during dynamic ³¹P MR examination are shown in Figures 1. Normalized output was calculated as the overall work done (total lift height of the weights) divided by the exercise time (6 minutes) and the area of m. gastrocnemius measured from transversal MR images.

Statistical evaluation

Tukey's honest significance test and ANOVA tests were used for statistical data evaluation. Normality of data was verified by the Shapiro-Wilk test and variances were tested using an F-test. Null hypothesis was considered as a statistically significant if $p < 0.05$.

Results

Values of pH and signal intensity ratios of PCr, Pi, βATP , and PDE to the sum of all ³¹P intensities (P_{tot}) in the spectra are summarized in Table 2. The most significant changes are shown in Figure 2. The DPA group differed from the other groups in the parameters PCr/Pi, Pi/ P_{tot} , PCr/ P_{tot} . The DPA group differed only from controls in $\beta\text{ATP}/P_{\text{tot}}$ and PDE/ P_{tot} . Both the PA and DPA groups differed from controls in pH but not between them. The PA group did not differ significantly from controls in signal ratios of phosphorous metabolites.

In six DPA patients we observed the splitting of inorganic phosphate signal (see Fig. 1A) in the rest spectra which could represent the presence of compartment with increased pH.

Dynamic ³¹P MR parameters obtained during exercise and recovery periods are summarized in Table 3 and Figure 3. ANOVA analysis of dynamic parameters showed significant changes in ΔPCr , τPCr , V_{PCr} Q_{max} and pH_{end} in our groups. Mitochondrial capacity Q_{max} was lower in patient groups PA and DPA compared with the control group without significant differences

among the patient groups. The same results were found for pH_{end} and ΔPCr . In the DPA group serious ischemia also resulted in a significant increase of the PCr recovery time constant after exercise and decreased V_{PCr} compared with controls.

Concerning clinical parameters, significant correlation was found between BMI and $\text{PDE}/\text{P}_{\text{tot}}$ ($r = 0.62$, $p < 0.001$, see Fig. 3) for all subjects. In the PA group, MRS results were correlated only with ABI (significant correlation between $\beta\text{ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ and ABI; Pearson's correlation coefficient $r = 0.70$, $p = 0.003$). In the DPA group, MRS results did not correlate with TcPO_2 . We only found significant correlation of Q_{max} with the duration of diabetes ($r = -0.51$, $p = 0.03$) in the DPA group (but not with age in this group).

Discussion

The main results of the present study show that the combination of rest and quantitative dynamic ^{31}P MR parameters and pH differentiate the groups of PA and DPA from controls and between themselves.

At rest, we found the most significant changes in increased $\text{Pi}/\text{P}_{\text{tot}}$ and decreased $\text{PCr}/\text{P}_{\text{tot}}$, $\text{Pi}/\text{P}_{\text{tot}}$ and $\beta\text{ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ ratios in the DPA group compared to the other groups (see Table 2). It reflects increased concentration of inorganic phosphate and decreased concentration of phosphocreatine and these changes are usually characterized in the PCr/Pi ratio. A decrease of this parameter shows impaired oxidative metabolism in muscles.²⁷ Its reduction in the DPA group is similar to changes observed in many severe muscular diseases, e.g. dystrophies²⁸ and also in critical ischemic patients.²⁹ Unlike the DPA group there are no significant differences in the above mentioned parameters in the PA group compared with controls with the exemption of pH. $\beta\text{ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ was significantly decreased only in DPA patients compared to PA.

A significantly increased $\text{PDE}/\text{P}_{\text{tot}}$ ratio was also observed in the DPA group. The increasing PDE concentration is consistent with the development of muscular myopathies in the DPA patients. However, a higher signal of phosphodiesterases was also often described³⁰ in subjects with a higher body mass index. It is known that diabetes notably contributes to the impairment of muscular health. The effects of decreased metabolic capacity, decreased capillarization, atrophy, switch to glycolytic fiber type due to a chronic low-grade inflammatory profile, oxidative stress and others are similar in both T1D and T2D types.³¹

The comparison of PAOD in patients with and without diabetes was only discussed in one study⁹ where diabetic patients had a moderately elevated $\text{PDE}/\beta\text{ATP}$ ratio. In patients with

diabetic foot syndrom^{32,33} changes were more pronounced similarly to our results at rest where we observed significant changes to controls also in PCr/Pi and pH parameters.

Resting alkalosis was a factor characterizing both groups of ischemic patients. Rest alkalosis could be explained by impaired cell homeostasis or as the result of increased PCr hydrolysis at rest and consumption of protons.³⁴ In six DPA subjects the split of the inorganic phosphate signal at rest was detected, see Figure 1. In healthy subjects at the ultra-high magnetic field strength (7T) a similar alkaline signal of Pi was detected,^{30,35} and this signal was identified as a signal of intramitochondrial phosphate and its higher value positively correlated with higher oxidative capacity. It is probably not the case of our ischemic patients. As such, we prefer the explanation that these phosphate signals originate from two different muscular compartments with different pH (more and less damaged/ischemic cells) and/or extracellular space (edema). Contrary to the rest findings, where we were able to separate DPA from the others, dynamic examination seems to be more sensitive. There is a well visible trend in the worsening of τ PCr and mitochondrial capacity values in the order CG→PA→DPA groups which is in agreement with the synergy effect of diabetes and ischemia and clinical status of patients.

A significant difference between controls and patient groups PA and DPA was found in mitochondrial capacity, drop of PCr and pH. A significant difference between controls and only the DPA group was found in the τ PCr, and PCr initial recovery rate, see Table 3; nevertheless, no significant difference between the PA and DPA groups was observed. The decrease of mitochondrial capacity of about 40%, prolongation of post exercise τ PCr recovery more than twice in both the PA and DPA groups are in agreement with former dynamic ³¹P MRS studies of ischemic patients.^{8,11,36} In several of our DPA patients τ PCr was extremely long (> 500 s), which results in rather high standard deviation.

A significant pH_{end} decreasing trend was also found in the order of CG→PA→DPA groups (see Table 3). This trend, emphasized by an increasing difference in pH before and after the exercise, reflects the severity of muscular weakness. The pH decrease during the exercise is a consequence of anaerobic glycolysis. Acidosis can prolong τPCr and reduce mitochondrial capacity because protons inhibit oxidative phosphorylation.³⁷ For this reason, the pH drop is a somewhat undesirable phenomenon which can influence the interpretation of results. On the other hand, pH could be an important diagnostic marker for the PAOD diagnosis. Mean pH values after the exercise in the PA and DPA groups decreased by about 3%, but we could observe even a 9% decrease in the case of the most severe patient. Contrary, in controls, no pH significant change was found. The pH decreasing trend arising from the exercise in the PA and DPA patients is supported by the fact that their normalized output was the same compared to the CG. This finding indicates that the severity of the disease is an important factor influencing pH. In our study small uniform pedal resistance of 7.3 kg was applied (21 ± 11 % maximal voluntary force in PA and CG) which is usually well below the anaerobic threshold (50-60 % maximal voluntary force). Precise adjustment of pedal resistance according to the maximal voluntary force was not possible in the DPA patients; nevertheless, patient exercise output was a more important parameter characterizing exercise intensity than the maximal voluntary force (see Table 3 and Figure 3).

We found significant correlation between ankle-brachial index and the rest $\beta\text{ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ ratio inside the PA group. It means that rest muscle metabolism is slightly influenced by ischemia in these patients. We did not find any significant correlation between dynamic ^{31}P MRS parameters and walking distance in the PA group. On the other hand, walking distance also depends on an individual subjective feeling to tolerate claudication whereas ^{31}P MRS is an objective method.

In the DPA group a significant correlation was found only between duration of diabetes and mitochondrial capacity as expected. We did not find significant correlations between transcutaneous oxygen tension measurement and ^{31}P MRS parameters but transcutaneous oxygen tension is a method that measures perfusion in a thin layer near the body surface contrary to MR spectroscopy where also deep calf muscles are included.

Conclusion

^{31}P MR parameters of muscles in healthy controls and patients show that PAOD significantly influences muscle metabolism which is reflected in dynamic parameters of both the PA and DPA patients. We confirmed the hypothesis that a combination of rest and dynamic ^{31}P MRS can distinguish all three groups of subjects. On the other hand, rest examination is sufficient for differentiation between patients' groups.

Acknowledgements: *Supported by projects: Ministry of Health of the Czech Republic MHCZ-DRO 00023001IKEM and the Charles University Grant Agency, project No. 315.*

References

1. Kemp GJ, Roberts N, Bimson WE, Bakran A, Harris PL, Gilling-Smith GL, et al. Mitochondrial function and oxygen supply in normal and in chronically ischemic muscle: a combined ³¹P magnetic resonance spectroscopy and near infrared spectroscopy study in vivo. *J Vasc Surg* 2001;34:1103–10.
2. Kemp GJ, Taylor DJ, Radda GK. Control of phosphocreatine resynthesis during recovery from exercise in human skeletal muscle. *NMR Biomed* 1993;6:66–72.
3. Prompers JJ, Jeneson JAL, Drost MR, Oomens CCW, Strijkers GJ, Nicolay K. Dynamic MRS and MRI of skeletal muscle function and biomechanics. *NMR Biomed* 2006; 19:927–53.
4. Greiner A, Esterhammer R, Bammer D, Messner H, Kremser C, Jaschke WR, et al. High-energy phosphate metabolism in the calf muscle of healthy humans during incremental calf exercise with and without moderate cuff stenosis. *Eur J Appl Physiol* 2007;99:519–31.
5. Greiner A, Esterhammer R, Pilav S, Arnold W, Santner W, Neuhauser B, et al. High-energy phosphate metabolism in the calf muscle during moderate isotonic exercise under different degrees of cuff compression: a phosphorus ³¹ magnetic resonance spectroscopy study. *J Vasc Surg* 2005; 42:259–67.
6. Wiener DH, Maris J, Chance B, Wilson JR. Detection of skeletal muscle hypoperfusion during exercise using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:793–9.
7. Yoshida T, Watari H. Effect of circulatory occlusion on human muscle metabolism during exercise and recovery. *Eur J Appl Physiol* 1997;75(3):200–5.
8. Greiner A, Esterhammer R, Messner H, Biebl M, Mühlthaler H, Fraedrich G, et al. High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in patients with unilaterally symptomatic peripheral arterial disease measured by phosphorus ³¹ magnetic resonance spectroscopy. *J Vasc Surg*. 2006;43:978–86.
9. Schunk K, Romanehsen B, Mildenerger P, Kersjes W, Schadmand-Fischer S, Thelen M. Dynamic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in arterial occlusive disease. Correlation with clinical and angiographic findings and comparison with healthy volunteers. *Invest Radiol* 1997;32:651–9.
10. Kemp GJ, Hands LJ, Ramaswami G, Taylor DJ, Nicolaidis A, Amato A, et al. Calf muscle mitochondrial and glycogenolytic ATP synthesis in patients with claudication due to peripheral vascular disease analysed using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Clin Sci (Lond)* 1995;89:581–90.
11. Isbell DC, Berr SS, Toledano AY, Epstein FH, Meyer CH, Rogers WJ, et al. Delayed calf muscle phosphocreatine recovery after exercise identifies peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2289–95.
12. American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:3333–41.

13. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:664–71.
14. Cree-Green M, Newcomer BR, Brown MS, Baumgartner AD, Bergman B, Drew B, et al. Delayed skeletal muscle mitochondrial ADP recovery in youth with type 1 diabetes relates to muscle insulin resistance. *Diabetes* 2015;64:383–92.
15. American Diabetes Association. (9) Microvascular complications and foot care. *Diabetes Care* 2015;38 Suppl:S58-66.
16. Fife CE, Smart DR, Sheffield PJ, Hopf HW, Hawkins G, Clarke D. Transcutaneous oximetry in clinical practice: consensus statements from an expert panel based on evidence. *Undersea Hyperb Med* 2009;36:43–53.
17. Anderson JD, Epstein FH, Meyer CH, Hagspiel KD, Wang H, Berr SS, et al. Multifactorial determinants of functional capacity in peripheral arterial disease: uncoupling of calf muscle perfusion and metabolism. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:628–35.
18. Pipinos II, Shepard AD, Anagnostopoulos P V., Katsamouris A, Boska MD. Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2000;31:944–52.
19. Šedivý P, Christina Kipfelsberger M, Dezortová M, Krššák M, Drobný M, Chmelík M, et al. Dynamic 31 P MR spectroscopy of plantar flexion: Influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys* 2015;42:1678–89.
20. 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. *Magn Reson Med* 1994;31:248–58.
21. Kemp GJ, Taylor DJ, Styles P, Radda GK. The production, buffering and efflux of protons in human skeletal muscle during exercise and recovery. *NMR Biomed* 1993;6:73–83.
22. Conley KE, Kushmerick MJ, Jubrias SA. Glycolysis is independent of oxygenation state in stimulated human skeletal muscle in vivo. *J Physiol* 1998; 935–45.
23. Rossiter HB, Howe FA, Ward SA, Kowalchuk JM, Griffiths JR, Whipp BJ. Intersample fluctuations in phosphocreatine concentration determined by 31P-magnetic resonance spectroscopy and parameter estimation of metabolic responses to exercise in humans. *J Physiol* 2000; 528:359–69.
24. Vanhamme, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* 1997;129:35–43.
25. Moon RB, Richards JH. Determination of intracellular pH by 31P magnetic resonance. *J Biol Chem* 1973;248:7276–8.
26. Kemp GJ, Meyerspeer M, Moser E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by 31P MRS: a quantitative review. *NMR Biomed* 2007;20:555–65.

27. Argov Z, Löfberg M, Arnold DL. Insights into muscle diseases gained by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Muscle Nerve* 2000;23:1316–34.
28. Barany M, Siegel IM, Venkatasubramanian PN, Mok E, Wilbur AC. Human leg neuromuscular diseases: P-31 MR spectroscopy. *Radiology* 1989;172:503–8.
29. Zatina MA, Berkowitz HD, Gross GM, Maris JM, Chance B. 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy: noninvasive biochemical analysis of the ischemic extremity. *J Vasc Surg* 1986;3:411–20.
30. Valkovič L, Chmelík M, Ukropcová B, Heckmann T, Bogner W, Frolo I, et al. Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content. *Sci Rep* 2016 2017;6:20087.
31. D’Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front Physiol* 2013; 4:379.
32. Greenman RL, Panasyuk S, Wang X, Lyons TE, Dinh T, Longoria L, et al. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. *Lancet* 2005;366:1711–7.
33. Greenman RL, Khaodhiar L, Lima C, Dinh T, Giurini JM, Veves A. Foot small muscle atrophy is present before the detection of clinical neuropathy. *Diabetes Care* 2005;28:1425–30.
34. Wahl DG, Simon JP, Robin B, Walker P, Jouanny P, Escanye JM, et al. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy: a noninvasive technique for the study of occlusive arterial leg disease and peripheral vasodilator therapy. *Angiology*.1994;45:367–76.
35. Kan HE, Klomp DWJ, Wong CS, Boer VO, Webb AG, Luijten PR, et al. In vivo 31P MRS detection of an alkaline inorganic phosphate pool with short T1 in human resting skeletal muscle. *NMR Biomed* 2010;23:995–1000.
36. Kemp GJ, Roussel M, Bendahan D, Le Fur Y, Cozzzone PJ. Interrelations of ATP synthesis and proton handling in ischaemically exercising human forearm muscle studied by 31P magnetic resonance spectroscopy. *J Physiol* 2001;535:901–28.
37. Jubrias SA, Crowther GJ, Shankland EG, Gronka RK, Conley KE. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J Physiol* 2003; 553:589–99.

Figures and Tables caption

Figure 1.— A) The comparison of the ^{31}P MR spectrum with inorganic phosphate signal splitting in the patient from the DPA group with the spectrum of the patient from the PA group (spectra have been normalized to the same height of PCr signal). B) The comparison of normalized PCr values during the rest, exercise and recovery period of the patients from the CG, PA and DPA groups. PA and DPA patients have a bigger drop of PCr and slower recovery of PCr to rest values.

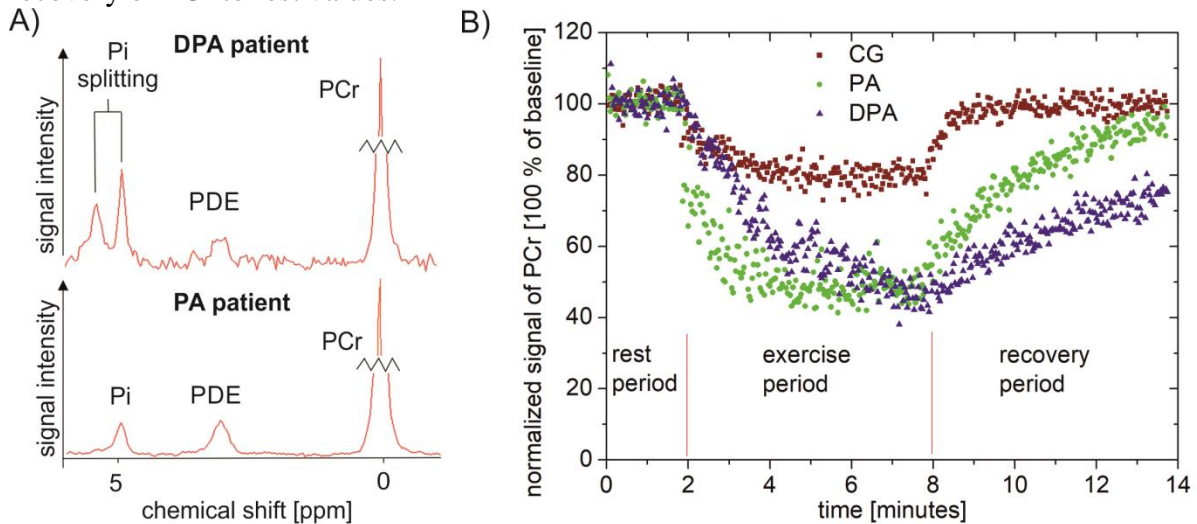


Figure 2.— Box plots of the most significant changes of ^{31}P parameters among control (CG), nondiabetic mild-to-moderate patients (PA) and diabetic patients with serious ischemia (DPA) groups at rest: A) PCr/Pi; B) pH (calculated from ^{31}P MRS); C) correlation graph of PDE/ P_{tot} vs. BMI. (P_{tot} – total ^{31}P signal intensity, PCr – phosphocreatine, Pi - inorganic phosphate; for details see also Table 2).

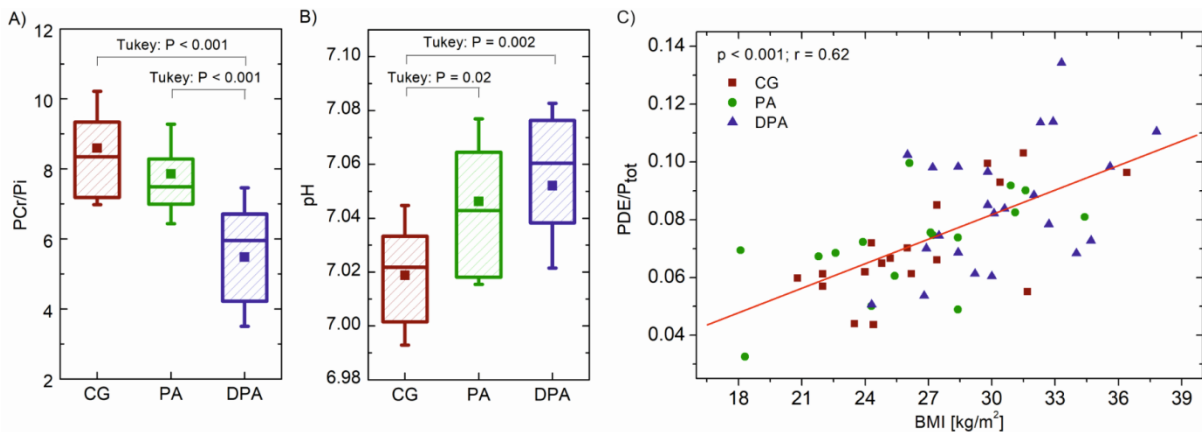


Figure 3.— Box plots of differences in dynamic ^{31}P parameters among control (CG), nondiabetic mild-to-moderate patients (PA) and diabetic patients with serious ischemia (DPA) groups: A) normalized output [W/cm^2]; B) drop of phosphocreatine during exercise (ΔPCr); C) time constant of PCr recovery (τPCr) and D) mitochondrial capacity (Q_{max}). (For details see also Table 3.).

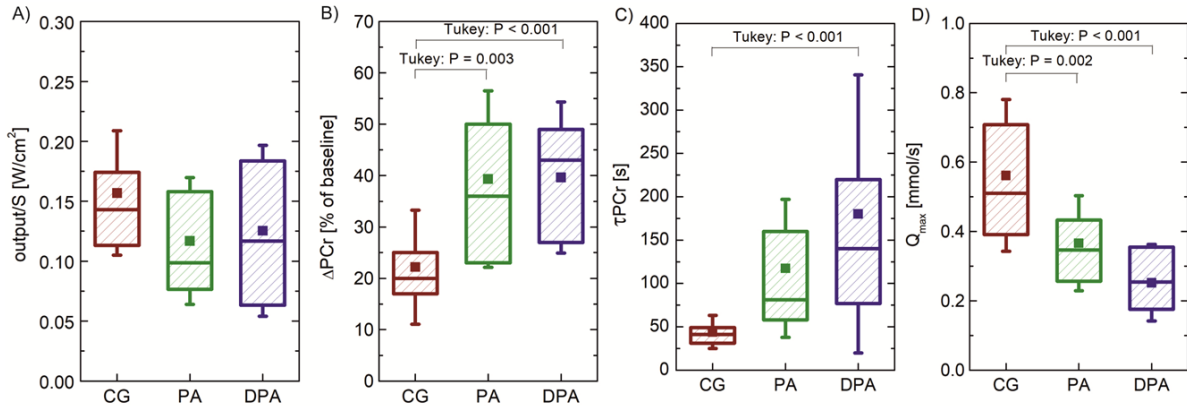


Table 1.— Anthropomorphic and main clinical parameters (WD – walking distance to stop, TcpO_2 – Transcutaneous oxygen pressure,) healthy controls (CG) and patients in the PA, DPA groups.

parameters	CG	PA	DPA
number of subject	19	16	23
age [years]	65±9	71±7	68±8
BMI [kg/m^2]	26.5±3.9	26.2±4.6	30.4±3.3
male/female	11/8	10/6	21/2
Fountain classification	max I	IIa, IIb	IV
WD [m]	∞	400±310	-
ankle brachial index	-	0.58±0.17	-
TcpO_2 [mmHg]	-	-	26±10
duration of DM1 [years]	0	0	19±14
T1D/T2D*	0/0	0/0	4/19

*The ischemic patients with T1D and T2D were pooled based on the statistical analysis which confirmed no difference between MR results and other parameters in both groups.

Table 2.— Rest values of signal intensity ratios (means ± standard deviations) of phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (Pi), β -adenosine triphosphate (βATP), phosphodiesteres (PDE) to the sum of all signal intensities (P_{tot}) and pH in healthy controls (CG) and patients in the PA, DPA groups.

	N	PCr/Pi	PCr/ P_{tot}	Pi/ P_{tot}	$\beta\text{ATP}/P_{\text{tot}}$	PDE/ P_{tot}	pH
CG	19	8.6±1.6	0.51±0.03	0.060±0.009	0.088±0.014	0.070±0.018	7.019±0.026
PA	16	7.9±1.4	0.52±0.02	0.067±0.012	0.083±0.009	0.071±0.018	7.046±0.030
DPA	23	5.5±2.0	0.45±0.06	0.093±0.037	0.077±0.013	0.085±0.021	7.052±0.031

significant difference $p < 0.05$ between marked groups by Tukey test

Table 3. — Results of dynamic ^{31}P MRS. Maximal voluntary force (dynamometer values MVF), mean output normalized to the area gastrocnemius (P), drop of phosphocreatine during exercise (ΔPCr), time constant of PCr recovery (τPCr), initial recovery rate of PCr (V_{PCr}), concentration of adenosine diphosphate (ADP_{end}), mitochondrial capacity (Q_{max}), and pH in the end exercise of CG, PA and DPA.

	N	MVF [Newton]	normalized output [Watt/cm ²]	ΔPCr [%]	τPCr [s]	V_{PCr} (mmol/s)	Q_{max} (mmol/s)	pH _{end}
CG	19	450±140	0.16±0.05	22±11	44±19	0.27±0.17	0.57±0.24	7.034±0.036
PA	16	380±170	0.12±0.05	39±17	117±80	0.19±0.07	0.37±0.14	6.873±0.187
DPA	23	*n.a.	0.13±0.07	41±14	198±173	0.13±0.09	0.25±0.11	6.835±0.238

Significant difference $p < 0.05$ between marked groups by ANOVA (Tukey test); *the measurement was considered no ethical.

Neimpaktované publikace
vázající se k tématu dizertační práce

Metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD – výsledky pilotní studie

Metabolic profile of liver transplant recipient with respect to development of NAFLD – results of a pilot study

I. Hejlová¹, M. Dezortová², P. Šedivý², M. Drobný², M. Hájek², M. Cahová³, H. Daňková³, E. Sticová⁴, V. Lánská⁵, P. Trunečka⁶

¹Klinika hepatogastroenterologie, Transplantcentrum, IKEM, Praha

²Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie, Komplement, IKEM, Praha

³Centrum experimentální medicíny, IKEM, Praha

⁴Pracoviště klinické a transplantační patologie, Transplantcentrum, IKEM, Praha

⁵Lékařská statistika, IKEM, Praha

⁶Transplantcentrum, IKEM, Praha

Souhrn: Cíl: Nealkoholická steatóza (NAFLD) jaterního štěpu se vyskytuje u 31–56 % pacientů po transplantaci jater, její výskyt narůstá s dobou od transplantace. Cílem naší prospektivní studie byla analýza metabolického profilu pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD. **Metody:** Pilotní část prospektivní studie zahrnuje 31 pacientů 1–16 let po transplantaci jater, kteří podstoupili protokolární biopsii jater. Provedli jsme laboratorní vyšetření glukózového a lipidového metabolismu, ¹H MR spektroskopii a zobrazováním jsme stanovili obsah tuku v játrech a objem podkožního a viscerálního tuku. Metodou dynamické ³¹P MR spektroskopie jsme v musculus gastrocnemius stanovili maximální mitochondriální kapacitu. **Výsledky:** V biopsii jater jsme prokázali steatózu stupně 2–3 u 12 (38,7 %) pacientů, steatózu stupně 1 u 13 (41,9 %) pacientů a šest (19,4 %) pacientů bylo bez steatózy. Se stupněm steatózy pozitivně koreloval body mass index ($p = 0,002$), obvod pasu ($p = 0,004$), objem podkožního ($p = 0,023$) i viscerálního tuku ($p = 0,034$), výskyt metabolického syndromu ($p = 0,006$), lačná glykemie ($p = 0,043$), glykovaný hemoglobin ($p = 0,048$) a C-peptid ($p = 0,026$). Podíl kuřáků ve skupině se steatózou byl významně menší ($p = 0,001$) než ve skupině bez steatózy. Vzestup HOMA indexu ($p = 0,10$) a pokles QUICKI indexu ($p = 0,10$) nedosahovaly statistické významnosti. Se vzrůstajícím stupněm steatózy jsme pozorovali trend k poklesu maximální mitochondriální kapacity kosterního svalstva měřené ³¹P MR spektroskopii, ale rozdíly nebyly statisticky signifikantní ($p = 0,23$). Histologický stupeň steatózy dobře koreloval se stupněm steatózy stanoveným ¹H MR spektroskopii ($p = 0,0002$). **Závěry:** V pilotní studii jsme identifikovali významné klinické, laboratorní a MR parametry, které mohou přispět k predikci NAFLD u pacientů po transplantaci jater.

Klíčová slova: inzulinová rezistence – magnetická rezonance – metabolický syndrom – mitochondriální kapacita – NAFLD – transplantace jater

Summary: Aims: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) of the liver graft occurs in 31–56% liver transplant recipients, its prevalence increases with time after transplantation. The aim of our prospective study was to analyze metabolic profile of liver transplant recipients with respect to development of NAFLD. **Methods:** The pilot part of the prospective study included 31 patients 1–16 years after liver transplantation who underwent a protocol liver biopsy. We performed laboratory investigation of glucose and lipid metabolism, determined liver fat content and subcutaneous and visceral fat volume by ¹H MR spectroscopy and imaging. We determined maximal mitochondrial capacity in musculus gastrocnemius by dynamic ³¹P MR spectroscopy. **Results:** In liver biopsy, we found steatosis grade 2–3 in 12 (38.7%) patients, steatosis grade 1 in 13 (41.9%) patients and six (19.4%) patients were without steatosis. With increasing steatosis grade, a positive correlation was found in BMI ($p = 0.002$), waist circumference ($p = 0.004$), subcutaneous fat volume ($p = 0.023$), visceral fat volume ($p = 0.034$), occurrence of metabolic syndrome ($p = 0.006$), fasting glucose ($p = 0.043$), glycated haemoglobin ($p = 0.048$) and C-peptide ($p = 0.026$). The proportion of smokers was lower in patients with steatosis than without steatosis ($p = 0.001$). The increase in HOMA index ($p = 0.10$) and decrease in QUICKI index ($p = 0.10$) did not reach statistical significance. With increasing steatosis grade we found a trend towards decrease of the maximal mitochondrial capacity of skeletal muscles measured by ³¹P MR spectroscopy, but the differences were not statistical significant ($p = 0.23$). Histological grade of steatosis correlated well with steatosis grade measured by ¹H MR spectroscopy ($p = 0.0002$). **Conclusions:** In this pilot study, we identified significant clinical, laboratory and MR parameters which can contribute to prediction of NAFLD in liver transplant recipients.

Key words: insulin resistance – magnetic resonance – metabolic syndrome – mitochondrial capacity – NAFLD – liver transplantation

Úvod

Prevalence nealkoholické steatózy jater (NAFLD) se v obecné populaci západních zemí pohybuje mezi 19 a 31 % [1,2]. Pacienti s NAFLD mají dle rozsáhlých studií vyšší celkovou mortalitu [3,4]. NAFLD je spojena se znaky metabolického syndromu zahrnujícími abdominální obezitu, inzulinovou rezistenci nebo diabetes mellitus 2. typu (DM2T) a aterogenní dyslipidemií, k rozvoji NAFLD významně predisponují i genetické faktory [5]. Tématu prevalence, rizikových faktorů a významu steatózy po transplantaci jater jsme se věnovali v rozsáhlé retrospektivní epidemiologické studii hodnotící celkem 2 360 potransplantačních biopsií u 548 pacientů po ortotopické transplantaci jater (OLT – orthotopic liver transplantation) [6]. Steatóza jaterního štěpu ($\geq 5\%$) postihovala 56,4 % pacientů, u 10,4 % pacientů byla diagnostikována steatohepatitida (NAS ≥ 5). Výskyt steatózy narůstal s dobou od OLT (30,3 % v jednom roce, 47,6 % v 10 letech). Nezávislými před-/peritransplantačními rizikovými faktory steatózy nad 33 % byly alkoholická cirhóza, vysoký body mass index (BMI) a nízká sérová alkalická fosfatáza, iniciálně podávaný mykofenolát mofetil měl protektivní účinek. Nezávislými potransplantačními rizikovými faktory byly vysoký BMI, vysoký obsah triglyceridů v séru, konzumace alkoholu, přítomnost DM2T a nízký obsah kreatininu. Pacienti se steatózou nad 33 % měli tendenci k horšímu dlouhodobému přežívání [6]. Retrospektivní design studie neumožňoval hodnocení dalších potenciálně významných faktorů spojených s výskytem NAFLD, zejména stupně inzulinové rezistence.

Zlatým standardem měření inzulinové rezistence je metoda hyperinzulinického euglykemického clampu, která je však nákladná a časově i organizačně značně náročná. Pro účely větších epidemiologických studií lze bazální inzulinovou rezistenci snadno hodnotit pomocí HOMA (homeostasis assessment

model) indexu nebo QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index), které vycházejí z hodnot lačné inzulinemie a lačné glykemie, nebo z poměrů lačná glykemie/inzulinemie nebo 1/lačná inzulinemie. Markerem endogenní sekrece inzulinu je C-peptid, jehož hladina není ovlivněna exogenně podávaným inzulinem [7,8].

U pacientů s DM2T a inzulinovou rezistencí byl popsán pokles v energetickém metabolismu kosterního svalstva [9,10]. Mitochondriální oxidativní fosforylaci lze *in vivo* hodnotit metodou ^{31}P MR spektroskopie při zátěži, při které se mimo jiné měří hodnota rychlosti syntézy fosfokreatinu (V_{PCr}), a lze vypočítat maximální mitochondriální kapacitu (Q_{max}) [9–11].

Kromě jaterní biopsie lze stupeň jaterní steatózy hodnotit i metodou ^1H MR spektroskopie [12], jejíž výhodou je neinvazivita a použitelnost i v rozsáhlých epidemiologických studiích. Jak jsme prokázali v naší předchozí práci, je tato metoda vhodná i pro hodnocení obsahu tuku v transplantaovaných játrech [13].

Cílem této pilotní prospektivní studie bylo zhodnotit metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k přítomnosti NAFLD hodnocené histologicky a identifikovat faktory vhodné pro predikci potransplantační NAFLD.

Metodika

Do studie byli zahrnuti pacienti, kteří podstoupili protokolární jaterní biopsii v rámci standardního sledování po OLT. Studie nezahrnovala pacienty s rekurencí hepatitidy C ve štěpu, pacienty s aktuálním známým či předpokládaným abúzem alkoholu a pacienty léčené prednisonem v dávce nad 5 mg/den. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií a s MR vyšetřením.

Vzorek biopsie jater byl získán Menghiniho technikou a zpracován standardním způsobem v naší laboratoři. Biopsie byly klasifikovány dle

Kleinerova [14] a steatóza byla rozdělena dle procenta postižených hepatocytů na stupeň 0 u $< 5\%$, stupeň 1 u 5–33 %, stupeň 2 u 33,1–66 % a stupeň 3 u $> 66\%$.

V den biopsie byly pacientům odebrány vzorky krve po celonočním lačnění (min. 8 hod) a stanoveny parametry glukózového a lipidového metabolismu.

V den biopsie po krátkodobém lačnění (min. 3 hod) jsme technikou MR získali celkový objem břicha, objem podkožního a viscerálního tuku. Metodou ^1H MR spektroskopie jsme stanovili procento objemu tuku v játrech, toto měření bylo prováděno ve třech standardizovaných částech jater.

Následujícího dne podstoupili pacienti po celonočním lačnění (min. 8 hod) vyšetření dynamickou ^{31}P MR spektroskopii. Při ní pacienti prováděli planární flexi a extenzi jedné končetiny na mechanickém ergometru vlastní výroby s pracovní zátěží cca 10 kg. Po 6 min cvičení následovalo 6 min klidu, kdy byly opakovaně měřeny intenzity signálů z oblasti musculus gastrocnemius odpovídající signálům anorganického fosfátu, fosfokreatinu (PCr), fosfodiesterů a ATP a z nich byla vypočtena iniciální V_{PCr} a Q_{max} . Vyšetření se provádělo na 3T celotělovém tomografu Trio (Siemens, Německo).

Statistické hodnocení

Kategorické proměnné jsou udávány v absolutních počtech a procentech, spojitě proměnné jako průměr a směrodatná odchylka. Rozdíly mezi spojitými proměnnými byly hodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA – analysis of variance) nebo Kruskal-Wallisova testu, rozdíly v procentuálním zastoupení byly porovnány pomocí Pearsonova χ^2 testu. Všechny proměnné byly porovnávány mezi třemi skupinami pacientů, se steatózou stupně 2–3, 1 a 0. Vzhledem k malému počtu pacientů v jednotlivých skupinách nebylo možné provést multivariátní analýzu. Spearmanův ko-

Tab. 1. Rozdíly klinických parametrů a užívané medikace mezi skupinami pacientů s různým stupněm steatózy v biopsii jater.

Tab. 1. Differences in clinical parameters and medication between groups of patients with various steatosis grade on the liver biopsy.

Klinické parametry	Steatóza stupeň 2 + 3 (n = 12)	Steatóza stupeň 1 (n = 13)	Steatóza stupeň 0 (n = 6)	p
	n (%) / /průměr ± SD	n (%) / /průměr ± SD	n (%) / /průměr ± SD	
muži	8 (66,7)	6 (46,2)	3 (50,0)	0,57
indikace k transplantaci jater				
alkoholická	5 (41,7)	4 (30,8)	2 (33,3)	0,09
HBV + HCV	2 (16,7)	3 (23,1)	1 (16,7)	
biliární	4 (33,3)	0 (0,0)	1 (16,7)	
ostatní	1 (8,3)	6 (46,2)	2 (33,3)	
doba biopsie od transplantace jater (roky)	5,03 ± 3,84	6,06 ± 4,70	5,91 ± 3,77	0,80
věk v době biopsie (roky)	53,9 ± 7,6	59,6 ± 8,8	49,7 ± 13,2	0,11
BMI (kg/m ²)	29,82 ± 4,43	29,04 ± 5,33	21,46 ± 2,12	0,002
obvod pasu (cm)	109,67 ± 13,44	103,00 ± 16,06	81,75 ± 9,14	0,004
konzumace alkoholu	1 (8,3)	1 (7,7)	0 (0,0)	0,77
kouření	1 (8,3)	0 (0,0)	4 (66,7)	0,001
hypertenze	7 (58,3)	11 (84,6)	1 (16,7)	0,018
diabetes mellitus 2. typu	6 (50,0)	6 (46,2)	1 (16,7)	0,45
metabolický syndrom	9 (75,0)	9 (69,2)	0 (0,0)	0,006
Medikace				
tacrolimus/cyklosporin A	11/0 (91,7/0,0)	11/1 (84,6/7,7)	6/0 (100,0/0)	0,74
mykofenolát mofetil/sirolimus + everolimus	9/1 (75,0/8,3)	7/2 (53,9/15,4)	5/1 (83,3/16,7)	0,40
kortikoidy	3 (25,0)	6 (46,2)	0 (0,0)	0,11
statin	1 (8,3)	3 (23,1)	1 (16,7)	0,61
inzulin/perorální antidiabetika	3/2 (25,0/16,7)	3/0 (23,1/0,0)	1/0 (16,7/0,0)	0,44
BMI – body mass index, HBV – virová hepatitida B, HCV – virová hepatitida C, SD – směrodatná odchylka				

relační koeficient byl použit k měření závislosti dvou spojitých veličin. Za statisticky významnou byla použita hodnota $p < 0,05$. Pro statistické hodnocení jsme použili JMP 10.0.0 statistický software, SAS Institute Inc. 2012.

Výsledky

V pilotní studii bylo hodnoceno 31 pacientů, 17 (54,8 %) mužů, průměrného věku $55,5 \pm 9,6$ let, v průměru $5,7 \pm 4,0$ let (rozmezí 1–16 let) po OLT. Indikací k transplantaci jater byla alkoholická cirhóza u 11 (35,5 %) pacientů, virová hepatitida B nebo C u 6 (19,4 %) pacientů, biliární cirhóza u 5 (16,1 %) pacientů, jiná diagnóza u 9 (29,0 %) pacientů. Průměrný BMI v době biopsie byl $27,9 \pm 5,4$. V době biopsie mělo 19 (61,3 %) pacientů hypertenzi a 13 pacientů (41,9 %) DM2T. Základním imunopresivem byl tacrolimus u 28 (90,3 %) pacientů, cyklosporin u 1 (3,2 %) pacienta a sirolimus u 2 (6,5 %) pacientů. Devět (29,0 %) pacientů bylo léčeno prednisonem v dávce 1,25–5,0 mg/den.

Histologickým zhodnocením vzorku jaterní biopsie byla u jednoho (3,2 %) pacienta přítomna steatóza stupně 3, u 11 (35,5 %) steatóza stupně 2, u 13 (41,9 %) pacientů steatóza stupně 1 a šest pacientů (19,4 %) bylo bez steatózy (stupeň 0). Klinická (tab. 1), laboratorní (tab. 2), histologická (tab. 2) a MR data (tab. 3) jsme porovnávali mezi třemi skupinami pacientů, pacienty se steatózou stupně 2–3, stupně 1 a stupně 0.

S rostoucím stupněm steatózy pozitivně koreloval BMI ($p = 0,002$), obvod pasu ($p = 0,004$), objem podkožního ($p = 0,023$) i viscerálního tuku ($p = 0,034$), výskyt metabolického syn-

drózy ($p = 0,006$), krevní tlak ($p = 0,018$), diabetes mellitus 2. typu ($p = 0,45$) a metabolický syndrom ($p = 0,006$). U pacientů s steatózou stupně 2–3 bylo více indikací k transplantaci jater (alkoholická cirhóza u 5 (41,7 %), HBV + HCV u 2 (16,7 %), biliární u 4 (33,3 %) a ostatní u 1 (8,3 %) pacientů) než u pacientů s steatózou stupně 1 (alkoholická cirhóza u 4 (30,8 %), HBV + HCV u 3 (23,1 %), biliární u 0 (0,0 %) a ostatní u 6 (46,2 %) pacientů) a u pacientů s steatózou stupně 0 (alkoholická cirhóza u 2 (33,3 %), HBV + HCV u 1 (16,7 %), biliární u 1 (16,7 %) a ostatní u 2 (33,3 %) pacientů).

S rostoucím stupněm steatózy pozitivně koreloval BMI ($p = 0,002$), obvod pasu ($p = 0,004$), objem podkožního ($p = 0,023$) i viscerálního tuku ($p = 0,034$), výskyt metabolického syn-

Tab. 2. Rozdíly laboratorních a histologických parametrů mezi skupinami pacientů s různým stupněm steatózy v biopsii jater.

Tab. 2. Differences in laboratory and histological parameters between groups of patients with various steatosis grade on the liver biopsy.

Laboratorní parametry	Steatóza stupeň 2 + 3 (n = 12)	Steatóza stupeň 1 (n = 13)	Steatóza stupeň 0 (n = 6)	p
	n (%) / průměr ± SD	n (%) / průměr ± SD	n (%) / průměr ± SD	
celkový bilirubin (μmol/l)	17,51 ± 13,47	14,48 ± 4,46	22,95 ± 14,51	0,48
AST (μkat/l)	0,59 ± 0,58	0,50 ± 0,31	0,44 ± 0,18	0,91
ALT (μkat/l)	0,73 ± 0,51	0,61 ± 0,33	0,66 ± 0,60	0,54
ALP (μkat/l)	1,43 ± 0,53	1,44 ± 0,58	1,41 ± 0,45	0,97
GGT (μkat/l)	1,18 ± 1,46	0,77 ± 0,51	0,51 ± 0,36	0,29
celkový cholesterol (mmol/l)	5,07 ± 1,60	5,07 ± 0,92	4,77 ± 0,84	0,80
HDL cholesterol (mmol/l)	1,06 ± 0,32	1,29 ± 0,35	1,33 ± 0,26	0,17
triglyceridy (mmol/l)	2,20 ± 2,09	1,44 ± 0,57	1,07 ± 0,38	0,09
neesterifikované mastné kyseliny (mmol/l)	0,56 ± 0,26	0,42 ± 0,17	0,47 ± 0,17	0,31
glykemie nalačno (mmol/l)	8,30 ± 4,41	5,98 ± 1,16	5,35 ± 0,79	0,043
HbA _{1c} (mmol/mol)	44,50 ± 9,39	40,23 ± 7,65	34,83 ± 3,97	0,048
C-peptid (nmol/l)	1,34 ± 0,60	1,00 ± 0,50	0,64 ± 0,25	0,026
inzulinemie nalačno (mIU/l)	15,18 ± 9,44	15,86 ± 28,35	6,08 ± 3,51	0,13
1/inzulinemie nalačno (mIU/l)	0,15 ± 0,19	0,14 ± 0,06	0,21 ± 0,11	0,13
glukóza (mg/dl)/inzulinemie nalačno (μIU/ml)	29,24 ± 60,56	15,22 ± 8,42	19,59 ± 9,33	0,30
HOMA	5,46 ± 5,01	4,82 ± 9,77	1,43 ± 0,88	0,10
QUICKI	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,37 ± 0,04	0,10
Histologické znaky jaterní biopsie				
zánět stupeň 0/1/2	0/6/5 (0,0/54,6/45,4)	1/8/2 (9,1/72,7/18,2)	1/3/1 (20,0/60,0/20,0)	0,43
balonová degenerace stupeň 0/1/2	2/7/2 (18,2/64,6/18,2)	7/4/0 (63,6/36,4/0,0)	5/0/0 (100,0/0,0/0,0)	0,023
fibróza stupeň 1/2/3/4	3/5/2/1 (27,3/45,5/18,2/9,1)	1/8/1/1 (9,1/72,7/9,1/9,1)	1/2/2/0 (20,0/40,0/40,0/0,0)	0,65
ALP – alkalická fosfatáza, ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza, GGT – gamaglutamyltransferáza, HbA _{1c} – glykovaný hemoglobin, HDL – high density lipoprotein, SD – směrodatná odchylka, HOMA – homeostasis assessment model, QUICKI – quantitative insulin sensitivity check index				

Tab. 3. Rozdíly MR parametrů mezi skupinami pacientů s různým stupněm steatózy v biopsii jater.

Tab. 3. Differences in MR parameters between groups of patients with various steatosis grade on the liver biopsy.

Klídivé MR parametry	Steatóza stupeň 2 + 3 (n = 12)	Steatóza stupeň 1 (n = 13)	Steatóza stupeň 0 (n = 6)	p
	průměr ± SD	průměr ± SD	průměr ± SD	
celkový objem břicha (l)	21,80 ± 4,84	19,61 ± 4,61	14,31 ± 3,10	0,022
objem podkožního tuku (l)	7,71 ± 2,29	6,49 ± 2,19	3,61 ± 2,34	0,033
objem viscerálního tuku (l)	7,04 ± 2,01	6,06 ± 2,70	3,58 ± 1,27	0,030
objem tuku jater dle ¹ H MR spektroskopie (%)	8,46 ± 4,70	2,61 ± 1,42	0,78 ± 0,37	0,0002
Dynamická ³¹P MR spektroskopie svalů				
V _{PCr} (mM/s)	0,32 ± 0,17	0,39 ± 0,20	0,45 ± 0,16	0,33
Q _{max} (mM/s)	0,61 ± 0,21	0,70 ± 0,25	0,80 ± 0,17	0,23
MR – magnetická rezonance, Q _{max} – maximální mitochondriální kapacita, SD – směrodatná odchylka, V _{PCr} – časová konstanta regenerace fosfokreatinu po zátěži				

dromu ($p = 0,006$), lačná glykemie ($p = 0,043$), glykovaný hemoglobin ($p = 0,048$) a C-peptid ($p = 0,026$). Ve skupině se steatózou byl menší podíl kuřáků ($p = 0,001$). Mezi skupinami nebyly rozdíly v užívané imunopresii a v hodnotách jaterních testů.

Vzestup HOMA indexu ($p = 0,10$), pokles QUICKI ($p = 0,10$) a vzestup obsahu triglyceridů v séru ($p = 0,09$) nedosahovaly statistické významnosti.

Se vzrůstajícím stupněm steatózy jsme pozorovali trend k poklesu maximální mitochondriální kapacity (Q_{max}) lýtkových svalů měřené ^{31}P MR spektroskopii, ale rozdíly nebyly statisticky významné ($p = 0,23$). Histologický stupeň steatózy dobře koreloval se stupněm steatózy stanoveným 1H MR spektroskopii ($p = 0,0002$).

Z histologických parametrů s rostoucím stupněm steatózy stoupal stupeň balonové degenerace ($p = 0,023$), nelíšil se stupeň zánětu nebo fibrózy.

V tab. 4 jsou uvedeny Spearmanovy korelační koeficienty závislosti mezi objemem jaterního tuku stanoveného 1H MR spektroskopii a parametry obezity, glukózového metabolismu/inzulinové rezistence a dynamické ^{31}P MR spektroskopie. Z parametrů obezity nejlépe s objemem jaterního tuku koreloval objem viscerálního tuku a obvod pasu, dále BMI a celkový objem břicha. Z parametrů glukózového metabolismu/inzulinové rezistence objem jaterního tuku koreloval s lačnou glykemií, glykovaným hemoglobinem a C-peptidem. Korelace mezi objemem jaterního tuku a maximální mitochondriální kapacitou hodnocenou dynamickou ^{31}P MR spektroskopii nebyla statisticky významná.

Diskuze a závěr

V naší předchozí retrospektivní studii [6] jsme prokázali, že steatóza jaterního štěpu se týká velkého počtu pacientů po transplantaci jater (56,4 %) a její výskyt narůstá s dobou od transplantace (30,3 % v jednom roce; 47,6 % v 10 letech). Prospek-

tivní studií navazujeme na předchozí výsledky s cílem zpřesnit metabolický profil pacientů ve vztahu k výskytu NAFLD, výsledky pilotní části zahrnující 31 pacientů po OLT předkládáme v této práci.

Výskyt NAFLD jaterního štěpu stanovený histologicky koreloval dle očekávání s abdominální obezitou, množstvím viscerálního tuku a výskytem metabolického syndromu. Z laboratorních parametrů nejlépe se stupněm steatózy korelovaly lačná glykemie, glykovaný hemoglobin a C-peptid. C-peptid je markerem endogenní sekrece inzulínu, který není ovlivněn exogenně podávaným inzulínem, takže ve skupině pacientů s častým diabetem léčeným inzulínem dává přesnější výsledky než inzulinemie [7].

Z indexů inzulinové rezistence/senzitivity měly v našem souboru hraniční významnost HOMA a QUICKI, ostatní indexy inzulinové rezistence (lačná glykemie/inzulinemie nebo $1/lačná$ inzulinemie) nebyly v našem souboru statisticky významné. Na rozdíl od literatury jsme nepozorovali vliv stupně steatózy na hladinu neesterifikovaných mastných kyselin [15,16].

S rostoucím stupněm steatózy klesala maximální mitochondriální kapacita kosterního svalstva měřená ^{31}P MR spektroskopii, nicméně tento rozdíl nebyl v našem malém souboru statisticky významný. Některé studie však naznačují, že změny v energetickém metabolismu kosterního svalstva se mohou vyskytovat v časně fázi patofyziologie DM2T a inzulinové rezistence [9,10].

V souladu s literaturou dobře koreloval histologický stupeň steatózy s objemem jaterního tuku stanoveným 1H MR spektroskopii, což dále potvrzuje, že je tato metoda vhodná ke stanovení stupně steatózy jaterního štěpu [12,13].

Stupeň steatózy v naší studii nekoreloval s hodnotou jaterních testů a dokonce i většina pacientů se steatózou nad 33 % měla hodnoty jaterních testů

Tab. 4. Korelace mezi objemem jaterního tuku stanoveným 1H MR spektroskopii a parametry obezity, insulinové rezistence a dynamické ^{31}P MR spektroskopie.

Tab. 4. Correlation between liver fat volume measured by 1H MR spectroscopy and parameters of obesity, insulin resistance and dynamic ^{31}P MR spectroscopy.

Parametr	Spearman ρ	p
BMI	0,4249	0,034
obvod pasu	0,496	0,012
glykemie nalačno	0,5506	0,004
HbA _{1c}	0,3528	0,08
C-peptid	0,4045	0,045
inzulinemie nalačno	0,2936	0,15
HOMA	0,3013	0,14
QUICKI	-0,3013	0,14
MR		
celkový objem břicha	0,4152	0,039
objem podkožního tuku	0,3198	0,12
objem viscerálního tuku	0,5342	0,006
V_{PCr}	-0,2035	0,35
Q_{max}	-0,1728	0,43
BMI – body mass index, HbA _{1c} – glykovaný hemoglobin, HOMA – homeostasis assessment model, QUICKI – quantitative insulin sensitivity check index, MR – magnetická rezonance, Q_{max} – maximální mitochondriální kapacita, V_{PCr} – časová konstanta regenerace fosfokreatinu po zátěži		

v rámci normy, což zdůrazňuje nutnost hledání jiných parametrů, které mohou steatózu predikovat.

Byť má většina imunopresiv podávaných po orgánových transplantacích nežádoucí metabolické účinky na výskyt hyperlipoproteinemie a DM2T [17], v naší pilotní studii jsme nepozorovali vliv jednotlivých imunopresiv na stupeň steatózy jaterního štěpu. Příčinou může být delší časový odstup od transplantace u většiny nemocných

(v průměru 5,7 let), kdy je snaha dávky imunosupresiv minimalizovat vždy, je-li to možné.

V naší pilotní prospektivní studii jsme prokázali, že histologický stupeň steatózy koreluje s BMI, obvodem pasu, objemem podkožního i viscerálního tuku, výskytem metabolického syndromu, lačnou glykemií, glykovaným hemoglobinem a C-peptidem. Ve skupině se steatózou byl menší podíl kuřáků. Vzestup HOMA indexu a pokles QUICKI nedosahovaly statistické významnosti. Se vzrůstajícím stupněm steatózy jsme pozorovali trend k poklesu maximální mitochondriální kapacity kosterního svalstva měřené ^{31}P MR spektroskopii, ale rozdíly nebyly statisticky signifikantní. Histologický stupeň steatózy dobře koreloval se stupněm steatózy stanoveným ^1H MR spektroskopii. V dalším výzkumu je třeba pokračovat prospektivní studii na větším souboru pacientů.

Literatura

1. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42(1): 44–52.
2. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40(6): 1387–1395.
3. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129(1): 113–121.
4. Söderberg C, Stål P, Askling J et al. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010; 51(2): 595–602. doi: 10.1002/hep.23314.
5. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic factors that affect risk of alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2016; 150(8): 1728–1744. doi: 10.1053/j.gastro.2016.01.037.
6. Hejlova I, Honsova E, Sticova E et al. Prevalence and risk factors of steatosis after liver transplantation and patient outcomes. *Liver Transpl* 2016; 22(5): 644–655. doi: 10.1002/lt.24393.
7. Wallace TM, Matthews DR. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 2002; 19(7): 527–534.
8. Muniyappa R, Lee S, Chen H et al. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(1): E15–E26.
9. Petersen KF, Dufour S, Befroy D et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350(7): 664–671.
10. Scheuermann-Freestone M, Madsen PL, Manners D et al. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation* 2003; 107(24): 3040–3046.
11. Šedivý P, Kipfelsberger MC, Dezortová M et al. Dynamic ^{31}P MR spectroscopy of plantar flexion: influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys* 2015; 42(4): 1678–1689. doi: 10.1118/1.4914448.
12. Thomsen C, Becker U, Winkler K et al. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 1994; 12(3): 487–495.
13. Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D et al. MR spectroscopy as a tool for in vivo determination of steatosis in liver transplant recipients. *MAGMA* 2011; 24(5): 297–304. doi: 10.1007/s10334-011-0264-9.
14. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6): 1313–1321.
15. Zhang J, Zhao Y, Xu C et al. Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Sci Rep* 2014; 4: 5832. doi: 10.1038/srep05832.
16. Larter CZ, Yeh MM, Haigh WG et al. Hepatic free fatty acids accumulate in experimental steatohepatitis: Role of adaptive pathways. *J Hepatol* 2008; 48(4): 638–647. doi: 10.1016/j.jhep.2007.12.011.
17. Sorice GP, Muscogiuri G, Mezza T et al. Metabolic syndrome in transplant patients: an academic or a health burden? *Transplant Proc* 2011; 43(1): 313–317. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.09.099.

Studie vznikla za podpory grantů AZV MZČR 15-26906A a IGA MZČR NT11275-6.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Doručeno/Submitted: 11. 7. 2016

Přijato/Accepted: 1. 8. 2016

*MUDr. Mgr. Irena Hejlová
Klinika hepatogastroenterologie
Transplantcentrum, IKEM
Václavská 1958/9
140 21 Praha 4
irhe@ikem.cz*

Syndrom diabetické nohy: význam MR spektroskopie lýtkových svalů pro hodnocení končetinové ischemie a efektu revaskularizace

Andrea Němcová¹, Michal Dubský¹, Alexandra Jirkovská¹, Petr Šedivý², Miloslav Drobný², Milan Hájek², Monika Dezortová², Robert Bém¹, Vladimíra Fejfarová¹, Anna Pyšná¹

¹Centrum diabetologie IKEM, Praha

²Oddělení výpočetní tomografie, magnetické rezonance a klinické a experimentální spektroskopie Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie IKEM, Praha

Souhrn

Úvod: Standardní metodou pro posouzení efektu revaskularizace u pacientů se syndromem diabetické nohy (SDN) a kritickou končetinovou ischemií (critical limb ischemia – CLI) je měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂). ³¹P MR spektroskopie (MRS) je metoda umožňující hodnotit energetický metabolismus svalu, který může být u pacientů s diabetem a jeho komplikacemi porušený. **Cílem** naší studie bylo porovnat MRS lýtkových svalů u pacientů se SDN a CLI se zdravými dobrovolníky a posoudit přínos této metody při hodnocení efektu revaskularizace. **Metodika:** Do studie bylo zařazeno 34 pacientů se SDN a CLI, z nichž 27 podstoupilo v období let 2013–2016 na našem pracovišti revaskularizační výkon. Autologní buněčnou terapií (autologous cell therapy – ACT) bylo léčeno 15 pacientů, perkutánní transluminální angioplastika (PTA) byla provedena u 12 pacientů. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 19 zdravých osob. Referenční metodou pro posouzení končetinové ischemie a efektu revaskularizace bylo měření TcPO₂. MRS byla provedena za použití celotělového 3T MRS systému 1 den před a 3 měsíce po revaskularizaci. Pacienti byli vyšetřeni v poloze na zádech s cívkou fixovanou pod m. gastrocnemius. MRS parametry byly stanoveny během klidové a zátěžové fáze. Klidové MRS parametry oxidativního metabolismu (fosfokreatin – PCr, anorganický fosfát – Pi, fosfodiester – PDE a adenosintrifosfát – ATP), zátěžové MRS parametry (recovery time PCr – τPCr a mitochondriální kapacita – Q_{max}) a pH byly porovnány mezi pacienty a zdravými kontrolami. Tytéž parametry byly porovnány u pacientů před revaskularizací a 3 měsíce po revaskularizaci. **Výsledky:** Pacienti se SDN a CLI měli signifikantně nižší PCr/Pi (p < 0,001), signifikantně vyšší Pi a pH (p < 0,01), signifikantně nižší Q_{max} a prodloužený τPCr (p < 0,001) ve srovnání se zdravými kontrolami. Efekt revaskularizace byl potvrzen signifikantním zlepšením hodnot TcPO₂ po 3 měsících (z 26,4 ± 11,7 na 39,7 ± 17,7 mm Hg, p < 0,005), avšak klidové MRS parametry se po revaskularizaci signifikantně nezměnily, pouze v individuálních případech došlo ke zlepšení zátěžových MRS parametrů. Nepozorovali jsme korelaci mezi změnami MRS parametrů a vzestupem TcPO₂ po revaskularizaci. **Závěr:** Výsledky naší pilotní studie ukazují porušený energetický metabolismus lýtkových svalů u pacientů se SDN a CLI ve srovnání se zdravými kontrolami. V individuálních případech jsme po revaskularizaci pozorovali zlepšení zátěžových MRS parametrů. Přínos MRS lýtkových svalů pro hodnocení efektu revaskularizace je nutno ověřit na větším počtu pacientů během dlouhodobějšího sledování.

Klíčová slova: buněčná terapie – kritická končetinová ischemie – MR spektroskopie – syndrom diabetické nohy

Diabetic foot syndrome: importance of calf muscles MR spectroscopy in the assessment of limb ischemia and effect of revascularization

Summary

Aim: The standard method for assessment of effect of revascularization in patients with diabetic foot (DF) and critical limb ischemia (CLI) is transcutaneous oxygen pressure (TcPO₂). Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (³¹P MRS) enables to evaluate oxidative muscle metabolism that could be impaired in patients with diabetes and its complications. The aim of our study was to compare MRS of calf muscle between patients with DF and CLI and healthy controls and to evaluate the contribution of MRS in the assessment of the effect of revascularization. **Methods:** Thirty-four diabetic patients with DF and CLI treated either by autologous cell therapy (ACT; 15 patients) or percutaneous transluminal angioplasty (PTA; 12 patients) in our foot clinic during 2013–2016 and 19 healthy controls were included into the study. TcPO₂ measurement was used as a standard method of non-invasive evaluation of

limb ischemia. MRS examinations were performed using the whole-body 3T MR system 1 day before and 3 months after the procedure. Subjects were examined in a supine position with the coil fixed under the m. gastrocnemius. MRS parameters were obtained at rest and during the exercise period. Rest MRS parameters of oxidative muscle metabolism such as phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (Pi), phosphodiesteres (PDE), adenosine triphosphate (ATP), dynamic MRS parameters such as recovery constant PCr (τ PCr) and mitochondrial capacity (Q_{max}), and pH were compared between patients and healthy controls, and also before and 3 months after revascularization. **Results:** Patients with CLI had significantly lower PCr/Pi ($p < 0.001$), significantly higher Pi and pH (both $p < 0.01$), significantly lower Q_{max} and prolonged τ PCr (both $p < 0.001$) in comparison with healthy controls. We observed a significant improvement in TcPO₂ at 3 months after revascularization (from 26.4 ± 11.7 to 39.7 ± 17.7 mm Hg, $p < 0.005$). However, the rest MRS parameters did not change significantly after revascularization. In individual cases we observed improvement of dynamic MRS parameters. There was no correlation between MRS parameters and TcPO₂ values. **Conclusion:** Results of our study show impaired oxidative metabolism of calf muscles in patients with CLI in comparison with healthy controls. We observed an improvement in dynamic MRS parameters in individual cases; this finding should be verified in a large number of patients during longer follow-up.

Key words: autologous cell therapy – critical limb ischemia – diabetic foot – MR spectroscopy

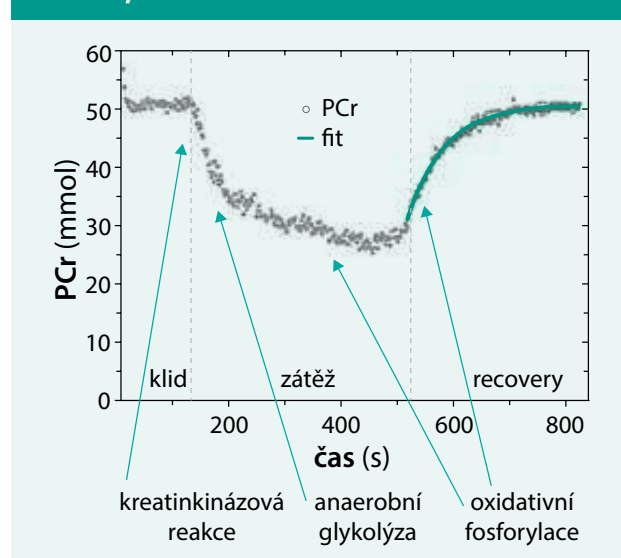
Úvod

Kritická končetinová ischemie (critical limb ischemia – CLI) je definována jako přetrvávající klidová bolest s přítomností ulcerace nebo gangrény v důsledku objektivně prokázané okluze tepen dolních končetin [1]. CLI je spojena s vysokým rizikem amputace končetiny i celkové mortality [2]. Diagnostika a terapie CLI u pacientů s diabetem je obtížná, protože často chybějí typické symptomy, jako je klidová bolest nebo klaudikace v důsledku periferní neuropatie a lokalizace postižení cév, které je u diabetiků převážně infrapopliteální [3]. Standardními léčebnými metodami CLI jsou chirurgická revaskularizace bypassem nebo perkutánní transluminální angioplastika (PTA) [4]. Pacienti s tzv. no-option CLI, kteří nejsou vhodní k standardní léčbě kvůli závažnému, technicky neřešitelnému cévnímu postižení nebo kvůli vysokému operačnímu riziku, mohou profitovat z léčby autologními kmenovými buňkami (autologous cell therapy – ACT) [5].

Standardní metodou pro hodnocení závažnosti ischemie a efektu revaskularizace je měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂), což je neinvazivní vyšetření odrážející tkáňovou perfuzi a oxygenaci [4,6]. Perspektivní metodou při hodnocení efektu revaskularizace je ³¹P MR spektroskopie (MRS) lýtkových svalů, která poskytuje informaci o změnách energetického svalového metabolismu zahrnujícího mitochondriální oxidativní fosforylaci, anaerobní glykolýzu a kreatinkinázoovou aktivitu (graf 1).

Principem ³¹P MRS je měření koncentrace metabolitů – fosfokreatinu (PCr), anorganického fosfátu (Pi), fosfodiesterů (PDE) a adenosintrifosfátu (ATP), které charakterizují svalový metabolismus především v klidu, a stanovení zátěžových MRS parametrů (poklesu PCr, mitochondriální kapacity – Q_{max} , recovery time PCr – τ PCr a změny pH), které popisují změny v energetickém metabolismu při svalové činnosti [7].

Graf 1. Kinetika fosfokreatinu během klidu, zátěže a recovery fáze



Tab. 1. Základní charakteristika pacientů se SDN a CLI

parametry	pacienti se SDN a CLI (n = 34)
věk (roky)	66,8 ± 6,9
pohlaví (% mužů)	91,2
typ diabetu (% pacientů s DM2T)	85,3
trvání diabetu (roky)	22,7 ± 15,2
glykovaný hemoglobin (mmol/mol)	58,1 ± 16,6
vstupní hodnota TcPO ₂ (mm Hg)	26,4 ± 11,7
angiografický nález (klasifikace dle Grazianiho)	4,1 ± 1,5
ischemická choroba srdeční (%)	44,1
renální selhání – dialýza (%)	17,6
hypertenze (%)	97,1

Metabolické parametry získané z ^{31}P MRS lýtkových svalů závisí na dodávce kyslíku do svalu, na celkové velikosti zátěže, na počtu mitochondrií a rychlosti enzymatických pochodů v nich probíhajících. Porušené cévní zásobení dolních končetin limituje oxidativní svalový metabolismus a vede k acidóze v důsledku anaerobní glykolýzy. U pacientů se symptomatickou ischemickou chorobou dolních končetin (ICHDK) byl pozorován prodloužený recovery time PCr, který je známkou zpožděného obnovení zásob energeticky bohatého fosfokreatinu [8,9]. Je známo, že rovněž diabetes a jeho komplikace (zejména neuropatie, mikroangiopatie a makroangiopatie) negativně ovlivňují svalový metabolismus; pacienti s diabetem mají např. sníženou mitochondriální kapacitu [10,11]. Přítomnost diabetu a aterosklerózy je také spojena s vyšším výskytem poškození mitochondriální DNA [12].

Cílem naší studie bylo porovnat parametry MRS lýtkových svalů mezi pacienty se syndromem diabetické nohy (SDN) a CLI a zdravými kontrolami a posoudit přínos této metody při hodnocení efektu revaskularizace.

Metody

Do studie bylo konsekutivně zařazeno 34 pacientů se SDN a CLI, z nichž 27 podstoupilo revaskularizační výkon na našem pracovišti (ACT bylo léčeno 15 pacientů, u 12 bylo provedeno PTA) v období od ledna roku 2013 do ledna roku 2017 (tab. 1). Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 19 zdravých dobrovolníků bez diabetu (průměrný věk $57,6 \pm 9,9$ let).

CLI byla definována hodnotou $\text{TcPO}_2 < 30$ mm Hg, angiograficky prokázanou významnou infrapopliteální stenózou, přítomností nehojících se defektů nebo ischemické bolesti v souladu s kritérii pro CLI TASC II [13]. Závažnost angiografických nálezů byla hodnocena pomocí Grazianioho klasifikace [14]. Pacienti léčení ACT podstoupili vyšetřovací protokol zahrnující podrobné onkologické a hematologické vyšetření popsané v naší předchozí studii [15]. Vyřazovacími kritérii pro buněčnou léčbu byla přítomnost zhoubného nádoru, těžké hematologické abnormality, hluboká žilní trombóza v posledních 6 měsících, neléčená proliferativní retinopatie, výrazný otok končetiny nebo závažná infekce nohy s vysokým rizikem amputace.

Studie byla schválena lokální etickou komisí (Etická komise IKEM a Thomayerovy nemocnice) a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie.

MR spektroskopie

MRS vyšetření byla provedena 1 den před revaskularizací a 3 měsíce po ní za použití celotělového 3T MR systému (TRIO, Siemens, Erlangen, Německo) vybaveného pedálním ergometrem, s $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ cívkou (Rapid Biomedical, Německo). Pacienti i zdraví dobrovolníci byli vyšetřeni v poloze na zádech s cívkou fixovanou pod m. gastrocnemius. MRS vyšetření bylo rozděleno na fázi klidovou (2 min), fázi zátěžovou (6 min) a recovery fázi (6 min). Během zátěžové fáze vyšetřovaný subjekt prováděl planární flexi 1krát za 2 s se standardizovanou zátěží 7,3 kg.

Analýza ^{31}P MR spekter

Metodika je podrobně popsána v předchozí studii [16]. Ve stručnosti, MRS parametry charakterizující metabolismus lýtkového svalu v klidu byly definovány jako poměry intenzity signálu PCr, Pi, PDE a ATP k celkové sumě intenzit signálu fosforových metabolitů ve ^{31}P MR spektru. Dále byla stanovena hodnota pH na základě chemického posunu PCr a Pi. Zátěžové MRS parametry (pokles PCr, mitochondriální kapacita Q_{max} , recovery time PCr) a pH na konci zátěže byly vypočítány ze spekter změřených na konci zátěže a v recovery fázi.

Klinický efekt revaskularizace byl ověřen měřením TcPO_2 standardizovanou metodou na přístroji TCM400 (Radiometer Medical ApS, Aarhus, Dánsko).

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byly použity Studentův t-test, Mannův-Whitneyho U test a ANOVA test. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

Hodnoty klidových MRS parametrů u pacientů se SDN a CLI před revaskularizací ve srovnání se zdravými kontrolami znázorňuje tab. 2. Pacienti se SDN a CLI měli v klidu před léčbou zejména signifikantně nižší poměr PCr/Pi ($p < 0,001$) ve srovnání se zdravými dobrovolníky; tento výsledek ukazuje na významné poškození klidového metabolismu svalových buněk u pacientů se

Tab. 2. Porovnání parametrů MRS lýtkových svalů mezi pacienty se SDN a CLI a zdravými dobrovolníky – v klidu

klidové MRS parametry	pacienti se SDN a CLI (n = 34)	zdravé kontroly (n = 19)	p
PCr/Pi	$5,5 \pm 2,1$	$8,4 \pm 1,8$	< 0,001
PCr/celkový signál P metabolitů	$0,44 \pm 0,07$	$0,51 \pm 0,020$	< 0,001
Pi/celkový signál P metabolitů	$0,089 \pm 0,033$	$0,062 \pm 0,012$	0,002
PDE/celkový signál P metabolitů	$0,077 \pm 0,022$	$0,067 \pm 0,019$	0,118
ATP/celkový signál P metabolitů	$0,075 \pm 0,020$	$0,089 \pm 0,014$	0,012
klidové pH	$7,079 \pm 0,081$	$7,022 \pm 0,026$	0,005

SDN a CLI. Dále jsme u těchto pacientů pozorovali signifikantně vyšší pH ($p = 0,005$) v porovnání se zdravými kontrolami.

Počet pacientů s hodnotitelným zátěžovým MRS vyšetřením byl redukován z důvodu obtíží při cvičení kvůli přítomnosti rozsáhlých defektů, nízkých amputací nebo rychlé únavě. U podskupiny pacientů, kteří byli schopni cvičit, jsme pozorovali signifikantně menší mitochondriální kapacitu a prolongovaný návrat PCr k výchozím klidovým hodnotám (tab. 3) ve srovnání se zdravými kontrolami.

Klidové MRS parametry se však u pacientů se SDN a CLI před a po revaskularizaci signifikantně nezměnily (tab. 4). V individuálních případech došlo po revaskularizaci ke zlepšení zátěžových MRS parametrů (Q_{\max} , tPCr), jak je zřejmé z grafu 2.

Efekt revaskularizace byl potvrzen signifikantním vzestupem hodnot TcPO₂ 3 měsíce po revaskularizaci ($z 26,4 \pm 11,7$ na $39,7 \pm 17,7$ mm Hg, $p < 0,005$), nepozorovali jsme však korelaci mezi MRS parametry a hodnotami TcPO₂.

Diskuse

Výsledky naší pilotní studie ukazují porušený energetický metabolismus lýtkových svalů u pacientů se SDN a CLI ve srovnání se zdravými kontrolami již v klidové fázi. Pacienti se SDN a CLI měli signifikantně nižší poměr fosfokreatinu k anorganickému fosfátu ve srovnání se zdravými kontrolami. Tyto změny v parametrech klidového metabolismu u pacientů s diabetem jsou obdobné jako u nálezů pacientů s onemocněními svalů, např. myopatiemi nebo dystrofiemi; u chlapců s Duchenneovou svalovou dystrofií byl rovněž pozorován nižší poměr PCr/Pi ve srovnání se zdravými kontrolami [17]. Diabetes může

vést ke snížení mitochondriální kapacity, snížené kapilarizaci, svalové atrofii, chronickému prozánětlivému stavu a vyššímu oxidativnímu stresu [18]. Navíc se může uplatňovat i negativní vliv dlouhodobého odlehčení končetiny, které je součástí léčby syndromu diabetické nohy. Pacienti s dlouhodobě se nehojícím defektem minimálně zatěžují končetinu, což může vést ke svalové atrofii a změně aktivitě mitochondrií.

Chronická hypoperfuze končetin u ICHDK se také podílí na získané svalové myopatii, která je charakterizovaná nedostatečnou funkcí mitochondriálních enzymů, vyšším výskytem mutací mitochondriální DNA, zvýšeným oxidativním stresem a porušenou regulací mitochondriální respirace [19,20].

Na začátku zátěže není počáteční rychlost oxidativního ani anaerobního metabolismu schopna pokrýt zvýšené energetické nároky svalu vzniklé v důsledku úbytku adenosin trifosfátu (ATP), který je štěpen ATPázou v myofibrilách a jež slouží jako zdroj energie pro svalovou kontrakci. Proto dochází k hydrolyze fosfokreatinu (PCr), který představuje bezprostředně využitelnou energetickou rezervu svalu. Tato počáteční fáze je na začátku cvičení charakterizována progresivním poklesem zásob PCr. Svalová zátěž zároveň vede ke zvýšení krevního průtoku na úrovni mikrocirkulace za účelem dostatečného zásobení svalu kyslíkem a dochází k nahrazení anaerobní glykolýzy, která v mezidobí vyrovnávala pokles PCr. Jakmile zásobení kyslíkem stoupne, nastává aerobní fáze charakterizovaná tvorbou ATP oxidativní fosforylací, která probíhá v mitochondriích. V této fázi hydrolyza PCr dospěje do ustáleného stavu graf 1 [21,22].

Rychlost a míra poklesu PCr je závislá na velikosti zátěže, ekonomice kontrakcí (efektivitě spotřeby ATP)

Tab. 3. Porovnání parametrů MRS lýtkových svalů mezi pacienty se SDN a CLI a zdravými dobrovolníky - při zátěži

zátěžové MRS parametry	pacienti se SDN a CLI (n = 15)	zdravé kontroly (n = 19)	p
pokles PCr (%)	37 ± 14	26 ± 13	0,021
recovery time PCr (s)	170 ± 140	45 ± 18	< 0,001
Q_{\max} (mmol/s)	0,29 ± 0,14	0,60 ± 0,25	< 0,001
pH na konci zátěže	6,85 ± 0,23	7,02 ± 0,06	0,003

Tab. 4. Porovnání parametrů MRS lýtkových svalů u pacientů se SDN a CLI před a po revaskularizaci

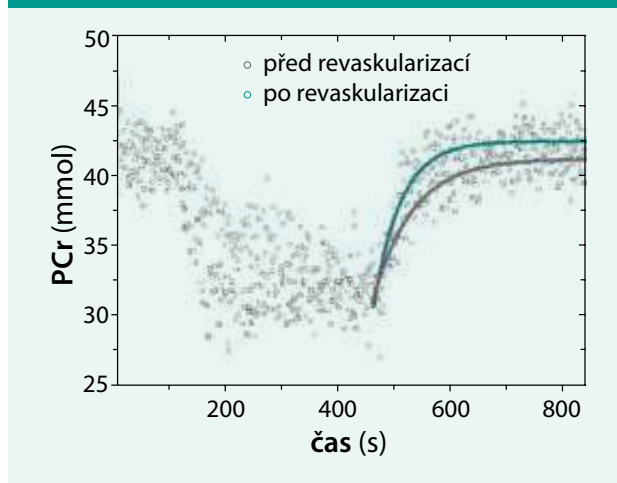
klidové MRS parametry	pacienti se SDN a CLI (n = 15)		p
	před revaskularizací	3 měsíce po revaskularizaci	
PCr/Pi	5,9 ± 2,6	5,7 ± 1,9	NS
PCr/celkový signál P metabolitů	0,44 ± 0,09	0,44 ± 0,07	NS
Pi/celkový signál P metabolitů	0,089 ± 0,04	0,084 ± 0,028	NS
PDE/celkový signál P metabolitů	0,077 ± 0,025	0,070 ± 0,024	NS
ATP/celkový signál P metabolitů	0,074 ± 0,023	0,078 ± 0,021	NS
klidové pH	7,078 ± 0,023	7,060 ± 0,020	NS

a odráží úvodní část kyslíkového deficitu. Pro hodnocení oxidativních možností svalu je však nejdůležitější vývoj PCr po skončení zátěže, protože v této fázi tvoří sval ATP pouze pomocí oxidativní fosforylace. Recovery time PCr charakterizuje čas, který je potřeba k obnově původních klidových zásob fosfokreatinu (resyntéza PCr je odrazem refosforylace PCr, respektive tvorby ATP).

Při hodnocení zátěžových MRS parametrů jsme u pacientů se SDN a CLI pozorovali prodloužený recovery time PCr a významně sníženou mitochondriální kapacitu ve srovnání se zdravými kontrolami. Produkce ATP v buňkách je nedostatečná a návrat PCr k výchozímu stavu je u pacientů se SDN a CLI prodloužen. Snížená mitochondriální kapacita je odrazem porušené funkce mitochondrií, resp. aktivity jejich enzymů a nedostatečného zásobení svalu kyslíkem, které se při zátěži ještě zdůrazní. Předchozí studie MRS lýtkových svalů prokázaly, že obnovení zásob PCr u pacientů s ICHDK je po svalovém cvičení prodlouženo ve srovnání se zdravými kontrolami [8,23], což je v souladu s našimi výsledky. Greiner et al studovali energetický metabolismus lýtkových svalů u zdravých dobrovolníků a jeho změnu při simulaci stenózy za použití manžety během cvičení s postupně se zvyšující zátěží. Výsledky jeho studie ukázaly, že omezený krevní průtok v důsledku periferní stenózy vedl během cvičení k prodloužení recovery time PCr, poklesu PCr a pH a vzestupu Pi [21]. Jedním z možných vysvětlení je mitochondriální dysfunkce u pacientů s ICHDK v důsledku chronické ischemie a nedostatečného zásobení kyslíkem z důvodu sníženého prokrvení končetin.

Efekt revaskularizace byl v naší studii potvrzen signifikantním zvýšením hodnot $TcPO_2$, se kterými však sledované MRS parametry nekorelovaly. Nepozorovali jsme

Graf 2. Změny zátěžových parametrů MRS lýtkových svalů u pacienta po revaskularizaci. Po revaskularizaci došlo u pacienta k rychlejšímu návratu PCr k výchozím hodnotám (recovery fáze je proložena exponenciální křivkou, ze které se určuje recovery time PCr)



signifikantní rozdíly klidových MRS parametrů před a po revaskularizaci, a to ani ve skupině léčené ACT, ani v PTA skupině. Pouze v individuálních případech jsme zaznamenali zlepšení zátěžových MRS parametrů po revaskularizaci podobně jako v předchozí studii [24], ovšem pouze několik pacientů bylo schopno cvičení; tento nálezn je třeba ověřit na větším počtu pacientů. Tyto výsledky svědčí pro přetrvávající porušený svalový energetický metabolismus v důsledku přítomnosti myopatie u diabetiků, který poměrně časně po revaskularizaci nereflektuje aktuální změny mikrocirkulace a makrocirkulace.

Diskutabilním nálezem je vyšší klidové pH u pacientů se SDN a CLI ve srovnání se zdravými kontrolami. Intracelulární pH odráží množství hydrolyzovaného ATP v myofibrilách během svalové zátěže a stupeň ATP syntézy v mitochondriích. Možným vysvětlením pro nálezn paradoxně vyššího klidového pH u pacientů se SDN a CLI je adaptační mechanismus, kterým se sval „brání“ proti většímu okyselení při zátěži. Další možnou příčinou vedoucí k vyššímu klidovému pH je poškození buněk – intracelulární pH je nižší než pH extracelulárního prostředí, při destrukci buněk u pacientů se SDN a CLI může být tedy pH měřené v celém objemu tkáně vyšší. Přítomnost edému se rovněž může podílet na vyšším pH v důsledku měření vyššího fosforového signálu z intersticiálního prostředí, v němž je fyziologicky vyšší pH než intracelulárně. Na konci cvičení však měli pacienti se SDN a CLI signifikantně nižší pH než zdravé kontroly, což odpovídá našemu předpokladu vlivu ischemie a diabetu na zátěž u těchto pacientů [25]. Pokles pH během cvičení je důsledkem hydrolyzy fosfokreatinu, vzestupu anorganického fosfátu a nedostatečné tvorby ATP během glykolýzy. Acidóza může navíc prodlužovat recovery time PCr, který je odrazem refosforylace PCr, a také může redukovat mitochondriální kapacitu (Q_{max}), protože vodíkové ionty při nižším pH inhibují oxidativní fosforylaci [26].

Hlavní limitací naší studie byl relativně malý soubor pacientů a krátká doba sledování. Výraznou limitací je rovněž omezená schopnost cvičení pacientů se SDN a CLI a obtížná standardizace zátěže ovlivňující interpretaci zátěžových MRS parametrů. Je možné, že efekt revaskularizace by se projevil v MRS parametrech až v delším časovém odstupu od výkonu, kdy může dojít k reparaci funkce mitochondrií [24].

Závěr

V naší studii jsme prokázali význam MRS lýtkových svalů při hodnocení končetinové ischemie a svalového energetického metabolismu u pacientů se SDN a CLI ve srovnání se zdravými kontrolami. V této pilotní studii jsme však nezaznamenali signifikantní změnu MRS parametrů po revaskularizaci. Přínos MRS v hodnocení efektu revaskularizace je nutné ověřit v dlouhodobějších studiích vzhledem k možnosti přetrvávání myopatických změn ovlivňujících svalový energetický metabolismus.

Podpořeno Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze, projekt č. 16415, a MZO 00023001

Literatura

- Hinchliffe RJ, Brownrigg JR, Apelqvist J et al. IWGDF guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2016; 32(Suppl 1): 37–44. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2698>>.
- Dua A, Desai SS, Kumar N et al. Epidemiology and treatment strategies of iliac vein thrombophlebitis. *Vascular* 2015; 23(6): 599–601. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1177/1708538114565693>>.
- Brownrigg JR, Schaper NC, Hinchliffe RJ. Diagnosis and assessment of peripheral arterial disease in the diabetic foot. *Diabet Med* 2015; 32(6): 738–747. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/dme.12749>>.
- Benitez E, Sumpio BJ, Chin J et al. Contemporary assessment of foot perfusion in patients with critical limb ischemia. *Semin Vasc Surg* 2014; 27(1): 3–15. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.semvacsurg.2014.12.001>>.
- Liu Y, Xu Y, Fang F et al. Therapeutic Efficacy of Stem Cell-based Therapy in Peripheral Arterial Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2015; 10(4): e0125032. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125032>>.
- Tomesova J, Gruberova J, Broz P et al. Methods of skin microcirculation assessment. *Vnitř Lék* 2013; 59(10): 895–902.
- Prompers JJ, Jeneson JA, Drost MR et al. Dynamic MRS and MRI of skeletal muscle function and biomechanics. *NMR Biomed* 2006; 19(7): 927–953.
- Isbell DC, Berr SS, Toledano AY et al. Delayed calf muscle phosphocreatine recovery after exercise identifies peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(11): 2289–2295.
- Greiner A, Esterhammer R, Messner H et al. High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in patients with unilaterally symptomatic peripheral arterial disease measured by phosphor 31 magnetic resonance spectroscopy. *J Vasc Surg* 2006; 43(5): 978–986.
- Cree-Green M, Newcomer BR, Brown MS et al. Delayed skeletal muscle mitochondrial ADP recovery in youth with type 1 diabetes relates to muscle insulin resistance. *Diabetes* 2015; 64(2): 383–392. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2337/db14-0765>>.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350(7): 664–671.
- Fetterman JL, Holbrook M, Westbrook DG et al. Mitochondrial DNA damage and vascular function in patients with diabetes mellitus and atherosclerotic cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2016; 15: 53. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12933-016-0372-y>>.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33(Suppl 1): S1–S75.
- Graziani L, Silvestro A, Bertone V et al. Vascular involvement in diabetic subjects with ischemic foot ulcer: a new morphologic categorization of disease severity. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33(4): 453–460.
- Dubsky M, Jirkovska A, Bem R et al. Comparison of the effect of stem cell therapy and percutaneous transluminal angioplasty on diabetic foot disease in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy* 2014; 16(12): 1733–1738. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.08.010>>.
- Sedivy P, Kipfelsberger MC, Dezortova M et al. Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys* 2015; 42(4): 1678–1689. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1118/1.4914448>>.
- Torriani M, Townsend E, Thomas BJ et al. Lower leg muscle involvement in Duchenne muscular dystrophy: an MR imaging and spectroscopy study. *Skeletal Radiol* 2012; 41(4): 437–445. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00256-011-1240-1>>.
- D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front Physiol* 2013; 4: 379. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00379>>.
- Brass EP, Hiatt WR. Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2000; 5(1): 55–59.
- Pipinos II, Judge AR, Selsby JT et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovascular Surg* 2007; 41(6): 481–489. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1177/1538574407311106>>.
- Greiner A, Esterhammer R, Bammer D et al. High-energy phosphate metabolism in the calf muscle of healthy humans during incremental calf exercise with and without moderate cuff stenosis. *Eur J Appl Physiol* 2007; 99(5): 519–531.
- Schocke MF, Esterhammer R, Kammerlander C et al. High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in humans measured by 31 phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P MRS). *Magn Reson Imaging* 2004; 22(1): 109–115.
- Tecilazich F, Dinh T, Lyons TE et al. Postexercise phosphocreatine recovery, an index of mitochondrial oxidative phosphorylation, is reduced in diabetic patients with lower extremity complications. *J Vasc Surg* 2013; 57(4): 997–1005. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2012.10.011>>.
- West AM, Anderson JD, Epstein FH et al. Percutaneous intervention in peripheral artery disease improves calf muscle phosphocreatine recovery kinetics: a pilot study. *Vasc Med* 2012; 17(1): 3–9. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1177/1358863X11431837>>.
- Jirkovska A. Diabetic foot syndrome from the perspective of internist educated in podiatry. *Vnitř Lék* 2016; 62(Suppl 4): 42–47.
- Jubrias SA, Crowther GJ, Shankland EG et al. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *J Physiol* 2003; 553(Pt 2): 589–599.

MUDr. Andrea Němcová

✉ andrea.nemc@gmail.com

Centrum diabetologie IKEM, Praha

www.ikem.cz

Doručeno do redakce 6. 3. 2017

Přijato po recenzi 29. 3. 2017

^{31}P A ^{19}F MR SPEKTROSKOPIE A ZOBRAZOVÁNÍ V IKEM

^{31}P AND ^{19}F MR SPECTROSCOPY AND IMAGING IN IKEM

přehledový článek

Petr Šedivý
Vít Herynek
Monika Dezortová
Miloslav Drobny
Andrea Gálisová
Milan Hájek

Oddělení klinické a experimentální MR spektroskopie, Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Přijato: 15. 11. 2017.

Korespondenční adresa:

Ing. Milan Hájek, DrSc.
MR oddělení ZRIR
IKEM
Videňská 1958/9, 140 21 Praha 4
e-mail: miha@ikem.cz

Konflikt zájmů: žádný.

Podpořeno MZ ČR – RVO (Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001) a Grantovou agenturou UK projekt č. 315.

Hlavní stanovisko práce

Článek popisuje vývoj a hlavní směry v rozvoji *in vivo* MR spektroskopie a zobrazování pomocí X-jader, a to především jader ^{31}P a ^{19}F a uplatnění těchto technik v IKEM za posledních 30 let.

SOUHRN

Šedivý P, Herynek V, Dezortová M, Drobny M, Gálisová A, Hájek M. ^{31}P a ^{19}F MR spektroskopie a zobrazování v IKEM

Článek popisuje základní možnosti použití MR spektroskopie X-jader a soustřeďuje se na ^{31}P a ^{19}F *in vivo* MR experimenty. Jsou popsány základní postupy klidové a dynamické ^{31}P MR spektroskopie na příkladech vyšetření prováděných v IKEM. ^{31}P a ^{19}F *in vitro* a *in vivo* experimenty jsou demonstrovány na vyšetřeních při 1,5 T, 3 T a 4,7 T orgánů a laboratorních zvířat. Vývoj metod v IKEM je dokladován uvedenými publikovanými pracemi.

Klíčová slova: spektroskopie X-jader, klidová a dynamická ^{31}P MR spektroskopie, ^{19}F MRS.

Major statement

The paper describes the development of *in vivo* X-nuclei MR spectroscopy and imaging with X-nuclei, namely ^{31}P and ^{19}F , and application of these techniques in IKEM over the last 30 years.

SUMMARY

Šedivý P, Herynek V, Dezortová M, Drobny M, Gálisová A, Hájek M. ^{31}P and ^{19}F MR spectroscopy and imaging in IKEM

The paper describes the possibility of the application of MR spectroscopy with X-nuclei and is focused to ^{31}P and ^{19}F *in vivo* MR experiments. Basic procedures of the rest and dynamic ^{31}P MRS are shown on examples of examinations performed in IKEM. ^{31}P and ^{19}F *in vivo* and *in vitro* experiments with organs and small animals are demonstrated at 1.5 T, 3 T and 4.7 T magnetic fields. The development of these methods in IKEM is supported by published papers.

Key words: X-nuclei MR spectroscopy, dynamic and rest ^{31}P MR spectroscopy, ^{19}F MRS.

ÚVOD

^1H MR zobrazování (MRI) i ^1H MR spektroskopie (MRS) se staly v posledních 30 letech běžnou součástí standardního klinického vyšetření pacientů s onemocněním CNS i jiných orgánů. MRI a MRS tzv. X-jader (v literatuře označováno jako „X-nuclei MR spectroscopy“ nebo „spektroskopie dalších jader“), zahrnuje využití nevodíkových izotopů pro MRS a MRI v biomedicině a klinickém výzkumu a praxi (tab. 1). Vývoj a aplikace těchto metod se úspěšně rozvíjí hlavně ve specializovaných centrech, která jsou vybavená tomografy a dalším technickým příslušenstvím pro měření X-jader.

V pražském IKEM byla v roce 1987 spolu s prvním 1,5 T tomografem (Magnetom Siemens) v ČR dodána i multinukleární jednotka umožňující provádět fosforovou (^{31}P MRS) a sodíkovou MR spektroskopii (^{23}Na MRS). Na tomto místě je vhodné připomenout, že protonová *in vivo* spektroskopie byla v té době ještě běžně nedostupná. Na klinických tomografech byla první ^1H MR spektra naměřena teprve v roce 1985 (1).

Experimentální a klinické studie s využitím ^{31}P MRS probíhaly v IKEM i po výměně tomografu Magnetom za nový 1,5 T

MR tomograf Magnetom Vision (Siemens). Později, po přechodu na 3 T tomograf (Trio TIM, Siemens) byla multinukleární jednotka pořízena koncem roku 2010 pro ^{31}P MRS a v roce 2014 pak i cívky umožňující detekovat izotop ^{19}F .

Multinukleární jednotka je nedílnou součástí experimentálního MR spektrometru Bruker pracujícího s magnetickým polem 4,7 T, který byl instalován v roce 1999 a na kterém probíhaly a dosud probíhají různé experimenty včetně zvířecích modelů s použitím řady zobrazovacích a spektroskopických ^{31}P , ^{19}F a ^{13}C MR postupů.

FOSFOROVÁ MR SPEKTROSKOPIE

Měření fosforových (^{31}P) MR spekter má mezi X-jádry výsadní postavení, protože jeho izotop ^{31}P má 100% přírodní zastoupení a spektra jsou jednoduchá. Obsahují jen několik málo *in vivo* měřitelných metabolitů (fosforové metabolity v lidské tkáni mají řádově téměř stejné koncentrace – cca od 5 do 40 mmol/l). Ve spektrech není žádný signál, který by bylo nutné eliminovat, tak jako je tomu v případě protonové MR spektroskopie, kde je signál vody hlavním omezujícím faktorem získání kvalitních *in vivo* spekter. Není tedy nutné žádné dodatečné potlačování rušivého signálu a to také stojí za velkým prvotním zájmem o použití fosforové MR spektroskopie pro experimentální i klinické aplikace již na prvních celotělových tomografech. Oproti ^1H má však ^{31}P MRS nevýhodu v menší citlivosti. Ta je dána menším gyromagnetickým poměrem (tab. 1), který snižuje receptivitu, tj. relativní velikost fosforového signálu vzhledem k signálu ^1H (2). Tento nedostatek se řeší měřením z větších objemů VOI (volume of interest) a zvýšeným počtem akumulací spekter. Rezonanční frekvence ^{31}P se významně liší od ^1H , a proto fosforová spektroskopie vyžaduje speciální cívky, které jsou naladěny na příslušnou rezonanční frekvenci. Často se používají duální cívky, tj. cívky, které umožňují kromě měření ^{31}P spekter také získat ^1H MR obraz vyšetřovaného místa, avšak konstrukce s kombinací několika cívek může zhoršovat citlivost měření.

Tab. 1. MR rezonanční frekvence (f_0) a receptivita klinicky nejzajímavějších nuklidů

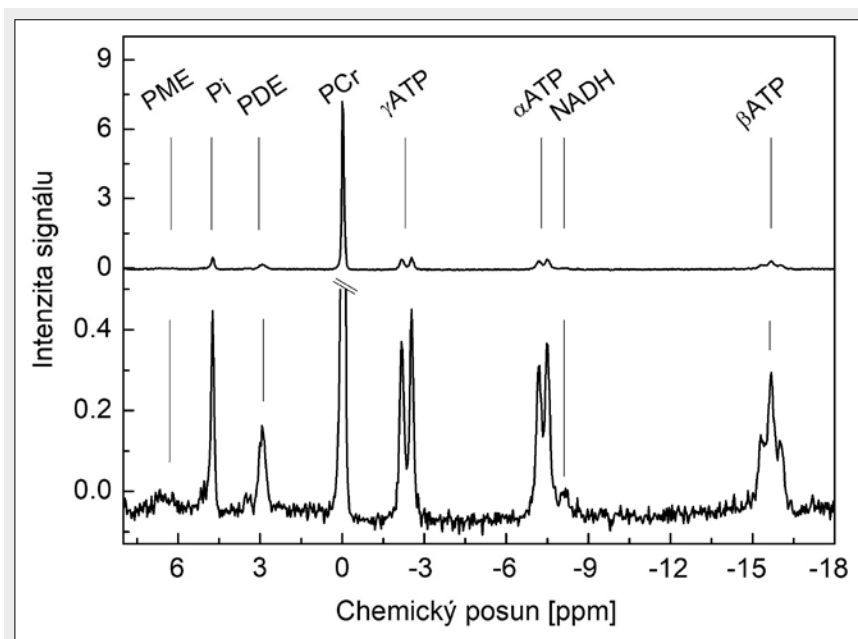
Table 1. MR resonance frequency (f_0) and receptivity of the most clinically interesting nuclides

Nuklid	Spin	Přírodní zastoupení	γ [$10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$]	Receptivita*	f_0 (3T) (MHz)
^1H	1/2	~ 100%	267	1	128
^{13}C	1/2	1,20%	67	$1,8 \times 10^{-4}$	32
^{19}F	1/2	~ 100%	252	0,83	120
^{23}Na	3/2	~ 100%	71	0,092	34
^{31}P	1/2	~ 100%	108	0,066	52

*receptivita = $\gamma_X^3/\gamma_H^3 \times Z_X/Z_H$, Z – přírodní zastoupení daného izotopu

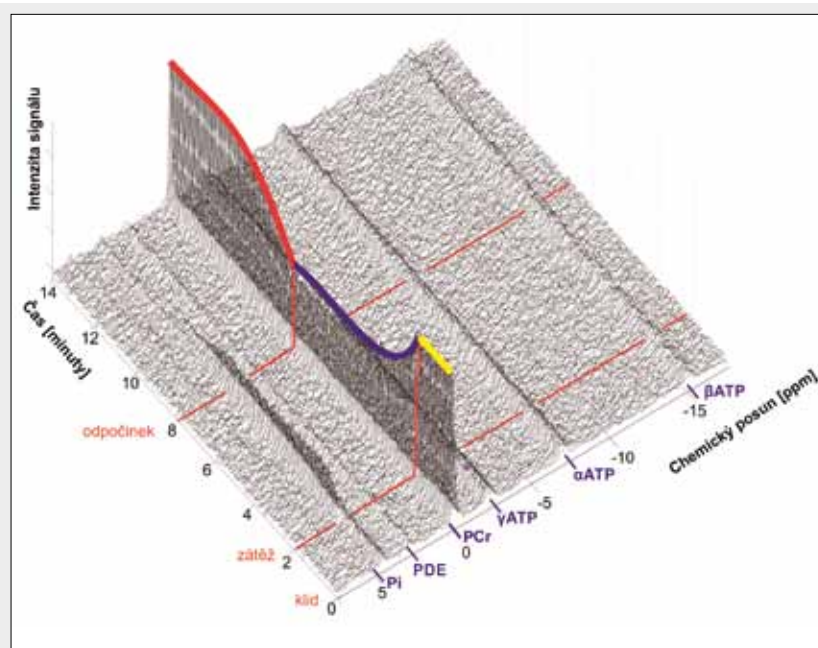
Pro měření se tedy používají spektroskopické techniky (náběr signálu z volné precese – FID, single voxel spektroskopie – SVS, spektroskopické zobrazování – CSI) bez použití selektivního potlačování konkrétního signálu, nejčastěji v kombinaci s povrchovými cívkami, které mohou být také samostatně použity pro lokalizaci.

V živé tkáni probíhá rozsáhlý metabolický cyklus fosforových sloučenin a v *in vivo* ^{31}P MR spektrech tkání jsou signály hlavních fosforových metabolitů pozorovány v rozmezí kolem 25 ppm. Jedná se především o tyto sloučeniny: fosfokreatin (PCr), adenosintrifosfát (ATP): 3 multipletní signály – α (dublet), β (dublet), γ (triplet) – od každého atomu fosforu v této molekule, anorganický fosfát (Pi), fosfodiester (PDE: zejména glycerolfosfoetanolamin (GPE) a glycerolfosfocholin (GPC)) a fosfomonoestery (PME: zejména fosfocholin (PC) a fosfoetanolamin (PE)). Všechny tyto signály je možné identifikovat v *in vivo* a *in vitro* spektrech kosterních svalů, srdce, jater, ledvin aj. (obr. 1 až 7). Jednotlivé píky nejsou vždy tak ostré a štěpené jako v případě kosterního svalu (obr. 1). Kvalita spekter závisí na splnění řady technických podmínek, především na dobrém nastavení homogenity magnetického pole v místě VOI, tj. shimování. Metabolity PCr, ATP a Pi jsou zapojeny především do energetického metabolismu. PDE a PME se vztahují spíše k membránovému metabolismu. Jednotlivé orgány mají



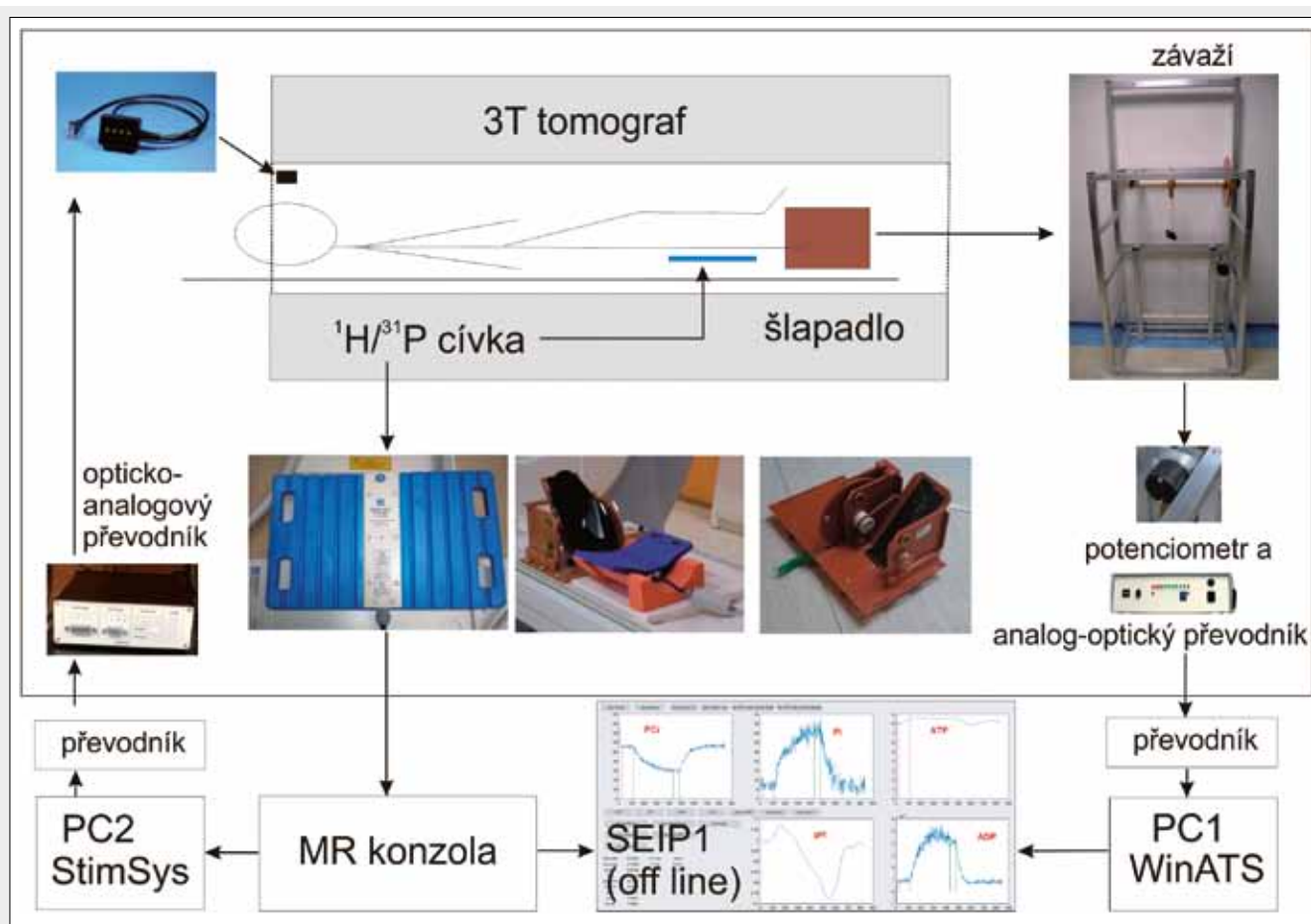
◀ Obr. 1

Obr. 1. ^{31}P MR spektrum z lýtkového svalu, spektrum měřeno povrchovou cívkou a sekvencí FID (3 T, 16 akvizic, TR = 15 s). Signály ve spektru: PME – fosfomonoestery, Pi – anorganický fosfát, PDE – fosfodiester, PCr – fosfokreatin, ATP – adenosintrifosfát (signály α , β , γ , při dobrém shimu je pozorovatelné štěpení signálů J-couplingem), NADH – nikotinamidadenindinukleotid (signál se překrývá se signálem α ATP)
Fig. 1. ^{31}P MR spectrum of calf muscles measured using a surface coil and FID sequence (3T, 16 acquisitions, TR = 15 s). Signals in the spectrum: PME – phosphomonoesters, Pi – inorganic phosphate, PDE – phosphodiester, PCr – phosphocreatine, ATP – adenosintriphosphate (α , β , γ signals, J-coupling is visible if the shim is good enough), NADH – nicotinamide adenine dinucleotide (its signal is overlapped with α ATP signal)



◀ Obr. 2

Obr. 2. **Kumulovaný graf průběhu vyšetření dynamickou ^{31}P MRS lýtkového svalu při 3 T.** Vyšetřovací protokol používaný v IKEM: akumulace spekter v klidu – 2 minuty ($TR = 2$ s); akumulace spekter při cvičení uvnitř magnetu po dobu 6 minut s frekvencí 1 sešlápnutí za 2 s; akumulace spekter v klidu po dobu 6 minut, vyhodnocuje se rychlost exponenciálního návratu PCr do klidové hodnoty (v grafu modrou čarou zdůrazněn pokles a červenou křivkou návrat ke klidovým hodnotám). Vyhodnocení výsledků se provádí semi-automaticky programem SEIP1, který využívá program jMRUI a další funkce MATLAB pro zpracování dat. Fig. 2. **A stacked plot of dynamic ^{31}P MRS examination of calf muscles at 3T.** The examination protocol used in IKEM: 2-minute acquisition of spectra at rest ($TR = 2$ s); acquisition of spectra during 6 minutes of exercise inside the magnet, frequency of pedaling is once per 2 s; 6-minute data acquisition at rest to obtain recovery data for the calculation of dynamic parameters. The evaluation is performed via semi-automatic software SEIP1 which includes the jMRUI and MATLAB functions.



▲ Obr. 3

Obr. 3. **Schematické uspořádání pro dynamickou ^{31}P MR spektroskopii v IKEM.** Pro řízení a zpracování dat se používá software: StimSYS – domácí software pro spuštění měřicí sekvence a signalizace (Rydlo J, Tintěra J, IKEM); SEIP1 – domácí vyhodnocovací software pro zpracování a interpretaci dat (Šedivý P, IKEM); WinATS – komerční software pro sledování vykonané práce (SYSMA, Francie). Fig. 3. **Set-up of equipment for dynamic ^{31}P MR spectroscopy in IKEM.** Experiments and data processing are controlled by software: StimSYS – home-made software for data acquisition control (Rydlo J, Tintěra J, IKEM); SEIP1 – home-made software for data evaluation (Šedivý P, IKEM); WinATS - commercial software (SYSMA, France).

specifické zastoupení fosforových sloučenin, jak lze vidět při porovnání spekter na obrázcích 1 až 7. Ve svalu je u zdravých osob signál fosfomonoesterů téměř nezatelný, na rozdíl od jater, kde je tento signál významný (obr. 6). V játrech a ledvinách naopak chybí signál fosfokreatinu, který má ve svalu největší intenzitu (obr. 1). ATP slouží v buňce jako základní energetický zdroj, ve svalu je jeho hydrolyza spojena s uvolněním energie a svalovou kontrakcí. PCr udržuje přes kreatin-kinázovou reakci stálou hladinu ATP, čímž jeho hodnota vypovídá o aktuální energetické rezervě buňky. PME se dávají do souvislosti s tvorbou a obnovou buněčných membrán, PDE se mají naopak zvyšovat při nadměrné degradaci buněčných membrán (3).

Kromě stanovení koncentrací zmíněných metabolitů lze z chemických posunů mezi PCr, Pi a ATP určit pH a koncentraci hořčnatých kationtů (Mg^{2+}) (4).

KLINICKÁ ^{31}P MRS

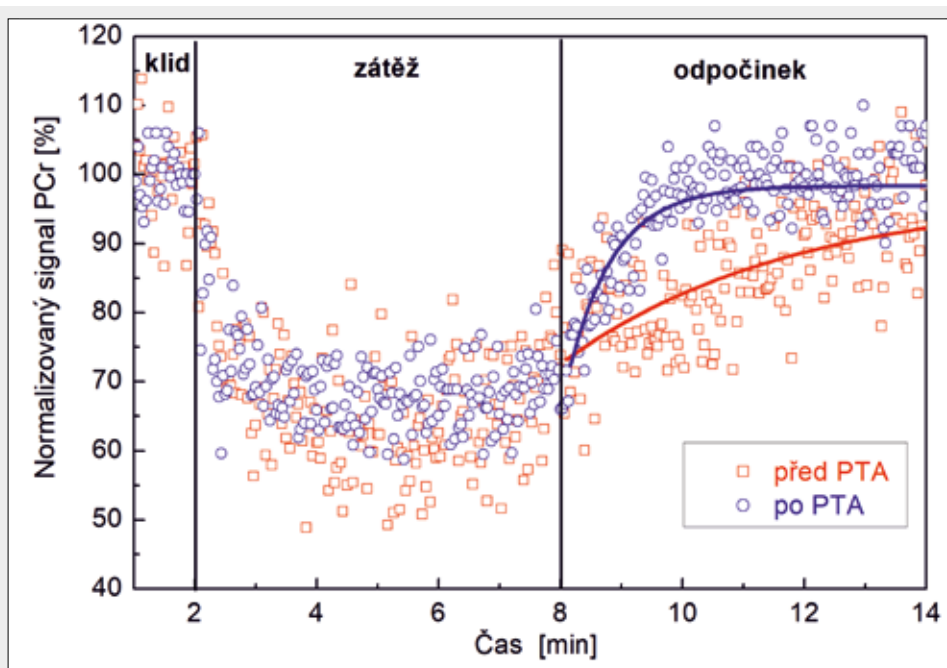
Vyšetřování kosterních svalů

Použití fosforové MR spektroskopie se od druhé poloviny osmdesátých let 20. století zaměřilo především na studium

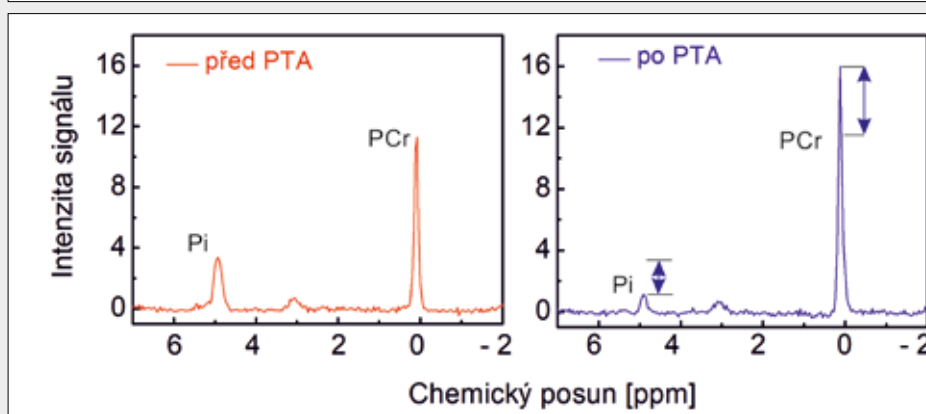
metabolismu kosterních svalů u člověka. Tyto studie předloketních, lýtkových a stehenních svalů přispěly k pochopení aerobního a anaerobního metabolismu ve svalectech a umožnily tyto pochody popsat nejen kvalitativně, ale i kvantitativně. Na základě prací Argova, Kempa, Raddy a řady dalších autorů (5–7) tak vznikl ucelený přehled teoretických vztahů, které je možné uplatnit v klinických studiích i diagnostice na základě výsledků klidové a dynamické ^{31}P MR spektroskopie.

Interpretace spekter kombinuje stanovení klidového zastoupení fosforových metabolitů (nejčastěji ve formě poměrů intenzit signálů) s vyšetřením při fyzické zátěži, kdy se sleduje dynamika poklesu a následného návratu PCr do původních hodnot a obdobné změny Pi a dalších metabolitů (změny ve spektrech jsou viditelné na kumulovaném grafu na obrázku 2). Z velikostí změn zastoupení metabolitů a jejich dynamiky během a po zátěži lze pak vypočítávat metabolické parametry, jako je maximální oxidativní kapacita svalu (tzv. mitochondriální kapacita), či jednotlivé metabolické toky ATP příslušnými biochemickými dráhami – anaerobní glykolýzou nebo oxidativní fosforylací. Z rozdílů chemických posunů lze vypočítat např. pH. Biochemii a metodice dynamické ^{31}P MR spektroskopie je věnován náš přehledný článek v Chemických listech (8).

Z experimentálního hlediska je MR vyšetřování svalů fosforovou spektroskopií velmi výhodné hned z několika důvo-



◀ Obr. 4A



◀ Obr. 4B

Obr. 4. ^{31}P MRS spektra lýtkových svalů jeden den před a po PTA zákroku. A – rozdíl v energetickém metabolismu před a po PTA je zvládnutý v dynamické MRS – návrat PCr do klidové hodnoty je po PTA třikrát rychlejší než před výkonem; B – rozdíl v klidových intenzitách PCr je kolem 34%.

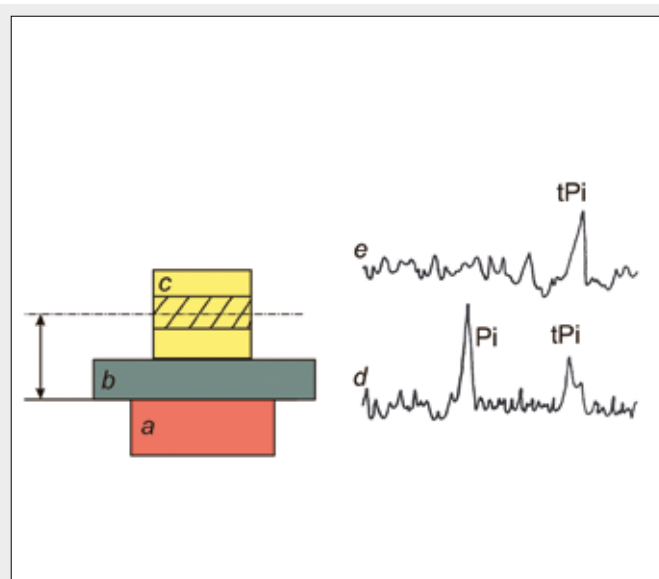
Fig. 4. ^{31}P MRS spectra of calf muscles one day before and after PTA. A – the difference in energy metabolism is pronounced in dynamic MRS – PCr recovery to the rest values after PTA is three times faster than before PTA; B – the difference in resting intensities PCr is about 34%.

dů: a) vyšetřované místo na končetinách je většinou velmi dobře přístupné a umožňuje získat dobrou zobrazovací dokumentaci; b) pro lokalizaci vyšetřovaného místa lze používat povrchové cívky a získaný signál metabolitů je dostatečný pro kvantitativní interpretaci; c) vyšetřování je možné provádět v klidu nebo při fyzické zátěži; d) vnitřní pohyb svalových buněk při cvičení neovlivňuje kvalitu spekter pohybovými artefakty.

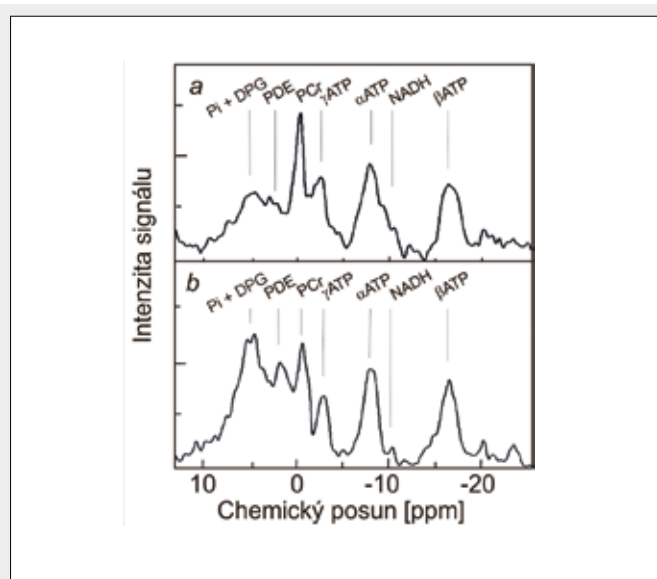
První publikované výsledky fosforové MR spektroskopie z IKEM se datují do roku 1990 (9). Tato úplně první publikace měla za cíl seznámit širší odbornou veřejnost s touto novou vyšetřovací metodou. Zároveň ale také již přinášela konkrétní srovnání klidového svalového metabolismu u pacientů s chronickým renálním selháním nebo neuromuskulárním onemocněním. Obě dvě vyšetřené skupiny pacientů měly signifikantní snížení poměru PCr/Pi. Téma renálního selhání (10, 11) i neuromuskulárních onemocnění (12, 13) bylo dále studováno klidovou fosforovou spektroskopií a publikováno pracovníky IKEM v separátních článcích, které se podrobněji věnovaly dané problematice. U neuromuskulárních onemocnění byly jednotlivé diagnózy (Duchennova dystrofie, Beckerova dystrofie, spinální svalová atrofie, centrální porucha hybnosti aj.) členěny do větších skupin podle výsledků multiparametrické analýzy provedené na poměrech integrálních

hodnot fosforových metabolitů změřených z lýtkového svalu. U chronického renálního selhání byl zkoumán syndrom uremické myopatie, navíc byl hodnocen i efekt aktuálně provedené dialýzy na svalový metabolismus. Pacienti měli vyšší poměr PCr/Pi po právě proběhlé dialýze, což je i období, kdy udávali i nejmenší svalové problémy. To dokazuje vysokou citlivost fosforové spektroskopie ke sledování svalového metabolismu při léčbě a progresi onemocnění. O několik let později bylo v IKEM zahájeno vyšetřování svalového metabolismu u pacientů s hypertenzí (4, 14). Vyšetření fosforovou spektroskopií u této skupiny pacientů mělo zejména sloužit k určení koncentrace Mg^{2+} , poněvadž některé vědecké práce jeho porušenou hladinu dávaly do souvislosti s hypertenzí (15). Pacienti s hypertenzí oproti zdravým kontrolám překvapivě neměli změněnou koncentraci Mg^{2+} , ale měli vyšší poměry PCr/Pi, PCr/ β ATP, PDE/ β ATP a nižší poměry Pi/PDE, Pi/ β ATP.

Druhým podstatným směrem, kterým se fosforová spektroskopie v IKEM ubírala, bylo vyšetření svalového metabolismu při fyzické zátěži. K tomu účelu bylo nutné zhotovit MR kompatibilní ergometr. Z hlediska omezeného prostoru k vykonávání cvičení uvnitř tunelu tomografu je nejvýhodnější konstrukce chodidlových ergometrů pro zátěžové vyšetření lýtkového svalu. Během uplynulých 30 let bylo v IKEM zkon-



▲ Obr. 5A



▲ Obr. 5B

Obr. 5. Testování a použití sekvence 1D ISIS s povrchovou cívkou pro měření ^{31}P spekter myokardu: A – ověření lokalizace vrstvy sekvencí 1D ISIS s povrchovou cívkou a fantomy při 1,5T: a – cívka pro ^{31}P MRS, průměr 10 cm, b – fantom s roztokem fosforečnanu (Pi), c – fantom s roztokem trimetafosforečnanu (tPi), vybraná vrstva o tloušťce 20 mm je šrafovaná, d – nelokalizované spektrum z obou fantomů naměřené FID sekvencí obsahuje oba signály Pi+tPi, e – lokalizované 1D ISIS spektrum z vrstvy o šířce 20 mm obsahuje jen signál tPi; B – ^{31}P MR spektra myokardu naměřená sekvencí 1D ISIS při 1,5T; tloušťka vrstvy 20 mm: a – zdravý dobrovolník, b – pacient s transplantovaným srdcem s mírnou rejekcí. Signály ve spektru: DPG, Pi, PDE – 2,3 difosfoglycerát + anorganického fosfátu + fosfodiesterů; PCr – fosfokreatin; ATP – adenosin trifosfát (signály α , β , γ), NADH – nikotinamidadenindinukleotid (signál se překrývá se signálem α ATP) (IKEM 1993)

Fig. 5. Test and the application of 1D ISIS sequence with an surface coil for the measurement of ^{31}P spectra of myocardium: A – scheme of phantom experiment for the verification of the position of spectroscopic slice in the 1D ISIS sequence with a surface coil at 1.5T: a – the coil (10 cm) for ^{31}P MRS, b – phantom with phosphate solution, c – phantom with the solution of trimetaphosphate solution, the slice in the distance of 45 mm from the coil is hatched, d – nonlocalized spectrum from phantoms measured by FID sequence with two signals (Pi+tPi), e – localized 1D ISIS spectrum of a 20 mm slice with the tPi signal only; B – ^{31}P MR spectra of myocardium measured by sequence 1D ISIS at 1.5T, 20 mm slice: a – healthy volunteer, b – patient with transplanted heart with mild rejection. Signals in the spectrum: DPG, Pi, PDE – 2,3 diphosphoglycerate + inorganic phosphate + phosphodiester overlap; PCr – phosphocreatine; ATP – adenosin triphosphate (α , β , γ signals), NADH – nicotinamide adenine dinucleotide (its signal is overlapped with α ATP signal) (IKEM 1993)

struováno několik chodidlových ergometrů, které byly v průběhu času postupně upravovány a vylepšovány. Na obrázku 3 je popsáno experimentální uspořádání pro dynamickou MR spektroskopii pro současný 3 T tomograf.

První publikovaná studie, ve které byla mimo klidovou ^{31}P MRS také použita i zátěžová MR spektroskopie, se zabývala vlivem přísné nízkokalorické diety na svalový metabolismus u morbidně obézních osob (16). S větším časovým odstupem byla pak publikována metodická práce srovnávající vliv experimentálního vybavení na výsledné parametry zátěžové fosforové spektroskopie. V této multicentrické studii (17) se hodnotil vliv konstrukce ergometru a velikosti magnetického pole na hodnoty ^{31}P dynamických MR parametrů. Studie navazovala na již dříve započatou úspěšnou spolupráci s „The Center of Excellence for MR Research“ ve Vídni, kde mají k dispozici 3 T a 7 T tomografy vybavené komerčním pedálovým ergometrem. Výsledkem porovnání byly závěry, že při použití dostatečně velké zátěže (odpovídající cca 25 % maximální vynutitelné síly) jsou výsledné metabolické parametry (mitochondriální kapacita) navzájem dobře srovnatelné jak mezi 3 T a 7 T, tak i mezi jinými typy ergometrů. V rámci této úspěšné spolupráce vznikla o 2 roky dříve jiná metodická studie prezentující na fosforových datech nově vyvinutou techniku pro kvantifikaci sklápěcích úhlů (18). Fosforové cívký jsou obvykle povrchové, aby byly co nejbližší k detekované oblasti a získal se tím dostatečný poměr signálu vůči šumu (SNR). Pro vyhodnocení poměrového zastoupení fosforových metabolitů není nehomogenní profil sklápěcích

úhlů až tak důležitý, avšak pro absolutní kvantifikaci signálů, respektive koncentrací fosforových sloučenin, je potřeba znát mapu sklápěcích úhlů.

Vzhledem k tomu, že IKEM je diabetologické a kardiologické centrum, je v současné době soustředována pozornost na výzkum svalového metabolismu u diabetiků a hodnocení efektu revaskularizace na svalový metabolismus pomocí léčby perkutánní transluminální angioplastikou (PTA) nebo experimentální transplantací mezenchymálních kmenových buněk (19) u osob s kritickou končetinovou ischemií. Obrázek 4 znázorňuje efekt provedené PTA na hodnoty PCr během zátěžové ^{31}P MRS (důležitá je zejména část během odpočinku, kdy sval tvoří ATP pouze oxidativní fosforylací).

Velká skupina osob byla vyšetřena i v rámci standardní diagnostické péče. Nejčastěji se jednalo o pacienty s podezřením na neuromuskulární onemocnění. V současné době jsou pacienti zejména indikováni k ^{31}P MRS vyšetření pro vyloučení ischemické etiologie při klaudikačních bolestech.

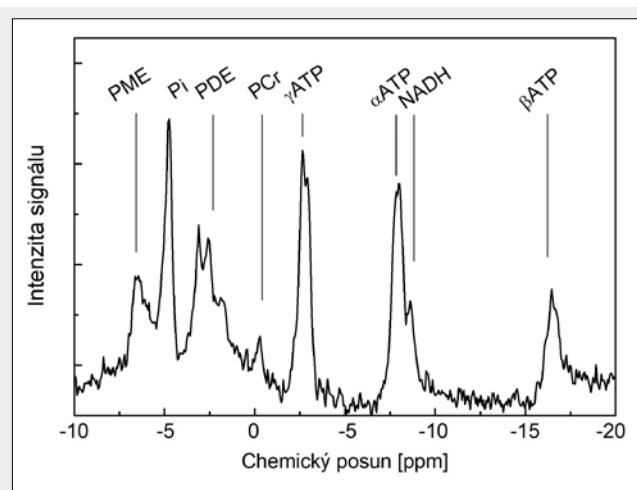
Vyšetřování srdce

Vyšetření myokardu ^{31}P MR spektroskopii patřilo a stále patří k nejobtížnějším spektroskopickým vyšetřením. V našich prvních *in vivo* experimentech to bylo zvládnuto skutečností, že nebyly k dispozici rychlé zobrazovací sekvence nezbytné pro lokalizaci vhodného VOI pro spektroskopická vyšetření. Na začátku devadesátých let jsme testovali sekvence DRESS, FROGS a 1D ISIS pro ^{31}P MRS. Jako optimální se ukázala technika 1D ISIS v kombinaci s povrchovou cívkou. Obrázek 5 ukazuje schéma uspořádání experimentu pro ověření sekvence 1D ISIS na fantomu a výsledek *in vivo* vyšetření myokardu zdravého dobrovolníka a pacienta s transplantovaným srdcem (20). Získaná *in vivo* spektra kromě signálů metabolitů myokardu obsahují silný signál 2,3-difosfoglycerátu z krve a také mohou být kontaminována signály z okolních svalů. Tyto signály lze eliminovat pouze matematicky a pro tento účel byl vytvořen software SOFIS (21). Na obrázku 5B je typické spektrum dobrovolníka a pacienta s transplantovaným srdcem, ve kterém je vidět silný signál již zmíněného 2,3-difosfoglycerátu. U pacienta po transplantaci s mírnou rejekcí je také patrné zmenšení signálu PCr charakteristické pro ischemické procesy. V *in vivo* studiích bylo u srdce nalezeno, že jak hypertrofická, tak i dilatační kardiomyopatie snižují poměr PCr/ATP (22). Zajímavá je také korelace poměrů PCr/ATP naměřená při 1,5 T s nárůstem hmotnosti levé komory u pacientů s Fabryho nemocí (23).

Vyšetřování jater a ledvin

Od roku 2014 se na MR oddělení v IKEM využívá ^{31}P MR spektroskopie pro studium energetického metabolismu jater na 3 T MR tomografu. Tyto studie se provádějí v rámci sledování pacientů před a po transplantaci jater v dlouhém časovém úseku. Rutinní ^{31}P MR spektrum při 3 T naměřené povrchovou cívkou je zobrazeno na obrázku 6. Ve spektru lze identifikovat všechny již zmíněné metabolity, ale přítomnost signálu fosfokreatinu znamená pouze příměs z okolní svalové tkáně.

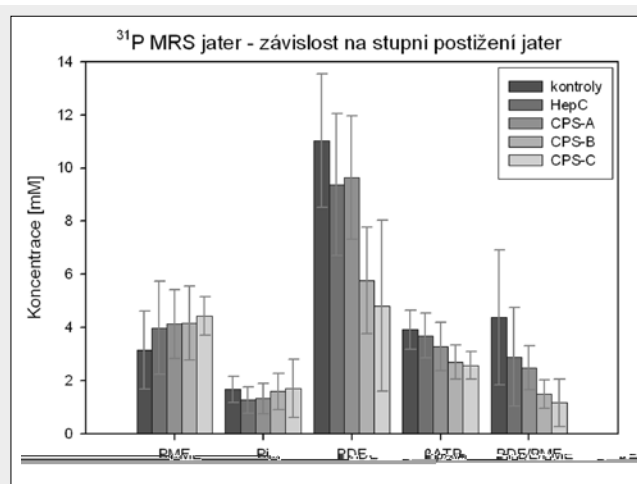
V současných studiích se využívá zkušeností, které jsme získali při vyšetřování jater na 1,5 T MR tomografu. Dva grantové projekty na 1,5 T MR tomografu byly zaměřeny na energetický metabolismus jater při různém stupni jejich poškoze-



▲ Obr. 6

Obr. 6. ^{31}P MR spektrum jater zdravého dobrovolníka. Měřeno povrchovou cívkou a sekvencí 1D ISIS při 3 T (VOI ~ 100 ml, 128 akvizic, TR = 2 s). Signály ve spektru: PME – fosfomonoestery, Pi – anorganický fosfát, PDE – fosfodiester, PCr – fosfokreatin (kontaminace z okolní svalové tkáně), ATP – adenosintrifosfát (signály α , β , γ ; při dobrém shimu je pozorovatelné štěpení signálů J-couplingem), NADH – nikotinamidadenindinukleotid (signál se překrývá se signálem α ATP) (IKEM 2017)

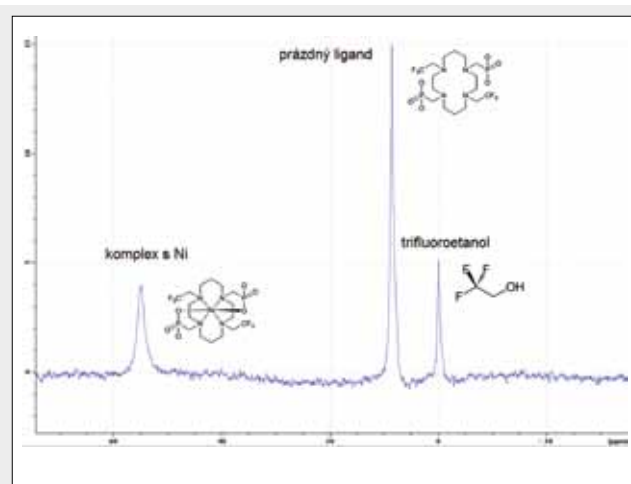
Fig. 6. ^{31}P MR spectrum of the liver of a healthy volunteer. Spectrum obtained with surface coil and 3D ISIS sequence at 3T (VOI ~ 100 ml ml, 128 acquisitions, TR 2s). Signals in the spectrum: PME – phosphomonoesters, Pi – inorganic phosphate, PDE – phosphodiester, PCr – phosphocreatine (contamination from surrounding tissue), ATP – adenosintriphosphate (α , β , γ signals; J-coupling is visible if the shim is good enough), NADH – nicotinamide adenine dinucleotide (its signal is overlapped with α ATP signal) (IKEM 2017)



▲ Obr. 7

Obr. 7. Graf závislosti koncentrace (mM) vybraných ³¹P metabolitů na funkčním stupni postižení jater pacientů s chronickou hepatitidou C. HepC – pacienti v precirhotickém stadiu, CPS-A, CPS-B, CPS-C – pacienti s cirhózou jater definovanou stupněm Childova-Pughova skóre Fig. 7. Concentrations of ³¹P MR metabolites (mM) according to the degree of liver injury in patients with chronic hepatitis C. Kontroly – healthy volunteers; HepC – precirrotic patients, CPS-A, CPS-B, CPS-C – patients with liver cirrhosis defined by the Child-Pugh score

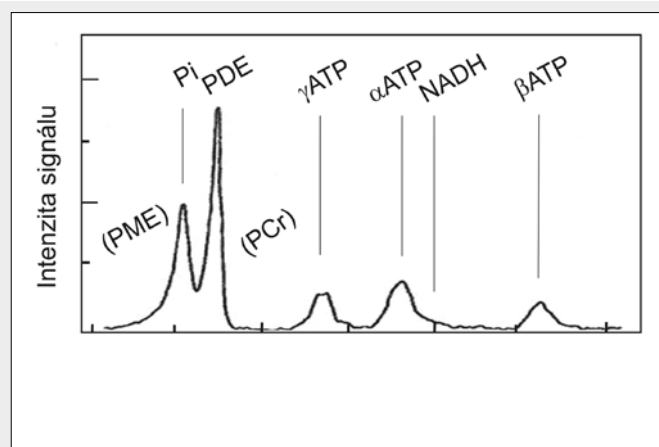
ni. K vyšetřování nemocných byla použita sekvence 2D-CSI a duální ³¹P/¹H povrchová cívka. Pro vyhodnocení byla zavedena metodika absolutní kvantifikace vybraných fosforových metabolitů (24). U pacientů s potvrzenou cirhózou jater bylo



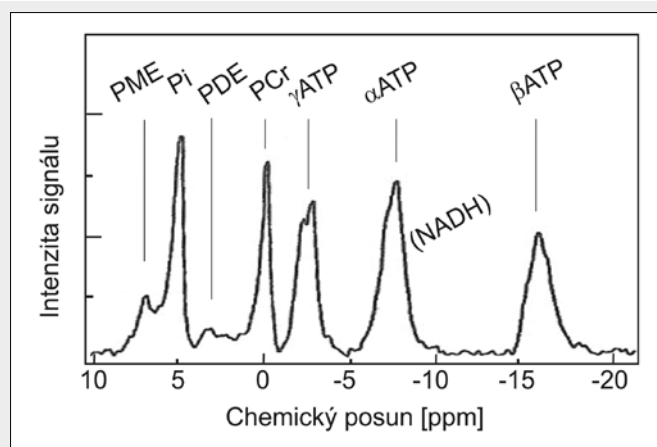
▲ Obr. 9

Obr. 9. ¹⁹F MR spektrum fantomu se třemi rozdílnými sloučeninami. Nejvyšší signál (uprostřed) odpovídá fluorovanému ligandu na bázi tetraazacyclotetradekanu, signál vlevo téže sloučenině s navázaným iontem niklu, který způsobuje výrazný chemický posun. Jako reference byl použit trifluoroethanol (pravý signál). Všechny tři sloučeniny mají všechny své fluorové ionty magneticky ekvivalentní, proto každou sloučeninu ve spektru reprezentuje jeden signál. Fig. 9. ¹⁹F MR spectrum of a phantom containing three different compounds. The highest signal (middle) corresponds to a fluorinated ligand based on tetraazacyclotetradecane, the left signal corresponds to the complex of the same compound with nickel ion, which causes a distinct chemical shift. Trifluoroethanol (right signal) was used as a reference. All the three compounds have their fluorine ions magnetically equivalent; therefore, each of them is represented by a single signal.

možné pozorovat odlišný metabolický profil skupin pacientů s alkoholickou, virovou (hepatitida B a C) a biliární etiologií. Navíc byla nalezena velmi dobrá korelace koncentrací jednotlivých metabolitů se stupněm dysfunkce jater popsané Chil-

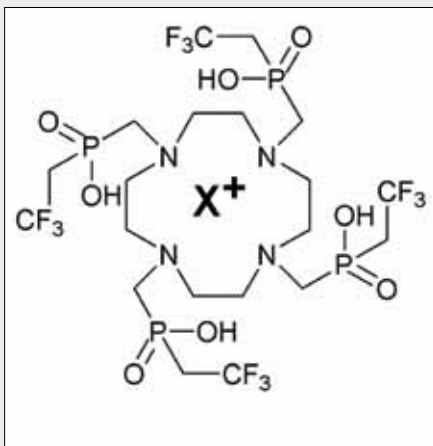


▲ Obr. 8A

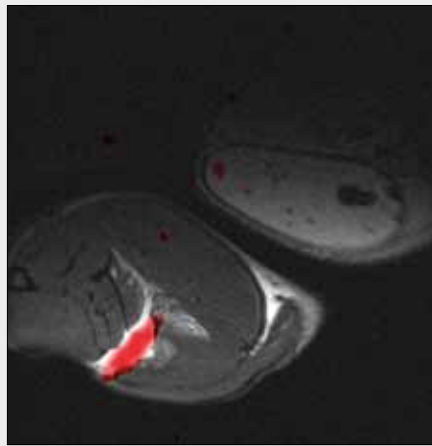


▲ Obr. 8B

Obr. 8. In vitro ³¹P MR spektrum ischemického psiho myokardu v St. Thomas kardioplegickém roztoku, spektra měřena povrchovou cívkou a neložovanou sekvencí FID (512 akvizic, TR = 2 s, 1,5 T). A – spektrum na počátku ischemie po vyjmutí orgánu; B – spektrum po 8 hodinách ischemie. Signály ve spektru: PME – fosfomonoestery, Pi – anorganický fosfát, PDE – fosfodiestery, PCr – fosfokreatin, ATP – adenosintrifosfát (signály α, β, γ) (IKEM 1991) Fig. 8. In vitro ³¹P MR spectrum of ischemic dog heart in St. Thomas cardioplegic solution, spectra measured with the surface coil and nonlocalized FID sequence (512 acquisitions, TR = 2 s, 1.5T). A – spectrum at the beginning of ischemia; B – spectrum 8 hours later. Signals in the spectra: PME – phosphomonoesters, Pi – inorganic phosphate, PDE – phosphodiesteres, PCr – phosphocreatine, ATP – adenosintriophosphate (α, β, γ signals) (IKEM 1991)



▲ Obr. 10A



▲ Obr. 10B

Obr. 10. ^{19}F MR zobrazení pomocí komplexu DOTPtfе (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluoroethyl)fosfinové kyseliny]). A – struktura komplexu s kationem lanthanoidu (X^+) má 12 magneticky ekvivalentních fluorových jader; B – fluorové zobrazení (červená oblast, sekvence turbospinového echa) po injekční aplikaci kontrastní látky DOTPtfе-Yb do lýtku potkana na pozadí standardního ^1H MR obrazu (T2-vážená turbospinová sekvence). ^{19}F MR obraz byl interpolován na velikost matice ^1H MR obrazu.

Fig. 10. ^{19}F MR imaging using a complex DOTPtfе (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluoroethyl)fosfin acid]). A – complex structure with a lanthanoid cation (X^+) has 12 magnetically equivalent fluorine nuclei. B – fluorine imaging (red scale, turbospin echo sequence) after application of the contrast agent DOTPtfе-Yb into the calf muscle of a rat overlaid over the background of a standard ^1H MR image (T2-weighted turbospin echo sequence). The ^{19}F MR image was interpolated to match the size of the ^1H MR image.

dovým-Pughovým skóre jak nezávisle na etiologii, tak i v jednotlivých etiologických skupinách (3). Výsledky lze shrnout ve zjištění, že zatímco fosforový metabolismus jater s biliárním původem cirhózy se příliš nelišil od jater zdravých, alkohol vedl ke sníženým koncentracím ATP, Pi a PDE a virová etiologie ukázala signifikantní změny pouze v ATP a PDE, zato s poklesem PDE u pokročilejších stupňů cirhózy mnohem výraznějším. Příklad rozdílů v koncentracích metabolitů při různých stádiích funkčního poškození jater je na obrázku 7.

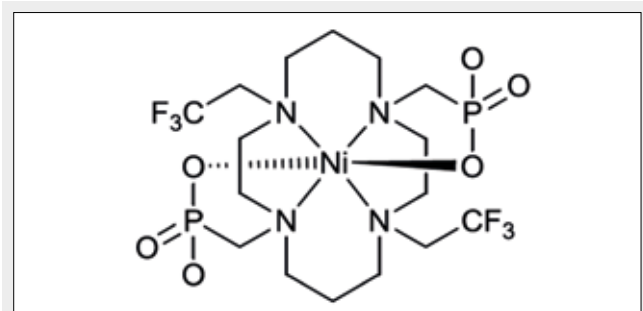
Další krok vedl k precirhotickým stádiím poškození jater. Pro analýzu byla vybrána skupina pacientů s chronickou hepatitidou C s různým stupněm fibrózy. V tomto případě však nebyla ^{31}P MR spektroskopie dostatečně citlivá, aby prokázala signifikantní rozdíly ve spektrech od zdravých dobrovolníků nebo pacientů s nekomplikovanou jaterní cirhózou (obr. 7). Rozdíly také nebyly nalezeny v souvislosti s úspěšností antivirové léčby.

Obdobná technika jako technika vyšetřování jater byla použita i u vyšetřování ledvin po transplantaci (25) k odlišení typu jejich selhávání.

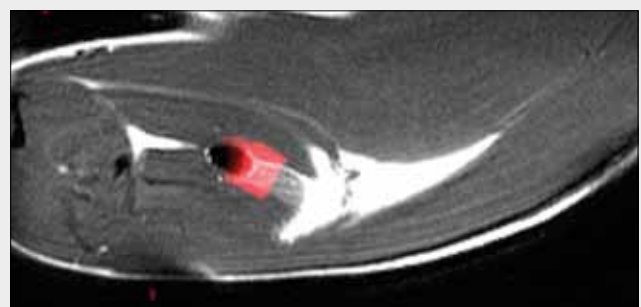
EXPERIMENTÁLNÍ ^{31}P MRS

Velký průměr otvoru celotělového magnetu umožňuje konstrukci potřebných zařízení pro provádění různých *in vitro* experimentů, např. s perfundovanými orgány. Na konci osmdesátých a počátku devadesátých let 20. století byly prováděny ^{31}P MR experimenty se zvířecími srdci a ledvinami. Později k tomu přistoupilo i hodnocení viability kadaverózních ledvin určených pro transplantaci (26). Byl proto zkonstruován speciální box (27, 28), který umožňoval měření ^{31}P a ^1H MR spekter společně s MR zobrazováním při různých teplotách, a tak byl sledován průběh ischemie *in vitro* na psích srdcích (29). Tyto studie se zabývaly vlastnostmi různých kardioplegických roztoků na uchování metabolických funkcí buněk srdce. Na změnách intenzit signálů ve spektrech psího myokardu (obr. 8) je velmi dobře vidět, jak se mění koncentrace základních energetických metabolitů v průběhu ischemie, kdy s časem klesá koncentrace PCr a zvětšuje se signál Pi.

Tento experiment, stejně jako první experimenty provedené Houltlem (30) a mnoha dalšími, ukazuje na možnosti studia ischemie, které se mimo jiné využívají ve výše popsané dynamické *in vivo* MR spektroskopii.



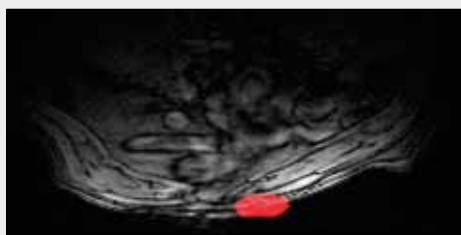
▲ Obr. 11A



▲ Obr. 11B

Obr. 11. ^{19}F MR zobrazení pomocí komplexu na bázi tetraazacyklotetradekanu s niklem. A – struktura komplexu s šesti magneticky ekvivalentními fluorovými jádry; B – ^{19}F MR obraz (červená oblast, sekvence gradientního echa) po injekční aplikaci kontrastní látky na bázi komplexu niklu do lýtku potkana na pozadí standardního ^1H MR obrazu (T2-vážená turbospinová sekvence). Kontrastní látka je přesně lokalizovatelná jako hypointenzní oblast i na ^1H MR obrazu.

Fig. 11. ^{19}F MR imaging with nickel complex of tetraazacyclotetradecane. A – the structure of the complex with six magnetic equivalent fluorine cores; B – ^{19}F MR image (red area, gradient echo sequence) after the injection of the complex into the rat calf; ^{19}F image is on the background of ^1H MR image (T2 turbo-spine sequence). Contrast agent is localized as hypointensive area in ^1H MR image too.



▲ Obr. 12

Obr. 12. **Transverzální zobrazení břišní dutiny potkana.** ^{19}F MR obraz (červená oblast, sekvence turbospinového echa) po injekční aplikaci fluorovaných nanočástic do podkoží potkana na břiše je zobrazen na pozadí standardního ^1H MR obrazu (T_2 -vážená turbospinová sekvence).

Fig. 12. **A transversal image of the rat abdominal cavity.** ^{19}F MR image (red scale, turbospin echo sequence) after subcutaneous application of fluorinated nanoparticles is overlaid over a standard ^1H MR image (gray scale, T_2 -weighted turbospin echo sequence).

Kromě různých *in vitro* testů při 3 T byly prováděny i další experimenty na zvířecích modelech, např. miniprasatech. ^{31}P MRS studie (31) Huntingtonovy nemoci byly věnovány ne zcela běžně vyšetřovanému orgánu – a to kančím varlatům. Byly tím doplněny ^1H MRS studie kančího mozku (32).

EXPERIMENTÁLNÍ FLUOROVÁ MAGNETICKÁ REZONANCE

Vybavení MR oddělení IKEM experimentálním MR přístrojem v roce 1999 pracujícím s magnetickým polem 4,7 T určeným především pro vyšetřování drobných hlodavců umožnilo rozšířit klinický výzkum i o výzkum experimentální, kam patří v poslední době i fluorová (^{19}F) MR spektroskopie a ^{19}F MR zobrazování. ^{19}F je jediný stabilní izotop fluoru, jehož zastoupení v přírodě je 100%. ^{19}F má vzhledem k téměř srovnatelnému gyromagnetickému poměru rezonanční frekvenci blízkou vodíku ^1H a vykazuje i srovnatelnou citlivost (tab. 1). Pro ^{19}F zobrazování (případně spektroskopii) lze proto využít standardní protonový kanál a fluorová vysokofrekvenční cívka představuje jedinou nezbytnou speciální část hardwaru.

Koncentrace fluoru v živých organismech je prakticky nulová, pro zobrazování je nutné používat fluorové kontrastní látky. Protože běžná tkáň v ^{19}F MR obrazech neposkytuje žádný signál, zobrazování se provádí jako tzv. „hot spot“ imaging, kdy se specifický fluorový signál kontrastní látky zobrazí v barevné škále proti standardnímu anatomickému protonovému MR obrazu.

Přestože citlivost detekce jader fluoru a vodíku je srovnatelná, citlivost ^{19}F MR zobrazení je nesrovnatelně nižší kvůli velmi nízké koncentraci fluorové kontrastní látky, která se *in vivo* pohybuje v řádu jednotek mM (tj. zhruba o čtyři řády nižší než koncentrace vodíkových jader). Pro zvýšení citlivosti se ^{19}F MR obrazy měří s nižší maticí, s delšími akvizičními časy a pro zpřesnění lokalizace se používají anatomické ^1H MR obrazy změřené s vysokým prostorovým rozlišením. Koncentraci fluorových jader v kontrastních látkách lze zvýšit vazbou většího množství jader fluoru na molekulu kontras-

tu nebo tvorbou nanočástic. Obě metody lze též kombinovat. V ideálním případě jsou všechna fluorová jádra magneticky ekvivalentní (jsou navázána na molekulu symetricky) a ve spektru kontrastní látky je jediný signál, jehož chemický posun je dán chemickou strukturou, v případě fluorovaných chelátů pak chelátovaným iontem (obr. 9). Pak lze látku bez problémů využít pro zobrazování. V opačném případě se ve spektru objeví více signálů, které mají za následek vznik artefaktů způsobených chemickým posunem. Pro prostorovou lokalizaci kontrastní látky s více signály je proto nezbytné využít spíše spektroskopického zobrazování.

Na našem pracovišti jsme testovali kontrastní látky na bázi fluorovaných cyklických chelátů nesoucích 12 nebo 6 magneticky ekvivalentních fluorových iontů (33) připravené na Přírodovědecké fakultě UK. Vzhledem k velikosti a charakteru molekul by se mohly tyto látky uplatnit pro zobrazování při přímé aplikaci látky do vyšetřované oblasti nebo při systémovém podání.

Cheláty mohou navíc vázat paramagnetický kation (obr. 10A); výsledný komplex pak má výrazně kratší relaxační časy, což umožňuje podstatně zkrátit akviziční čas a po optimalizaci měřicí sekvence zlepšit citlivost detekce zvýšeným počtem akvizic (34). Testovány byly např. komplexy DOTPtfé (1,4,7,10-tetraazacykloodekan-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluorethyl)fosfinové kyseliny]) s ionty lanthanoidů Dy, Tm, Ho, Yb, Ce. Tabulka 2 názorně ukazuje, jak ionty lanthanoidů výrazně zkracují relaxační časy fluoru vázaných na cheláty. Na obrázku 10B je ^{19}F MR zobrazení kontrastní látky po přímé aplikaci do lýtkového svalu potkana.

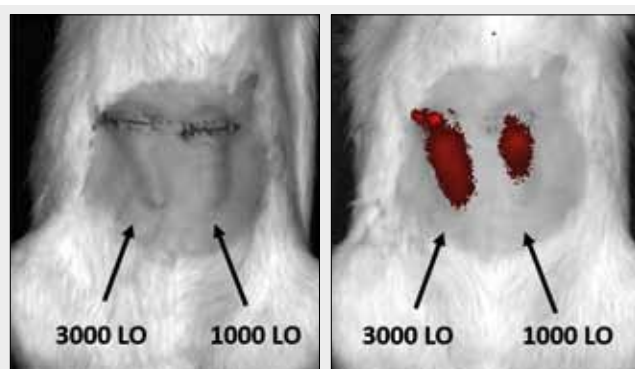
Komplex s niklem založený na tetraazacyklotetradekanu se šesti magneticky ekvivalentními fluorovými jádry (obr. 11A) má relaxační časy v řádu milisekund ($T_1 = 4,2$ ms, $T_2 = 1,8$ ms, $T_2^* = 1,1$ ms) (33), což umožňuje extrémní zkrácení měřicí sekvence a zvýšení poměru signál/šum více akvizicemi. Plný potenciál této kontrastní látky však bude možné využít až v kombinaci se sekvencí ultrakrátkého echa, která bohužel není na experimentálním přístroji nyní dostupná. Zajímavostí je i poměrně vysoká protonová relaxivita komplexu s niklem ($r_1 = 0,12$ s $^{-1}$ /mM, $r_2 = 0,15$ s $^{-1}$ /mM), která umožňuje detekci kontrastní látky i na vodíkových obrazech. Fluorové zobrazení tak poskytne specifitu přesně lokalizovanému protonovému signálu na ^1H MR obrazech (obr. 11B) (35).

Zajímavé možnosti nabízejí kontrastní látky na bázi nanočástic. Ve spolupráci s univerzitou v Nijmegenu jsme testovali nanočástice tvořené kopolymerem kyseliny polymlečné a polyglykolové (PLGA), ve kterých je uzavřen perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) a optická značka indocyanine green (ICG) pro fluorescenční zobrazování (36). Nanočástice lze využít pro zobrazení po přímé aplikaci (obr. 12), ale zejmé-

Tab. 2. ^{19}F relaxační časy komplexů DOTPtfé s lanthanoidy Ce, Yb, Tm, Dy a Ho

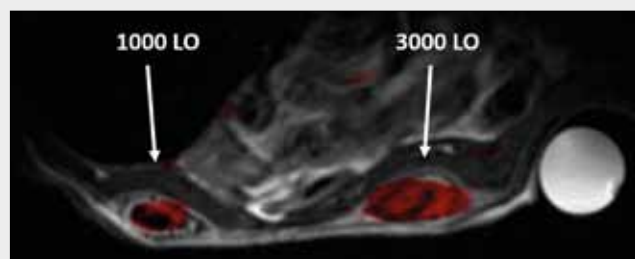
Table 2. ^{19}F relaxation times of DOTPtfé complexes with lanthanides Ce, Yb, Tm, Dy and Ho

	T1 (ms)	T2 (ms)	T2* (ms)
DOTP-TFE-Ce	290 ± 24	124,4 ± 0,9	3,1 ± 0,3
DOTP-TFE-Yb	113 ± 3	72,1 ± 1,0	1,44 ± 0,07
DOTP-TFE-Tm	7,6 ± 0,6	5,3 ± 1,3	1,36 ± 0,06
DOTP-TFE-Dy	9,1 ± 0,6	6,0 ± 0,2	1,14 ± 0,04
DOTP-TFE-Ho	10,0 ± 0,6	7,9 ± 0,4	1,10 ± 0,04



▲ Obr. 13A

▲ Obr. 13B



▲ Obr. 13C

Obr. 13. **Transplantace a zobrazení Langerhansových ostrůvků (LO) značených nanočásticemi pro multimodální zobrazení.** A – fotografie břicha potkana, v podkoží se rýsují implantované komůrky. Do levé komůrky (na fotografii vpravo) bylo transplantováno 1000 ostrůvků, do pravé 3000 ostrůvků. B – fluorescence ostrůvků in vivo. Vyšší signál pochází z komůrky s vyšším počtem ostrůvků. C – transversální ^{19}F MR zobrazení transplantovaných Langerhansových ostrůvků (červená) na pozadí anatomického ^1H MR obrazu břišní dutiny potkana s implantovanými komůrkami

Fig. 13. **Transplantation and imaging of pancreatic (Langerhans) islets (LO) labeled by nanoparticles for multimodal imaging.** A – a photograph of the abdominal area of the rat, the implanted scaffolds for islet transplantation are outlined under the skin. 1,000 and 3,000 pancreatic islets were transplanted into the left (on the right side of the photograph) or into the right scaffold respectively. B – fluorescence imaging of the islets in vivo. The scaffold containing a higher number of islets provides a higher optical signal. C – transversal ^{19}F MR image of the transplanted pancreatic islets (red scale) overlaid over the anatomical ^1H MR image of the abdominal cavity of the rat with implanted scaffolds

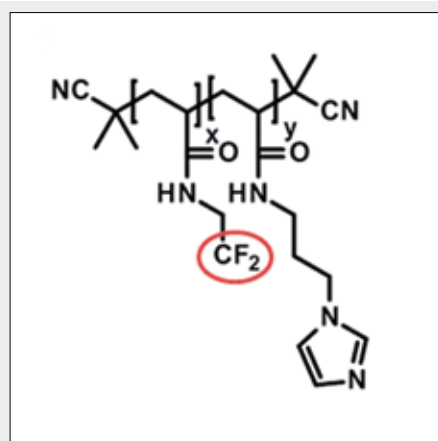
na pro značení a následnou detekci transplantovaných buněk a malých buněčných útvarů.

Na našem pracovišti jsme nanočástice využili pro značení izolovaných Langerhansových ostrůvků potkana určených pro transplantaci. Ostrůvky byly značeny prostou inkubací (endocytickým procesem) s nanočásticemi v médiu, nebo pomocí mikroporace; elektrickým polem se naruší membrána mikroporovaných buněk, což usnadní průchod nanočástic dovnitř buněk, a následně se nechá membrána opět zacelit. Takto značené ostrůvky byly transplantovány do umělých komůrek implantovaných do podkoží na břicho potkana. ^{19}F MR zobrazení doplněné fluorescenčním optickým zobrazováním (obr. 13) prokázalo viabilitu ostrůvků po transplantaci a perspektivu umělých struktur pro transplantaci ostrůvků (37).

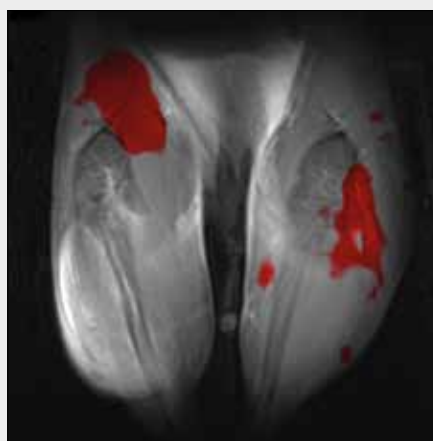
Potenciálně velmi zajímavou aplikací ^{19}F MRI je sledování lokálně aplikovaných polymerních nosičů léčiv. Ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie Akademie věd ČR byly testovány také termoresponzivní a pH-senzitivní látky, které při teplotách nad $20\text{ }^\circ\text{C}$ změni fázi z tekuté na pevnou. Po aplikaci do živého systému nosič díky teplotou indukovanému zesíťování vytvoří v místě podání pevný depozit. Chemická struktura těchto látek umožňuje snadné navázání léčiv a pevná polymerní struktura zároveň zajistí stabilní lokalizaci. Díky navázanému fluoru je možné nosič dlouhodobě sledovat pomocí ^{19}F MR (obr. 14), a proto mají tyto látky velký potenciál pro teranostické (terapie + diagnostika) využití např. v lokální léčbě nádorů (38).

ZÁVĚR

In vivo MR spektroskopie X-jader zahrnuje v současné době řadu experimentů s různými izotopy. Z nich, v současné době, pouze fosforová MR spektroskopie nachází uplatnění v klinické diagnostice. Ostatní jádra, jako jsou ^{19}F , ^{13}C , ^{23}Na a další, nacházejí uplatnění v klinických experimentech a v oblasti molekulárního a buněčného zobrazování. Dá se však očekávat, že s příchodem 7 T MR tomografů do klinické praxe se okruh využití těchto jader rozšíří.



▲ Obr. 14A



▲ Obr. 14B

Obr. 14. **Aplikace polymerního nosiče potkanovi in vivo.** A – chemická struktura polymerního termoresponzivního a pH-senzitivního nosiče; B – ^{19}F MR obraz (červená oblast, sekvence turbospinového echa) přeložený přes anatomický ^1H MR obraz potkana s aplikovanými polymerními nosiči do podkoží (vlevo) a do lýtkového svalu (vpravo)

Fig. 14. **Application of a polymer delivery system to the rat in vivo.** A – chemical structure of the thermoresponsive and pH-sensitive polymer system; B – ^{19}F MR image (red scale, turbospin echo sequence) overlaid over the anatomical ^1H MR image of the rat with the applied polymer delivery system subcutaneously (left) and into the calf muscle (right)

LITERATURA

1. **Bottomley PA, Edelstein WA, Foster TH, Adams WA.** In vivo solvent-suppressed localized hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy: a window to metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(7): 2148–2152.
2. **Gladys H, Fuller J.** Nuclear spins and moments. *Phys Chem Ref* 1976; 5: 835.
3. **Dezortova M, Taimr P, Skoch A, Spicak J, Hajek M.** Etiology and Functional Status of Liver Cirrhosis by 31P MR Spectroscopy. *World J Gastroenterol* 2005; 11(44): 6926–6931.
4. **Hájek M, Palyzová D, Kořínek M, Kurková D.** Concentrations of free Mg²⁺, pH and 31P MR Metabolite Ratios in Calf Muscles of Healthy Controls and Patients with Primary Juvenile Hypertension. *Physiol Res* 2002; 51: 159–167.
5. **Kemp GJ, Radda GK.** Quantitative interpretation of bioenergetic data from 31P and 1H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q* 1994; 10(1): 43–63.
6. **Argov Z, Bank WJ, Maris J, Peterson P, Chance B.** Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies: phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Neurology* 1987; 37(2): 257–262.
7. **Kemp GJ, Ahmad RE, Nicolay K, Prompers JJ.** Quantification of skeletal muscle mitochondrial function by 31P magnetic resonance spectroscopy techniques: a quantitative review. *Acta Physiol* 2015; 213(1): 107–144.
8. **Hájek M, Šedivý P, Kovář J, Dezortová M.** Dynamická in vivo 31P MR spektroskopie člověka. *Chem Listy* 2017; 111: 516–523.
9. **Hájek M, Horská A, Belán A, Táborský P, Grosmanová A.** Application of 31P MR spectroscopy for study of human muscles in vivo (Czech). *Prakt. Lék.* 1990; 70: 538–544.
10. **Táborský P, Sotorník I, Kašlíková J, et al.** Uremická myopatie v obraze magnetické rezonanční spektroskopie. *Prakt. Lék.* 1991; 71: 303–306.
11. **Táborský P, Sotorník I, Kašlíková J, et al.** 31P Magnetic resonance spectroscopy investigation of skeletal muscle metabolism in uraemic patients. *Nephron* 1993; 65: 222–226.
12. **Hájek M, Grosmanová A, Horská A, et al.** Initial clinical experience using the method of 31P MR spectroscopy in investigations of neuromuscular diseases in children. *Čes Slov Neurol N* 1991; 54/87: 149–156.
13. **Hájek M, Grosmanová A, Horská A, Urban P.** Comparison of the clinical state and its changes in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy with results of in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy. *Eur Radiol* 1993; 3(6): 499–506.
14. **Kratochvílová S, Vyhnanovská P, Vlasáková Z, et al.** Metabolic characteristics of soleus muscle in relation to insulin action in the offspring of hypertensive parents. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2006; 55(10): 1388–1396.
15. **Resnick LM.** Cellular ions in hypertension, insulin resistance, obesity, and diabetes: a unifying theme. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3(4 Suppl): S78–85.
16. **Štich V, Hájek M, Horská A.** Effect of very low-energy diet on muscle bioenergetics at rest and during exercise: A 31-P in vivo NMR spectroscopy study. *Obesity in Europe 1991* (Ailhaud G, et al. (eds.)), 23–27. *J Libbey and Comp Ltd* 1991.
17. **Sedivý P, Kipfelsberger MC, Dezortova M, et al.** Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys* 2015; 42(4): 1678–1689.
18. **Chmelik M, Povazan M, Jiru F, et al.** Flip-angle mapping of 31P coils by steady-state magnetic resonance spectroscopic imaging. *J Magn Reson Imaging* 2014; 40(2): 391–397.
19. **Němcová A, Dubský M, Jirkovská A, et al.** Diabetic foot syndrome: importance of calf muscles MR spectroscopy in the assessment of limb ischemia and effect of revascularization. *Vnitř. Lék.* 2017; 63(4): 236–241.
20. **Horská A.** Využití magnetické rezonance při diagnostice morfologických změn v myokardu. *Závěrečná zpráva grantu IGA 0106-3*, 1993.
21. **Kessler P.** Program SOFIS pro vyhodnocování 31P MR spekter, SIB, 1990.
22. **Horská A, Fridl P, Hájek M, et al.** 31P in vivo MR spectroscopy of myocardium (Czech). *Prakt. Lék.* 1992; 72: 103–106.
23. **Palecek T, Bultas J, Hajek M, et al.** Association between cardiac energy metabolism and gain of left ventricular mass in Fabry disease. *Int J Cardiol* 2010; 144: 337–339.
24. **Tošner Z, Dezortová M, Tintěra J, Hájek M.** Application of two-dimensional CSI for absolute quantification of phosphorus metabolites in the human liver. *Magn Reson Mater Phy* 2001; 13: 40–46.
25. **Vyhnanovska P, Dezortova M, Herynek V, et al.** In vivo 31P MR spectroscopy of human kidney grafts using the 2D-chemical shift imaging method. *Transplant Proc* 2011; 43(5): 1570–1575.
26. **Kurková D, Herynek V, Gintelová J, Táborský P, Hájek M.** Potential of the 31P MR spectroscopy in monitoring of the viability of human grafts stored in euro-collins perfusion solution. *Physiol Res* 1995; 44: 327–332.
27. **Hájek M, Bohm F.** Temperature Probe for organ examination using 31P spectroscopy and 1H MR imaging. *Cryo Letters* 1990; 11: 401–404.
28. **Kurkova D, Hájek M.** A stable-temperature container suitable for 31P MRS and 1H MRI examination of organs in hypothermia. *Cryo Letters* 1994; 15: 267–268.
29. **Horská A, Vavřínková H, Hájek M, et al.** Phosphate pool of isolated dog heart during global ischemia: comparison of two. *Cardioplegic solutions with 31P MR spectroscopy.* *Physiol Res* 1991; 40: 427–436.
30. **Hoult DI, Busby SJ, Gadian DG, et al.** Observation of tissue metabolites using 31P nuclear magnetic resonance. *Nature* 1974; 252(5481): 285–287.
31. **Jozefovicova M, Herynek V, Jiru F, et al.** 31P MR Spectroscopy of the testes and immunohistochemical analysis of sperm of transgenic boars carried n-terminal part of human mutated huntingtin. *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(Suppl 2): 2S28–2S33.
32. **Jozefovicova M, Herynek V, Jiru F, et al.** Minipig model of Huntington's disease: (1) H magnetic resonance spectroscopy of the brain. *Physiol Res* 2016; 65(1): 155–163.
33. **Blahut J, Hermann P, Gálisová A, et al.** Nickel(II) complexes of N-CH₂CF₃ cyclam derivatives as contrast agents for 19F magnetic resonance imaging. *Dalton Trans* 2016; 45(2): 474–478.
34. **Herynek V, Martinisková M, Gálisová A, et al.** Contrast agents with chelated lanthanoid ions for 19F MR imaging. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2014; 22: 3837.
35. **Herynek V, Gálisová A, Blahut J, et al.** A probe for a combined 1H and 19F in vivo MRI. *World Molecular Imaging Meeting, NY* 2016; control ID 2493856.
36. **Srinivas M, Cruz LJ, Bonetto F, et al.** Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging. *Biomaterials* 2010; 31(27): 7070–7077.
37. **Herynek V, Gálisová A, Srinivas M, et al.** Pre-microporation improves outcome of pancreatic islet labelling for optical and 19F MR imaging. *Biological Procedures Online* 2017; 19: 6.
38. **Jiráček D, Gálisová A, Sedláček O, Hrubý M, Hájek M.** A novel theranostic thermoresponsive 19F probe for tumor imaging. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2017; 25: 3588.

Impaktované publikace
mimo téma dizertační práce

Influence of Breathing on the Measurement of Lipids in the Myocardium by ¹H MR Spectroscopy

M. DROBNY¹, P. SEDIVY¹, M. DEZORTOVA¹, D. WAGNEROVA¹, M. HAJEK¹

¹MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Received July 17, 2015

Accepted July 31, 2015

Summary

The myocardium examination by MR spectroscopy is very challenging due to movements caused by the cardiac rhythm and breathing. The aim of the study was to investigate the influence of breathing on the quantitative measurement of lipid/water ratios in different groups of volunteers and different measuring protocols. We examined the lipid content of myocardium at 3T using the proton single voxel spectroscopy. Three protocols (free breathing, breath hold and the use of respiratory navigator) controlled by ECG were used for the examination of 42 adult volunteers including 14 free divers. Spectra were evaluated using jMRUI software. An average content of lipids in the healthy interventricular septum, gained by all protocols was equal to 0.6 %, which is in agreement with other published data. Based on the quality of examinations and the highest technical success, the best protocol seems to be the one containing a respiratory navigator since it is more acceptable by patients. Based on our results and the literature data we can conclude that MR spectroscopy is able to distinguish patients from controls only if their myocardial lipid content is higher than 1.6 % (mean value of lipids plus two standard deviations).

Key words

Lipid content • Myocardium • Artifacts • 3T • ¹H MR spectroscopy

Corresponding author

M. Dezortova, MR-Unit, Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic.
Fax: +420-24172 8224. E-mail: mode@medicon.cz

Introduction

The first *in vivo* ¹H MR spectra of the myocardium were measured in the early 1990s (Kreis *et al.* 1998) and so far the majority of data have been obtained at magnetic field 1.5T (Table 1). A typical spectrum of the myocardium shows signals of lipids in the area of aliphatic protons (0.7-2.5 ppm) and water (4.7 ppm) which is used as a standard for the calculation of fat content in the myocardium. Some authors also describe a signal of the methyl group of creatine/phosphocreatine with the chemical shift of 3.0 ppm and signal at 3.2 ppm corresponding to the protons of the betaine group of water soluble choline-containing compounds (Kreis *et al.* 1998).

In the heart of adults, 60-80 % of adenosine triphosphate (ATP) comes from beta-oxidation of fatty acids (FA). Esterified FAs are a major source of lipids for human heart. All tissues obtain lipids from free FAs associated with albumin, lipoproteins, and *de novo* synthesis, which is supposed to play a minor role in heart lipid metabolism. An imbalance between FA uptake and oxidation leads to accumulation of long chain FAs in form of triglycerides (TG) and phospholipids. Redundant lipids, especially TG, are stored in lipid droplets and can cause lipotoxic myopathy. These droplets were found in hearts e.g. of patients suffering from diabetes mellitus and metabolic syndrome (Goldberg *et al.* 2012).

¹H MR spectra of the myocardium may be used to determine the lipid concentration in the cardiac tissue. Fat in myocytes is an early manifestation of the type 2 diabetes mellitus and it is also typical for population suffering from obesity (Rijzewijk *et al.* 2008, McGavock

et al. 2006). Previous research has shown that heart failure may be associated with excessive lipolysis and lipotoxic myocytes damage (Sharma *et al.* 2004). Measurement of fat distribution in the myocardium provides useful information about the degree of its loading and damage.

In most cases, the single voxel spectroscopy (SVS) has been used to acquire ^1H MR spectra from the myocardium. The measured volume of interest (VOI) is typically placed on the septum separating the right and left ventricles with the VOI size of several cubic centimeters. The ratio of signal intensity of lipids (Lip,

triglycerides) to the unsuppressed water signal is usually used for the quantification. Table 1 summarizes these ratios together with measurement parameters obtained for healthy controls by several authors. Recently, the use of new scanners with a higher magnetic field (3T) and new sequences has had the ability to increase sensitivity and to partly eliminate the influence of some artifacts; nevertheless, the obtained results are very similar to the results obtained at 1.5T (Table 1). Similar examinations can also be implemented using the MR imaging methods (Liu *et al.* 2010).

Table 1. Studies concerned the measurement of lipid content in myocardium. According Pubmed up to April 2015.

First Author	B ₀ [T]	Method	Sequence	Technique	TR [ms]	TE [ms]	VOI [ml]	Relaxation time correction	Lipids/water [%]
Liu 2010	3	MRI	Dual-echo SPGR	BH	6.3	2.46 (3.69)		T ₂ *	1.04±0.40
Liu 2010	3	MRS	PRESS	BH	R-R wave	30		T ₂ *	0.7±0.5
Rial 2011	3	MRS	STEAM	BH	4000	10	8-16	None	0.46±0.20
Winhofer 2012	3	MRS	PRESS	BH	700-1250	30	6	T ₁ ,T ₂	0.5±0.4* (0.20±0.17)
Krssak 2011	3	MRS	PRESS	RN	According breathing	30	6	T ₁ ,T ₂	1.0±0.5* (0.4±0.2)
van der Meer 2007a	1.5	MRS	PRESS	RN	>3000	26	8	None	0.38±0.02
Hammer 2008b	1.5	MRS		RN	3000	26	8	None	0.35±0.14
Schrauwen-Hinderling 2010	1.5	MRS	PRESS	RN	4000	26	6	None	0.99±0.15
van der Meer 2007b	1.5	MRS	PRESS	RN	>3000	26	8	None	0.38±0.05
Bilet 2011	1.5	MRS	PRESS	RN	4000	26	6	None	0.26±0.04
Hammer 2008a	1.5	MRS		RN	3000	10	8	None	0.66±0.09
Rijzewijk 2008	1.5	MRS		RN	>3000	26	8	None	0.65±0.05
McGavock 2007	1.5	MRS	PRESS	RN	4000		6	None	0.46±0.30
Sai 2013	1.5	MRS	PRESS	FB	>4000	30	2	None	0.9±0.4
Wu 2012	1.5	MRS	PRESS	BH	2x (3x) R-R wave	35	50	None	6.7**
Graner 2014	1.5	MRS	PRESS	RN	>3000	35		None	0.86 (0.31-2.24)
Petrisch 2012	1.5	MRS		RN	2x R-R wave	30	6	None	0.52±0.11

TR, repetition time; TE, echo time; VOI, volume of interest; BH, breath hold; RN, respiratory navigator; FB, free breathing; * data without relaxation correction (Krssak *et al.* 2004), ** data were not used for comparison, the average value gained on 3T (1.5T) scanner is 0.7 % (0.6 %).

The aim of our study was to describe the influence of breath holding, controlled breathing and cardiac cycle and some other parameters on the calculation of lipid content in the cardiac tissue and to compare these data with the ones available in the literature. These three different modes of breathing during signal acquisition were tested with volunteers who were able to hold their breath up to several minutes.

Methods

Subjects

42 healthy subjects were examined and divided into three groups. In groups A (pilot group of 16 subjects: 14m/2f, mean age of 30±11 years) and B (12 subjects: 9m/3f, mean age of 29±12 years) there were volunteers without any special training and they were able to hold their breathing for 30 s. Group C consisted of 14 free divers (13m/1f, mean age of 37±8 years) who were able to hold their breathing up to several minutes. All the examined subjects were informed about the examination protocol, and their written consent was obtained according to the local Ethical Committee rules.

MR imaging and spectroscopy

The examinations were performed in the supine position at the Siemens Trio 3T system equipped with the eight channels surface array coil.

The turbo FLASH (Fast Low Angle Shot) sequence with repetition time/echo time (TR/TE) = R-R wave/1.32 ms in long and short axes of the heart was used for the positioning of spectroscopic VOI in the interventricular septum (Fig. 1). The localized ¹H MR spectroscopy with the PRESS (Point Resolved Spectroscopy) sequence (Work In Progress (WIP) sequence kindly provided by Siemens) was used with the following parameters: 64 acquisitions with water suppression, 4 without water suppression (spectra were summed during measurements), TE = 35 ms (the shortest possible TE). TR was controlled by ECG (electrocardiography) and navigator sequences and was given as $TR = n \cdot bp + \Delta BH_n - \Delta BH_1$ where bp is the period of breathing and ΔBH is the difference between the start of the acquisition controlled by ECG and the navigator respectively (Fig. 1d). TR equal to double of the heartbeat period was applied in case of protocols without a navigator. Acquisition time depends on breathing and cardiac cycle. In case of free breathing the acquisition time takes approximately two minutes and with

respiratory navigator it's over five minutes.

The VOI size was set at 6 ml. The homogeneity of the static magnetic field was set by the GRE shim method (WIP sequence) and the fine-tuning was done manually. The full width at half maximum (FWHM) of the water signal less than 50 Hz (magnitude spectra) was considered to be acceptable for the measurement of the Lip/water ratio; spectra with a broader signal of water were excluded from the study.

Three different examination protocols were applied and compared (all protocols included ECG triggering): 1) free breathing (FB); 2) breath-holding (BH); and 3) application of respiratory navigator (RN).

Spectra evaluation

Two evaluation procedures were applied:

a) Spectra were evaluated using jMRUI with the AMARES module. Gaussian-Lorentzian peaks were applied with maxima at 4.7 ppm for water signal and three peaks for lipids signals (at 0.9, 1.2 and 2.0 ppm). Integral of water was gained from the spectrum with water suppression (Fig. 2a). Signal of lipids was calculated as a summation of individual integrals; however, in most cases only one component with maximum at 1.2 ppm was detected due to the quality of spectra (there was no detailed structure to recognize) (Fig. 2a).

b) Another subroutine of jMRUI was used for the calculation of magnitude spectra (Fig. 2b). Signal intensities of water and lipids were calculated from the FWHM and height (de Graaf 2007) assuming the Lorentzian shape of the peaks. Application of magnitude spectra solves the problem of signal phasing, which is not easy in some cases of real spectra, especially in the case of spectra where water suppression pulses are used, due to the different phase of the residual signal of water (Fig. 3).

Results

A summary of results of all measurements is shown as ratios of lipid signals to the water signal (Table 2). No corrections to T₁ and T₂ were applied. Data in Table 2 also compare results obtained from real and magnitude spectra. The quality of magnitude spectra was sufficient only for group C; in the other cases, the signal of lipids was too broad for the processing (Fig. 2b).

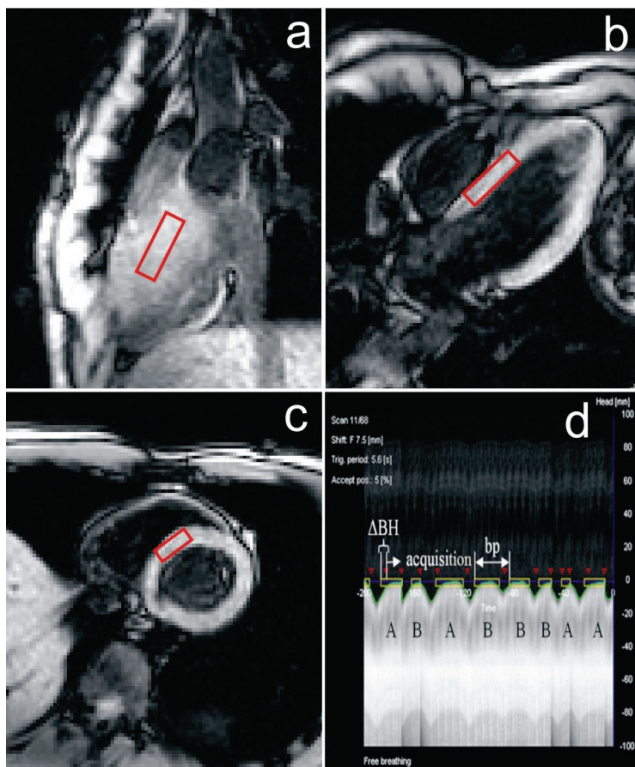


Fig. 1. Orientation of VOI (size 6 ml) in cardiac axes – long axes **(a)** and **(b)** and short axis **(c)** – measured by turbo FLASH sequence. Screenshot with a record of diaphragm's position in time by respiratory navigator is shown in part **d** of the picture. Sequence waits for the moment when the position of diaphragm (green line) reaches the yellow rectangle and the sequence starts when the first ECG signal (red triangular) comes. Letters A in the figure mean that condition of double-triggered sequence is fulfilled and acquisition starts. In case B condition is not fulfilled.

The technical success of the measurement is primarily given by the experience of the operator and motion artifacts which can be eliminated or even dismissed by using ECG. Our technical success of the examination was 56 % in group A, 100 % in case of group B and 79 % and 71 % in group C. We can see that also respiratory navigator triggering can significantly improve the quality of the spectra.

One subject was examined repeatedly by the protocol with the respiratory navigator. The reproducibility measured from the subject was found to be approximately 13 % (ratio of standard deviation and mean value).

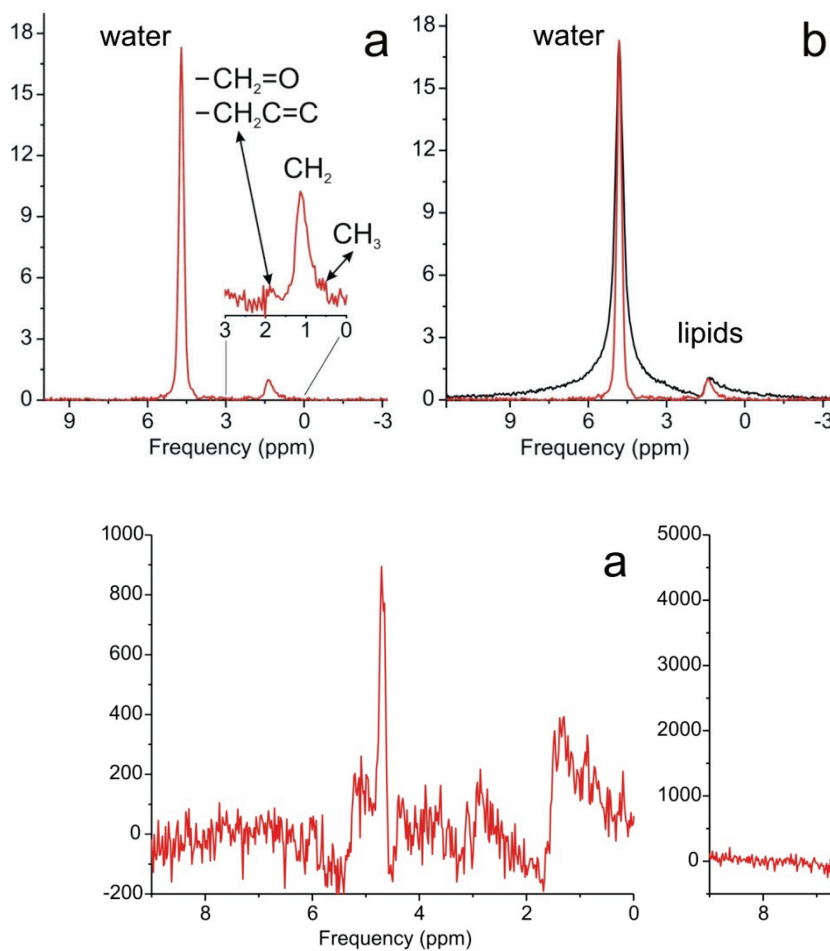


Fig. 2. *In vivo* spectrum (lipids area at 0-3 ppm is highlighted) with water suppression **(a)** and comparison of real (red line) and magnitude (black line) MR spectrum **(b)**.

Fig. 3. Comparison of spectra with water suppression measured by free breathing **(a)** and by respiratory navigator **(b)** protocol (same person).

Table 2. Lipid content (mean \pm SD) obtained by different ^1H MR spectroscopy examination protocols.

	Group A	Group B	Group C	Total		
<i>Examination protocol</i>	FB	FB	RN	BH	RN	
<i>N/n</i>	16/9	12/12	12/12	14/11	14/10	68/54
<i>Technical success %</i>	56	100	100	79	71	79
<i>Mean \pm SD</i>	0.6 \pm 0.4	0.5 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.3	
Absolute spectra						
<i>N/n</i>				14/11	14/9	28/20
<i>Technical success %</i>				79	64	71
<i>Mean \pm SD</i>				1.0 \pm 0.7	1.1 \pm 0.7	

FB, free breathing with the ECG signal triggering; BH, breath-holding with the ECG; RN, application the respiratory navigator and the ECG; N, total examined subjects; n, successfully examined subjects. There are no significant differences among groups and protocol according to ANOVA ($p=0.73$ or 0.85 with group A, resp.).

Discussion

To the best of our knowledge, we have found only 15 papers focused on the measurement of fat content in the myocardial tissue with healthy control values. Published data (without relaxation times correction) for the 1.5T examination show the mean value of the Lip/water ratio to be 0.6%; the results of the 3T examinations indicate 0.7%. These values are not significantly different because of high data variation. In our experience, two main factors influence the final value of the ratio. The first one is motion artifact due to heartbeat and breathing which significantly changes local shim, the second factor is the saturation effect due to T_1 and T_2 relaxation times.

The technical design of our protocol is similar to protocols described in other papers (Rial *et al.* 2011, Winhofer *et al.* 2012, Schrauwen-Hinderling *et al.* 2010); nevertheless, the authors do not describe the influence of breathing in detail.

Our comparison of protocols shows that spectra with the double triggering sequence (ECG and respiratory navigator) provide the best quality and can be used as a routine protocol of myocardium examination because the position of the myocardium is more stable and exactly defined during the examination (Fig. 3). It corresponds to the fact that water suppression procedure is more effective with regard to this protocol due to better phasing. A very important part of such measurement is the shimming procedure. Using the GREshim sequence brought improvement to the quality of the obtained spectra according to reached FWHM.

It is in agreement with other authors who used double triggered sequences (Krssak *et al.* 2011, Hammer *et al.* 2008a, McGavock *et al.* 2007) and obtained similar results and accuracy as in our case (Table 1). However, there is still demand for further improvement in minimizing the movement artifacts and improvement of the magnetic field homogeneity in the investigated area which is influenced by blood stream in the vicinity.

Reduction of the T_1 saturation effect is possible by using at least a doubled cardiac period for triggering which increases TR. Another effect that can influence the result of the measurement is echo time which should be used as short as possible ($TE=10$ to 35 ms in the published studies). Correction for relaxation times T_2 and T_1 is not considered in most of these studies because the direct measurement of the relaxation times is difficult to perform. Up to now, T_2 and T_1 corrections in myocardium spectra were only done with relaxation times obtained in skeletal muscles (Krssak *et al.* 2004) in studies by Winhofer *et al.* (2012) and Krssak *et al.* (2011). This correction reduces the Lip/water ratio by a factor of approximately 2.5.

We have not used corrections for T_1 and T_2 and our results summarized in Table 2 are in the range of the published data for healthy subjects examined at 3T (Liu *et al.* 2010, Rial *et al.* 2011, Winhofer *et al.* 2012, Krssak *et al.* 2011). ANOVA statistical tests (Analysis Of Variance) with Bonferroni correction show no differences in the lipid content between groups of volunteers A, B and C and examination protocols.

It is known that some pathologies (mostly connected with diabetes mellitus) are associated with

a higher cardiac lipid content (McGavock *et al.* 2007). As the results are affected by a rather high standard deviation, the practical use of the method in clinical practice must take this fact into consideration. Our data show that the content of fat to be considered out of controls must be higher than 1.6 %, i.e. mean value of the lipid content in healthy controls (i.e. 0.6 %) plus a doubled standard deviation (probability of 95 %). On a pilot group of six patients diagnosed with cardiomyopathy and diabetes mellitus type 2 were gained values over our set limit.

Nowadays, even with very high level technical facilities, measurement of myocardial lipid content at 3T still remains challenging. The use of respiratory navigator improves the spectra quality, but it does not affect the final lipid value determination. Nevertheless, based on our results and the literature it can be concluded that useful clinical data can be obtained for subjects with a lipid content higher than 1.6 %, which represents the mean value of lipid content plus two standard deviations.

References

- BILET L, VAN DE WEIJER T, HESSELINK MK, GLATZ JF, LAMB HJ, WILDBERGER J, KOOI ME, SCHRAUWEN-HINDERLING VB: Exercise-induced modulation of cardiac lipid content in healthy lean young men. *Basic Res Cardiol* **106**: 307-315, 2011.
- DE GRAAF RA: *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. 2nd edition. John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- GOLDBERG IJ, TRENT CM, SCHULZE PC: Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab* **15**: 805-812, 2012.
- GRANER M, SIREN R, NYMAN K, LUNDBORN J, HAKKARAINEN A, PENTIKAINEN MO, LAUERMA K, LUNDBORN N, ADIELS M, NIEMINEN MS, TASKINEN MR: Cardiac steatosis associates with visceral obesity in nondiabetic obese men. *J Clin Endocrinol Metab* **98**: 1189-1197, 2013.
- GRANER M, PENTIKAINEN MO, NYMAN K, SIREN R, LUNDBORN J, HAKKARAINEN A, LAUERMA K, LUNDBORN N, NIEMINEN MS, PETZOLD M, TASKINEN MR: Cardiac steatosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart* **100**: 1107-1112, 2014.
- HAMMER S, VAN DER MEER RW, LAMB HJ, DE BOER HH, BAX JJ, DE ROOS A, ROMIJN JA, SMIT JW: Short-term flexibility of myocardial triglycerides and diastolic function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**: 714-718, 2008a.
- HAMMER S, VAN DER MEER RW, LAMB HJ, SHAER M, DE ROOS A, SMIT JW, ROMIJN JA: Progressive caloric restriction induces dose-dependent changes in myocardial triglyceride content and diastolic function in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 497-503, 2008b.
- KREIS R, FELBLINGER J, JUNG B, BOESCH C: In vivo 1H-MR spectroscopy of the human heart. *MAGMA* **6**: 164-167, 1998.
- KRSSAK M, MLYNARIK V, MEYERSPEER M, MOSER E, RODEN M: 1H NMR relaxation times of skeletal muscle metabolites at 3 T. *MAGMA* **16**: 155-159, 2004.
- KRSSAK M, WINHOFFER Y, GOEBL C, BISCHOF M, REITER G, KAUTZKY-WILLER A, LUGER A, KREBS M, ANDERWALD C: Insulin resistance is not associated with myocardial steatosis in women. *Diabetologia* **54**: 1871-1878, 2011.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The study was supported by projects IGA MH CR NT11275-6, MHCZ-DRO 00023001 IKEM. Approval of this study was given by local ethical committee. Clinical protocols are certified according to the ISO 9001:2008 norm by the local ethical committee. The guarantor of the study is Dr. Milan Hajek.

Abbreviations

FA, fatty acid; SVS, single voxel spectroscopy; VOI, volume of interest; Lip, lipids; FLASH, fast low angle shot; TE, echo time; TR, repetition time; PRESS, point resolved spectroscopy; WIP, work in progress; FWHM, full width at half maximum; ECG, electrocardiography; BH, breath hold; FB, free breathing; RN, respiratory navigator; ANOVA, analysis of variance.

- LIU CY, REDHEUIL A, OUWERKERK R, LIMA JAC, BLUEMKE DA: Myocardial fat quantification in humans: evaluation by two-point water-fat imaging and localized proton spectroscopy. *Magn Reson Med* **63**: 892-901, 2010.
- MCGAVOCK JM, VICTOR RG, UNGER RH, SZCZEPANIAK LS: Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med* **144**: 517-524, 2006.
- MCGAVOCK JM, LINGVAY I, ZIB I, TILLERY T, SALAS N, UNGER R, LEVINE BD, RASKIN P, VICTOR RG, SZCZEPANIAK LS: Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation* **116**: 1170-1175, 2007.
- PETRITSCH B, KOESTLER H, MACHANN W, HORN M, WENG AM, GOLTZ JP, HAHN D, NIEMANN M, WEIDEMANN F, WANNER C, BEER M: Non-invasive determination of myocardial lipid content in Fabry disease by 1H-MR spectroscopy. *Rofo* **184**: 1020-1025, 2012.
- RIAL B, ROBSON MD, NEUBAUER S, SCHNEIDER JE: Rapid quantification of myocardial lipid content in humans using single breath-hold 1H MRS at 3 Tesla. *Magn Reson Med* **66**: 619-624, 2011.
- RIJZEWIJK LJ, VAN DER MEER RW, SMIT JW, DIAMANT M, BAX JJ, HAMMER S, ROMIJN JA, DE ROOS A, LAMB HJ: Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **52**: 1793-1799, 2008.
- SAI E, SHIMADA K, YOKOYAMA T, SATO S, MIYAZAKI T, HIKI M, TAMURA Y, AOKI S, WATADA H, KAWAMORI R, DAIDA H: Association between myocardial triglyceride content and cardiac function in healthy subjects and endurance athletes. *PLoS One* **8**: e61604, 2013.
- SCHRAUWEN-HINDERLING VB, HESSELINK MK, MEEEX R, VAN DER MADE S, SCHAER M, LAMB H, WILDBERGER JE, GLATZ J, SNOEP G, KOOI ME, SCHRAUWEN P: Improved ejection fraction after exercise training in obesity is accompanied by reduced cardiac lipid content. *J Clin Endocrinol Metab* **95**: 1932-1938, 2010.
- SCHRAUWEN-HINDERLING VB, MEEEX RCR, HESSELINK MKC, VAN DE WEIJER T, LEINER T, SCHAER M, LAMB HJ, WILDBERGER JE, GLATZ JFC, SCHRAUWEN P, KOOI ME: Cardiac lipid content is unresponsive to a physical activity training intervention in type 2 diabetic patients, despite improved ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol* **10**: 47, 2011.
- SHARMA S, ADROQUE JV, GOLFMAN L, URAY I, LEMM J, YOUKER K, NOON GP, FRAZIER OH, TAEGTMEYER H: Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* **18**: 1692-1700, 2004.
- VAN DER MEER RW, DOORNBOS J, KOZERKE S, SCHAER M, BAX JJ, HAMMER S, SMIT JW, ROMIJN JA, DIAMANT M, RIJZEWIJK LJ, DE ROOS A, LAMB HJ: Metabolic imaging of myocardial triglyceride content: reproducibility of 1H MR spectroscopy with respiratory navigator gating in volunteers. *Radiology* **245**: 251-257, 2007a.
- VAN DER MEER RW, HAMMER S, SMIT JW, FROELICH M, BAX JJ, DIAMANT M, RIJZEWIJK LJ, DE ROOS A, ROMIJN JA, LAMB HJ: Short-term caloric restriction induces accumulation of myocardial triglycerides and decreases left ventricular diastolic function in healthy subjects. *Diabetes* **56**: 2849-2853, 2007b.
- WINHOFER Y, KRSSAK M, JANKOVIC D, ANDERWALD CH, REITER G, HOFER A, TRATTNIG S, LUGER A, KREBS M: Short-term hyperinsulinemia and hyperglycemia increase myocardial lipid content in normal subjects. *Diabetes* **61**: 1210-1216, 2012.
- WU J, YANG L, YANG J, YANG CH, ZHANG XH: Gender-specific normal levels of myocardial metabolites determined by localized 1H-magnetic resonance spectroscopy. *J Int Med Res* **40**: 1507-1512, 2012.
-

Neimpaktované publikace
mimo téma dizertační práce

¹H MR SPEKTROSKOPIE – II. STANOVENÍ TUKŮ A CITRÁTU

¹H MR SPECTROSCOPY – II. LIPIDS AND CITRATE

přehledový článek

Milan Hájek
Miloslav Drobný
Petr Šedivý
Monika Dezortová

Oddělení klinické a experimentální MR spektroskopie, Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie, Institut klinické a experimentální medicíny

Přijato: 15. 11. 2017.

Korespondenční adresa:

Ing. Milan Hájek, DrSc.
 MR oddělení ZRIR
 IKEM
 Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4
 e-mail: miha@ikem.cz

Konflikt zájmů: žádný.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-28427 A; MZ ČR – RVO (Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001). Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Hlavní stanovisko práce

Stanovení obsahu tuků ve svalech a dalších orgánech se využívá pro stanovení stupně steatózy a studium metabolického syndromu. Editační spektroskopické techniky byly použity pro stanovení omega nenasycených mastných kyselin a pro studium věkových změn koncentrací metabolitů v prostatě.

SOUHRN

Hájek M, Drobný M, Šedivý P, Dezortová M. ¹H MR spektroskopie – II. stanovení tuků a citrátu

¹H MR spektroskopie je vhodnou metodou pro sledování zastoupení tuků v lidských tkáních. Umožňuje stanovit stupeň steatózy v játrech měřením poměrů intenzit signálů vody a signálů mastných kyselin. Spektroskopické stanovení obsahu tuku dobře koreluje s histologickými vyšetřeními a vzhledem k neinvazivnosti je to metoda vhodná pro dlouhodobé sledování obsahu tuku v játrech. Obdobným způsobem lze stanovit obsah tuku v myokardu. V kosterních svalech je možné stanovovat intra- a extracelulární tuk a pro toto stanovení se využívají editační ¹H MRS techniky, které měří spektra s různým echo časem. Pokročilé editační techniky jako je oMEGA PRESS umožňují neinvazivní stanovení omega mastných kyselin. Do skupiny vyšetřování, které využívají editační techniky, patří i stanovení koncentrace metabolitů v prostatě. Koncentrace citrátu roste významně s věkem zdravých mužů. Pro dlouhodobé sledování anebo při vyšetřování pacientů je nezbytné tyto věkové závislosti brát do úvahy.

Klíčová slova: ¹H MR spektroskopie, lipidy, citrát, játra, srdce, sval, prostata.

Major statement

The measurement of fat content in muscles and other organs is used for the determination of steatosis and for the study of metabolic syndrome. Editing spectroscopic procedures were used to measure the content of omega unsaturated fatty acids and to study metabolite concentrations in prostate with aging.

SUMMARY

Hájek M, Drobný M, Šedivý P, Dezortová M. ¹H MR spectroscopy – II. lipids and citrate

¹H MR spectroscopy is a suitable method of fat evaluation in human body. It is possible to determine the level of liver steatosis using the measurement of water and fatty acids signal intensities. The results from spectroscopy correlate well with the results of histology. The method is useful for long-term studies due to its non-invasive character. A similar examination procedure can be used for fat measurement in myocardium. Editing ¹H MRS techniques with different echo times are used to measure intra- and extracellular fat in muscles. Advanced editing techniques such as oMEGA PRESS enable measuring the content of omega fatty acids. Editing techniques are also applied for the measurement of metabolite concentrations in prostate. The concentration of citrate significantly increases with the age of healthy males. The age dependency of metabolite concentrations has to be considered in long-term studies as well as in the case of patients' examinations.

Key words: ¹H MR spectroscopy, lipids, citrate, liver, heart, muscle, prostate.

ÚVOD

V souvislosti se studiem metabolického syndromu se ukázalo, že *in vivo* ^1H MR spektroskopická analýza tkání obsahujících tuk umožňuje stanovit jeho množství a složení. To bylo už od devadesátých let 20. století využíváno pro stanovení koncentrace tuků v játrech a později i v myokardu. S rozvojem nových pulzních MR technik byly navrženy postupy stanovení intra- a extracelulárního tuku ve svalech anebo stanovení omega mastných kyselin v tukové tkáni.

Na obrázcích 1 a 2 jsou ^1H MR spektra jater a srdce získaná měřením bez potlačení signálu vody. Editační techniky s potlačením vody umožňují stanovení intra- a extracelulárního tuku v lýtkových svalech anebo stanovení koncentrace omega mastných kyselin v tukové tkáni tak, jak je demonstrováno na obrázcích 3 a 4.

Tuková tkáň představuje podstatnou energetickou zásobu lidského organismu. Tato zásoba je uložena v tukových buňkách s tukovými kapénkami, které tvoří polotekutá směs sloučenin dlouhých mastných kyselin (C15–C20) s glycerolem a cholesterolem. Z hlediska *in vivo* MR spektroskopie jsou to právě jen signály těchto sloučenin, které jsou pozorovatelné v ^1H MR spektrech společně se signálem vody o různé intenzitě v závislosti na sledovaném kompartmentu. Další důležité sloučeniny produkované a obsažené v tucích, jako jsou adipokiny, hormony aj., nejsou vzhledem k nízké koncentraci v *in vivo* MR spektrech viditelné.

Charakteristickým znakem *in vivo* MR spekter tukové tkáně jsou poměrně široké signály v důsledku krátkých T2 relaxačních časů a velkého množství skupin s podobným chemickým složením. Z chromatografických analýz se ukazuje, že tuky jsou kombinací esterů nejméně 20 mastných kyselin. Ve spektrech proto můžeme identifikovat jen omezenou skupinu několika typů vodíkových skupin, jejichž chemické posuny jsou uvedeny v tabulce 1. Dominantními signály (kromě signálu vody) v ^1H MR spektrech těchto látek jsou signály CH_3 a CH_2 alifatických skupin. Pro popis struktury mastných kyselin se dále využívají intenzity signálů dvojných vazeb, signály CH_2 skupin sousedících s dvojnou, karbonylovou nebo esterovou vazbou. Jejich intenzity se obvykle vztahují k intenzitě signálu vody. Tak se vypočítává tzv. index nenasyčenosti nebo obsah hepatocelulárních lipidů pro stanovení stupně steatózy. Pokročilými editačními technikami lze identifikovat omega-3 mastné kyseliny.

Všechny tyto metody byly v IKEM ověřeny, v některých případech doplněny a zavedeny pro výzkumné i klinické použití.

STANOVENÍ STUPNĚ JATERNÍ STEATÓZY

V případě jaterních onemocnění se metabolický syndrom projevuje jaterní steatózou, tzn. zvýšeným množstvím tuku v játrech. Zvyšování množství tuku v játrech od běžné nealkoholické jaterní choroby (NAFLD) k nealkoholické steatohepatitidě (NASH) může vést přes fibrózu a cirhózu někdy až k hepatocelulárnímu karcinomu. Samotné zjištění steatózy nepředstavuje pro moderní radiologické zobrazovací metody, jako je ultrasonografie, výpočetní tomografie (CT) nebo mag-

netická rezonance (MR), velký problém. Problémem však je kvantifikace tuku v játrech a jeho průběžné sledování v průběhu léčby. Jaterní biopsie, která je považována za nejlepší způsob zjištění tuku v játrech, je invazivní metoda a nedá se opakovat příliš často. Jejím omezením je také relativně velmi malý vzorek tkáně, který nemusí být reprezentativní pro celá játra. Proto je lokalizovaná *in vivo* MR spektroskopie jater dobrou alternativní metodou stanovení tuku v játrech a také standardem pro kalibraci MR zobrazovacích technik stanovení steatózy.

Základním postupem při stanovení obsahu tuku je naměření spektra v malém objemu jater – kolem 27 ml (single voxel technikou PRESS nebo STEAM) s co nejdelším repetičním a co nejkratším echo časem bez potlačení vody a při zadržném dechu (obr. 1). Obvykle se vyšetření provádí z několika míst jater – na našem pracovišti nejčastěji vyšetřujeme z jaterních segmentů V, VI, VII. Tímto způsobem se získají spektra, ve kterých jsou dvě skupiny signálů – alifatické signály v rozmezí 0,5–3 ppm a signál vody překrývající některé CH_2 a CH skupiny lipidů v rozmezí 4,5–5,4 ppm. Intenzity signálů v těchto oblastech se stanovují integrací nebo jinými způsoby, např. programy LCModel nebo jMRUI. Získané hodnoty intenzit potom slouží pro výpočet obsahu tuku (obr. 1B). Kvantitativní výpočet obsahu tuku v játrech publikovala jako první Longo (1) a dalšími autory byl výpočet zpřesňován, ale na podstatě výpočtu se nic nemění. Relativní poměr intenzit signálů příslušejících alifatickým protonům tuků a signálu vody (FTSA) je vyjádřen jednoduchým vztahem:

$$FTSA = S^a / (S^a + S^b) = S^a / S^c \quad [1]$$

kde S^a a S^b jsou celkové intenzity signálů v oblasti alifatických protonů a (0,5–3 ppm; signály píků s maximy 0,9 ppm, 1,2 ppm, 2 ppm), a b (4,5–5,4 ppm; signály píků s maximy 4,7 a 5,3 ppm) (obr. 1). Objemové zastoupení tuku se vypočte rovnicí:

$$\Phi_{fat} = 100 \frac{[FTSA / (N_v - FTSA)]}{[FTSA / (N_v - FTSA)] + 1,339} = 100FTSA / (1,138 - 0,339FTSA) \quad [2]$$

kde N_v (0,85) je poměr lipidových protonů v oblasti 0,5 až 3,5 ppm k celkovému počtu protonů v oblasti 0,5 do 5,5 ppm.

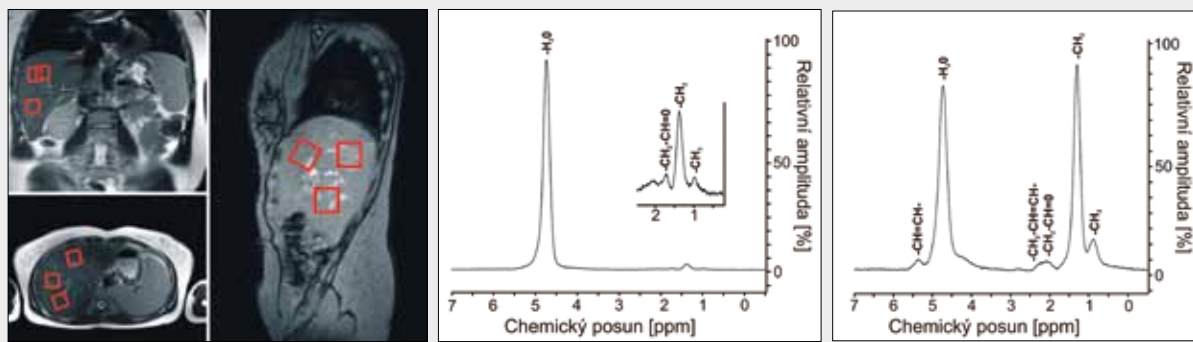
Pro výpočet správných intenzit signálů je třeba provést korekce na saturaci, tzn. vynásobit získanou experimentální intenzitu signálů korekčním faktorem na T2 relaxace:

$$S_{T2}^a = S^a \left[\exp(TE/T2^a) \right]$$

$$S_{T2}^b = S^b \left[\exp(TE/T2^b) \right] \quad [3]$$

Pro korekce intenzit signálů v játrech se nejčastěji používají průměrné relaxační časy vody $T2 = 27$ ms a $T2 = 60$ ms pro lipidy (2, 3); druhou možností je využít relaxační časy naměřené přímo pro každý vyšetřovaný subjekt, což je správnější.

Jaterní steatóza je charakterizována zvýšenou akumulací triglyceridů v cytoplasmě hepatocytů. V cytoplasmě jsou triglyceridy soustředěny ve vakuolách. Pokud je vakuol velké množství nebo jsou příliš velké, mohou hepatocyty poškodit nebo i zničit. Na sledování počtu poškozených hepatocytů jsou založeny



▲ Obr. 1A

▲ Obr. 1B

▲ Obr. 1C

Obr. 1. Stanovení stupně steatózy ^1H MR spektroskopií. A – umístění jednotlivých analyzovaných objemů (VOI) v játrech pro ^1H MR spektroskopické vyšetření. MR obraz je získán sekvencí HASTE se zadržením dechu. Objem VOI je obvykle 27–30 ml, umísťuje se mimo velké cévy, nejčastěji do V., VI. a VII. segmentu jater. ^1H MR spektra z objemu 27 ml v šestém segmentu jater (3 T, sekvence PRESS s TR/TE = 4500/30 ms, bez potlačení signálu vody, jedna akvizice při zadržení dechu). % hepatického tuku byla vypočtena podle Longo z intenzit signálů ve dvou oblastech spektra – $S^a \sim 0,5\text{--}3,5$ ppm; $S^b \sim 4,0\text{--}5,5$ ppm. B – spektrum pacienta s nízkým obsahem tuku – 3,3 % (stupeň steatózy 1); C – spektrum pacienta s obsahem tuku 29,6 % (stupeň steatózy 3).

Fig. 1. **Determination of liver steatosis by ^1H MR spectroscopy.** A – position of volumes of interest (VOI) for ^1H MRS examination on an MR image obtained by the HASTE sequence with breath-hold. The volume of VOI is usually 27–30 ml; VOI should be positioned outside veins and arteries; most frequently in the V, VI and VII segment of the liver. ^1H MR spectra were measured from the volume of 27 ml in the sixth segment of the liver (3 T, sequence PRESS, TR/TE = 4500/30 ms, without water suppression, one acquisition with breath-hold). % of hepatic fat was calculated according to Longo from signal intensities in two ranges of spectra – $S^a \sim 0.5\text{--}3.5$ ppm; $S^b \sim 4.0\text{--}5.5$ ppm. B – the spectrum of the patient with a low hepatic fat content of 3.3% (steatosis level 1); C – the spectrum of the patient with a high hepatic fat content of 29.6% (steatosis level 3).

histologické metody (4). Podle počtu poškozených hepatocytů jsou steatóza a fibróza děleny do čtyř stupňů (5):

- stupeň S0 – bez steatózy (do 5 % poškozených hepatocytů)
- stupeň S1 – mírná steatóza (5–33 % poškozených hepatocytů)
- stupeň S2 – zvýšená steatóza (33–66 % poškozených hepatocytů)
- stupeň S3 – těžká steatóza (více než 66 % poškozených hepatocytů)

Korelace mezi spektroskopickými a histologickými nálezy je velmi silná, a to zvláště při nízkých koncentracích (nejvíce do stupně S2). Je to dáno tím, že ^1H MR spektroskopie je schopna zjistit velmi malé koncentrace lipidů v celém rozsahu stupnice s přesností kolem 1 %. V celém rozsahu histologické stupnice pak závislost nemusí být zcela lineární (6). Pro klinické zařazení pacientů do čtyřstupňové steatotické škály je použití ^1H MR stanovení množství tuku více než dostačující. Vysokou přesnost MR spektroskopie je možné využít pro detailní sledování obsahu tuku v klinických experimentech. Využili jsme toho v celé řadě studií (7–9).

Pokud jde o fibrózu, korelace mezi ^1H MR nálezy a histologií není příliš silná a v současné době jsou k dispozici další metody, jako je MR elastografie (10), které popisují fibrózu lépe.

STANOVENÍ LIPIDŮ V MYOKARDU

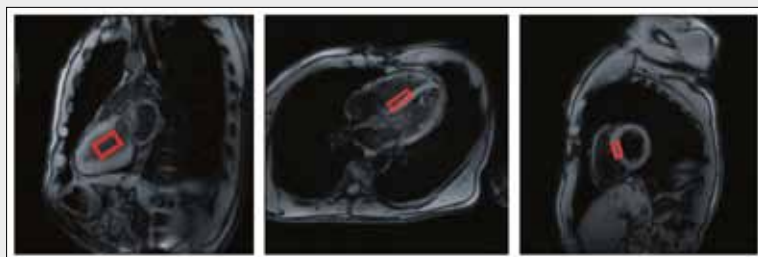
^1H MR spektroskopie srdce, podobně jako jeho MR zobrazování, patří k nejobtížnějším úkolům magnetické rezonance vzhledem k jeho pohybu – proudění krve a pohybovým artefaktům. V případě MR spektroskopie přistupuje k těmto obtížím navíc i lokální nastavení homogenity magnetického pole (tzv. shim) a měření z malého objemu tkáně, mnohem menší-

ho, než je tomu v případě jaterní steatózy. Vlastnímu spektroskopickému vyšetření, stejně jako u vyšetření jater, předchází MR zobrazování srdce a výběr VOI, o jehož velikosti rozhoduje především šířka komorového septa (obr. 2A). Spektroskopické vyšetření sekvencí s krátkým TE je synchronizováno se srdečním cyklem (EKG synchronizace) a dýchací pohyby se eliminují buď měřením při zadrženém dechu, nebo použitím navigátoru dechu, jež monitoruje pohyb bránice. Vzhledem k nízké koncentraci lipidů v srdeční tkáni a malému VOI je potřeba akumulovat více akvizic. Aplikace navigátoru dechu však značně prodlužuje celkové měření, neboť začátek náběru každé akvizice čeká na průnik signálů z EKG a navigátoru. Na druhou stranu, měření při zadrženém dechu může být pro pacienta obtížné, protože vyžaduje delší dobu zadržení dechu než například při vyšetření jater. Nicméně, sečtením spekter

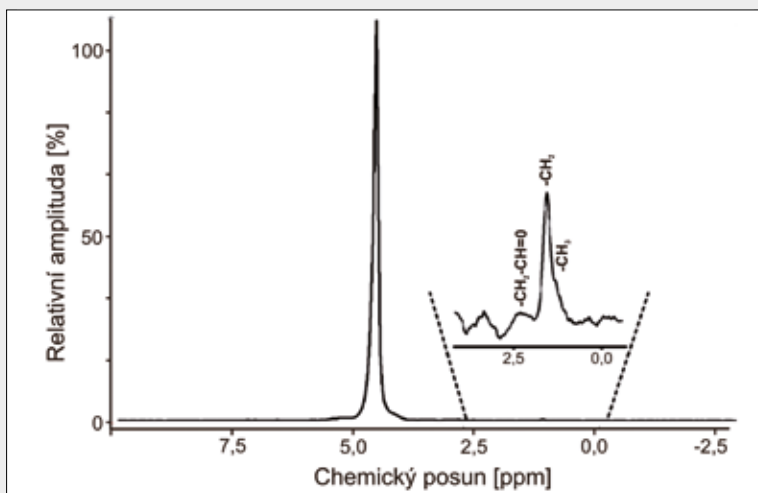
Tab. 1. Chemické posuny signálů funkčních skupin v in vivo ^1H MR spektrech tukové tkáně

Table 1. Chemical shifts of proton groups in in vivo ^1H MR spectra of fat tissue

Sloučenina/vazba	Typ protonu	ppm	Sloučenina / vazba	Typ protonu	ppm
olefinická vazba	-CH=CH-	5,31	diacyl	=CH-CH ₂ - -CH=	2,77
voda	H ₂ O	4,7	alfa methylen	O=C-CH ₂ -	2,24
kreatin	-CH ₂ -	3,9 d	acetylkarnitin	CH ₃ -COO-	2,1
taurin	-CH ₂ -	3,40–3,45	alfa olefinický methylen	-CH=CH- -CH ₂ -	2,02–2,1
glyceryl	-CH ₂ -OH -CH-OH	3,6 3,8	alfa olefinický methyl	-C=C-CH ₃	1,7
TMA choliny, karnitin	-(CH ₃) ₃	3,22	methylen EMCL IMCL	-(CH ₂) _n	1,30 1,49 1,20
kreatin	-CH ₃	3,2	methyl EMCL IMCL	-CH ₃	0,90 1,07 0,89



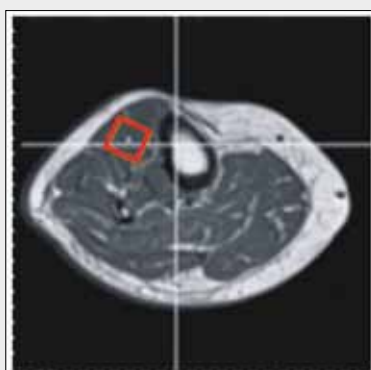
◀ Obr. 2A



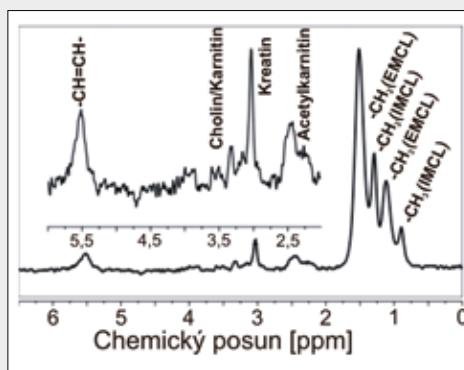
◀ Obr. 2B

Obr. 2. ¹H MRS myokardu zdravého dobrovolníka, 3 T tomograf. A – umístění měřícího objemu (VOI) v myokardu. MR obraz je naměřen sekvencí FLASH (Fast Low Angle Shot) se zadržením dechu a EKG řízením. Objem VOI = 5 ml; B – ¹H MR spektrum z VOI o objemu 5 ml při 3 T, sekvence PRESS s TE/TR = 35/~ 5000 ms bez potlačení signálu vody se čtyřmi akvizicemi při zadržení dechu. Pro výpočet zastoupení tuku je naměřena integrální intenzita signálů ve dvou oblastech spektra (obr. 1) – S^a ~ 0,5–3,5 ppm, S^b ~ 4,0–5,5 ppm.

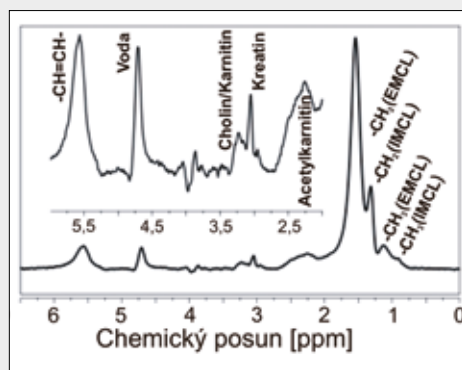
Fig. 2. ¹H MRS of myocardium of a healthy volunteer, 3 T system. A – position of voxel of interest (VOI) in myocardium. The MR images are obtained by FLASH (Fast Low Angle Shot) sequence with breath-hold and ECG control. VOI = 5 ml; B – ¹H MR spectrum from VOI = 5 ml at 3 T, sequence PRESS with TE/TR = 35/~5000 ms without water suppression and with 4 acquisitions. The calculation of fat content is based on signal intensities in two parts of spectra – S^a ~ 0.5–3.5 ppm, S^b ~ 4.0–5.5 ppm.



▲ Obr. 3A



▲ Obr. 3B



▲ Obr. 3C

Obr. 3. ¹H MR spektrum z m. tibialis měřené při 3 T. Objem VOI 8 ml, sekvence PRESS. A – spektrum měřené s dlouhým TE (TR/TE = 5000/270 ms); B – spektrum měřené sekvencí s krátkým TE (TR/TE = 5000/30 ms)

Fig. 3. ¹H MR spectrum from m. tibialis measured at 3T. The VOI volume of 8 ml, PRESS sequence. A – spectrum measured with long TE (TR/TE = 5000/270 ms); B – spectrum measured with short TE (TR/TE = 5000/30 ms)

při opakovaném zadržení dechu lze dosáhnout naměření kvalitních spekter (obr. 2B). Tyto technické obtíže s MRS vyšetřováním myokardu jsou také hlavní příčinou necelých dvacítých prací věnovaných tomuto tématu.

Na našem MR pracovišti jsme provedli testování různých vyšetřovacích postupů se skupinou dobrovolníků „free-diverů“, kteří jsou schopni zadržet dech po delší dobu – až několik minut. Mohli jsme porovnat různé vyšetřovací protokoly (vyšetření při zadrženém dechu, použití navigátoru dechu a měření při volném dýchání). Výsledky z těchto experimentů jsou shrnuty v publikaci (11) a naměřené koncentrace tuku v myokardu odpovídají literárním hodnotám udávajícím, že zastoupení tuku vypočtené podle vztahu 1 je v myokardu kolem 0,6 %.

STANOVENÍ INTRA- A EXTRAMYOCELULÁRNÍHO TUKU VE SVALU

Použití ¹H MR spektroskopie pro analýzu tuků ve svalch bylo publikováno v pionýrské studii tübingské MR skupiny (12) již v roce 1993, která popsala v ¹H MR spektrech kosterního svalu dva signály. Tyto signály byly identifikovány jako signály lipidů uvnitř svalové buňky (intramyocelulární tuk – IMCL) a signály lipidů ve svalových septech (extramyocelulární tuk – EMCL). Rozdíl chemických posunů IMCL a EMCL není dán odlišnou chemickou strukturou, ale je způsoben rozdílnou susceptibilitou tukových kapének

v buňce a septu. Teoreticky byl tento rozdíl chemických posunů vypočten podle modelu „bulk magnetic susceptibility“ a činí 0,21 ppm. Je to ve velmi dobré shodě s experimentálními výsledky z m. tibialis.

Později řada pracovišť použila a zdokonalovala tuto techniku vyšetřování zvláště pro studium koncentrací IMCL a EMCL tuku v souvislosti s metabolickým syndromem a ve sportovní medicíně. Dva základní poznatky z těchto studií říkají:

1. Vzhled a kvalita spektra závisí na orientaci svalových vláken vzhledem k externímu magnetickému poli a na použitém echo čase; nejvýhodnější je měření spekter z m. tibialis, kde jsou svalová vlákna rovnoběžná s vnějším magnetickým polem, a provádění vyšetřování sekvencemi s dlouhým TE (270 ms).
2. Intracelulární tuk (IMCL) je významným energetickým zdrojem pro aerobní metabolismus; jeho koncentrace se zvyšuje s trénovaností subjektu a je úměrná inzulínové senzitivitě.

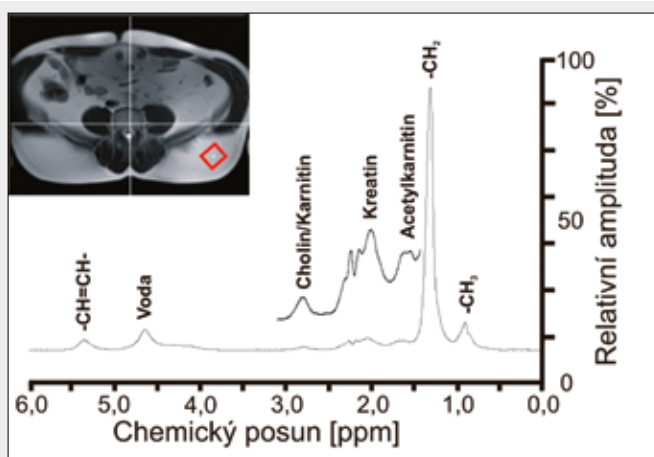
V průběhu posledních let byla publikována celá řada prací věnovaných jak metodickým záležitostem měření ^1H MR spekter, tak vlivu různých fyziologických a metabolických faktorů na koncentraci IMCL. Stanovení koncentrace IMCL vychází z interpretace ^1H MR spekter naměřených s dlouhým a krátkým TE, jak je uvedeno na obrázku 3. V těchto spektrech jsou signály CH_3 a CH_2 skupin IMCL a EMCL tuku dobře odděleny a ve spektrech je možné identifikovat řadu dalších funkčních skupin tuků a metabolitů. Pro kvantifikaci IMCL a EMCL tuku se nejčastěji používají poměry intenzit signálu CH_2 a CH_3 skupin k signálu kreatinu.

Tento směr sledoval i náš výzkum (13), který byl zaměřen na automatické vyhodnocování spekter kosterního svalu naměřených při 1,5 T a 3 T technikou LCMoel. Metoda byla ověřována na skupině zdravých dobrovolníků a skupině DM2 pacientů.

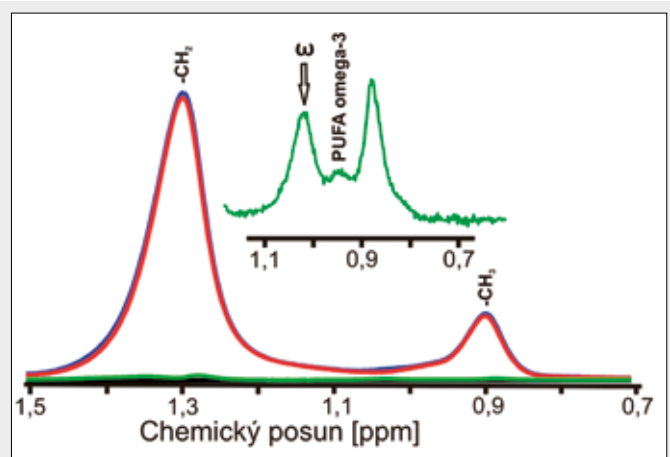
Metodika byla použita např. ve studii (14), kde se hodnotil vliv pravidelné fyzické zátěže u pacientů po první kadaverózní transplantaci ledvin na lipidový metabolismus ve svalu. Další studie, kde byla tato metoda s úspěchem použita, se zabývala vlivem látky telmisartan u pacientů s narušenou rovnováhou glukózy nalačno na koncentraci IMCL (15).

STANOVENÍ KONCENTRACE OMEGA-3 MASTNÝCH KYSELIN

Omega-3 mastné kyseliny jsou nezbytné pro lidský metabolismus. Jejich použití v doplňcích stravy bylo a je studováno v mnoha směrech a neinvazivní stanovení obsahu omega-3 mastných kyselin (o-3M) je zajímavé jak z metodického, tak i metabolického hlediska. o-3M jsou nenasycené mastné kyseliny, jejichž společným znakem je dvojná vazba mezi uhlíky na třetím a čtvrtém místě od koncového methylu mastné kyseliny. Stanovení koncentrace omega mastných kyselin na základě olefinických protonů není možné vzhledem k překryvu různých olefinických skupin. Pro jejich stanovení je však možné využít J-editační techniku odvozenou od sekvence (16, 17) MEGA-PRESS (MEshcher-GARwood Point-RESolved Spectroscopy), kterou jsme na našem pracovišti zavedli pod názvem (18) oMEGA-PRESS. Stanovení koncentra-



▲ Obr. 4A



▲ Obr. 4B

Obr. 4. ^1H MR spektrum podkožního tuku pro stanovení omega-3 polynenasycených mastných kyselin (PUFA omega-3). A – celkové ^1H MR spektrum podkožního tuku a přiřazení chemických struktur signálů (sekvence PRESS, 64 akvizic, objem VOI 27 ml);

B – část spektra zahrnující signály funkčních skupin CH_3 a CH_2 (mezi 0,7–1,5 ppm) se používá pro stanovení koncentrace PUFA omega-3 na základě intenzity levé části tripletu $-\text{CH}_3$ skupiny PUFA omega-3 (ω). Tento signál (zelené spektrum) se získá odečtením spekter naměřených bez refokusačního (červené spektrum) a s refokusačním (modré spektrum) pulzem zaměřeným na CH_2 skupinu (sekvence oMEGA PRESS, TE = 199 ms, 128 akumulací).

Fig. 4. ^1H MR spectrum of subcutaneous fat used for the measurement of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA omega-3). A – the whole ^1H MR spectrum of subcutaneous fat and assignment of signals to chemical structures. (PRESS sequence, 64 acquisitions, VOI = 27 ml); B – the part of the spectrum with signals of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2$ groups (0,7–1,5 ppm) which is used for the determination of PUFA omega-3 based on the intensity of signal attributed to the left outer triplet line of the PUFA omega-3 $-\text{CH}_3$ group (ω). This signal (green line) is obtained by subtraction of spectra measured without (red line) and with (blue line) pulse refocusing, resp., focused to $-\text{CH}_2$ group (oMEGA-PRESS sequence, TE = 199 ms, 128 acquisitions).

ce omega-3 mastných kyselin tímto způsobem je založeno na získání signálu levé postranní čáry koncové $-CH_3$ skupiny o-3M odečtením spekter naměřených se zapnutým a vypnutým refokusačním pulzem cíleným na CH_2 skupinu ve vazbě $-CH=CH-CH_2-CH_3$ (2,1 ppm). PRESS sekvence byla optimalizována pro $TE = 199,5$ ms pro 3 T magnet. Reprezentativní obrázek rozdílového spektra je uveden na obrázku 4. Pro *in vivo* stanovení o-3M tímto způsobem je nutné brát v úvahu několik skutečností: 1. koncentrace o-3M v zásobách podkožního tuku je velmi nízká a pohybuje se kolem 1 % celkového zastoupení mastných kyselin; 2. pro získání kvalitních spekter je nezbytné velmi dobře nastavit lokální homogenitu magnetického pole tak, aby se signály CH_3 skupin nepřekrývaly se signály CH_2 skupin, a vzhledem k nízké koncentraci je nezbytné měřit spektra s velkým množstvím akvizic.

Tato technika je poměrně náročná na technické provedení a je také závislá na velikosti magnetického pole. Optimální výsledky technikou oMEGA-PRESS se získají při 3 T.

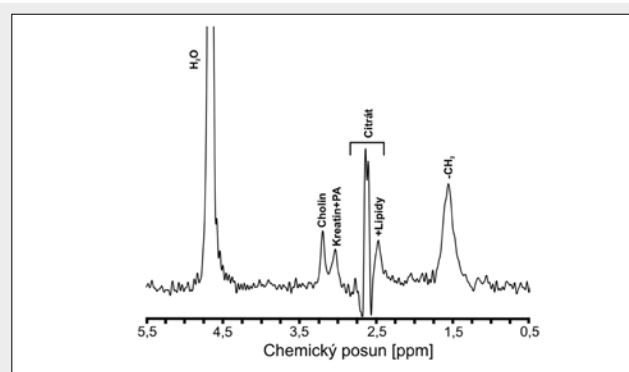
1H MR SPEKTROSKOPIE PROSTATY

Samostatnou kapitolou je 1H MR spektroskopie prostaty, kde se zaměřujeme podobně jako u mozku na jiné metabolity než na tuky. Zde hraje hlavní úlohu citrát, který je specifický pro prostatu a spolu se signálem cholinových sloučenin se používá zejména v diagnostice tumoru prostaty (v tumoru citrát klesá, cholin roste). Z dalších signálů se v prostatě sleduje kreatin a polyaminy (hlavně spermin a spermidin), u horší kvality spekter se však všechny tyto signály velmi špatně rozlišují a v některých publikacích je celá oblast od kreatinu po cholin sloučena v jedno číslo (obr. 5).

Vyšetření se provádí buď s povrchovou cívkou, nebo cívkou endorektální, která sice přináší lepší kvalitu, ale není s pochopitelných důvodů příliš oblíbená u pacientů. Pro MR spektroskopii se používá hlavně metoda 3D CSI, eventuálně její rychlejší modifikace, a konkrétní echo čas $TE = 120$ ms pro 1,5 T pole nebo $TE = 144-145$ ms pro 3 T tomografy. Tato hodnota vychází z tvaru citrátu, který ukazuje ve spektrech dublet při 1,5 T a kvadruplet při 3 T. Bohužel tato multiplicita signálu je také jedním z hlavních problémů, který dělá 1H MRS prostaty dosti obtížnou v běžné praxi. Pro úspěšné zvládnutí techniky je proto nutné velmi dobře nashimovat, tzn. doladit homogenitu pole na maximum, a mít štěstí, že se pacient během 16minutové sekvence nepohne, budou v klidu i jeho střeva a nenaplní se příliš močový měchýř, který může odsunout prostatu o kousek dál. Neméně důležité je automatické zpracování 3D CSI spekter technikou LCM a následné statistické zpracování velkých datových souborů.

Velmi výrazná souvislost mezi signálovou intenzitou citrátu, cholinových sloučenin a stupněm tumoru v prostatě vedla k tomu, že Evropská urologická společnost (ESUR) navrhla 1H MR spektroskopii jako jednu z doporučených MR metod pro standardní vyšetřování pacientů s podezřením na tumor prostaty (19). Tyto guidelines byly během let modifikovány a zjednodušeny a 1H MR spektroskopie, stejně jako hodnocení dynamického kontrastu, už uvedena není.

Na MR pracovišti IKEM se začalo s vyšetřováním prostaty v roce 2012 v rámci grantové studie. Byly využity oba tomografy 1,5 T i 3 T s použitím povrchové cívky a kromě samotného vyšetřování pacientů proběhla obsáhlá metodická

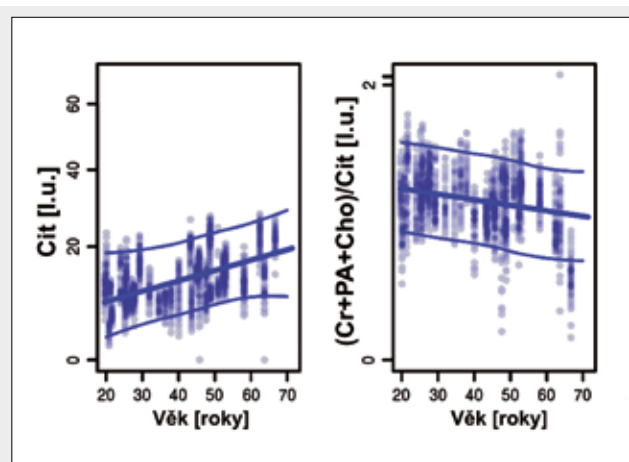


▲ Obr. 5

Obr. 5. 1H MR spektrum zdravé prostaty dobrovolníka měřené při 3 T. Měřeno povrchovou osmikanálovou cívkou sekvencí 3D spektroskopického zobrazování (3D PRESS, $TR/TE = 720/145$ ms).

Fig. 5. 1H MR spectrum of a healthy prostate measured at 3T. The 8-channel surface coil was used together with the 3D CSI PRESS sequence ($TR/TE=720/145$ ms).

ká část, kdy byl upraven software výpočtu spekter pro metabolický profil prostaty, porovnávaly se výsledky z různých polí a jejich správnost a přesnost ve vztahu k histologii jak v centrální, tak periferních zónách a v neposlední řadě byla naměřena věková závislost koncentrací jednotlivých metabolitů u skupiny zdravých dobrovolníků (20). Výsledky ukázaly, že pro zkušeného specialistu není pro správnou diagnostiku příliš důležitá velikost magnetického pole, protože s vyš-



▲ Obr. 6

Obr. 6. Závislost intenzity citrátu a poměru intenzit součtu $(Cr+PA+Cho)$ k citrátu na věku. Statistika byla provedena na základě dat získaných technikou LCMoDel z přibližně 9000 CSI spekter zdravých dobrovolníků ve věku 20–70 let.

Cr – celkový kreatin, PA – polyaminy, Cho – cholinové sloučeniny, Cit – citrát
Fig. 6. The dependence of citrate signal intensity and intensity ratio of sum of $(Cr+PA+Cho)$ to citrate on age. The statistics was based on LCMoDel calculation from cca 9,000 spectra from healthy volunteers in the age range of 20 to 70 years.

Cr – total creatine, PA – polyamines, Cho – choline compounds, Cit – citrate

ším polem roste i složitost spektra, a je nezbytné využít speciální programy na zpracování spekter. Co se ukázalo velmi důležité, je závislost intenzit jednotlivých signálů na věku (obr. 6). Ve zdravé prostatě se např. koncentrace citrátu mezi 20. a 70. rokem zvětšuje více než dvakrát, vysoký nárůst je i v hodnotách polyaminů. Pravděpodobně to souvisí s hodnotami koncentrace zinku v prostatických buňkách. Vzhledem k tomu, že např. celkový kreatin se drží během stárnutí téměř konstantní, dochází s věkem i ke změnám v poměrech intenzit signálů, což může vést až k nesprávné interpretaci naměřených spekter.

ZÁVĚR

In vivo ^1H MRS vyšetření je užitečná neinvazivní metoda, kterou lze použít pro přesné měření obsahu tuku ve tkáni a tímto způsobem kalibrovat zobrazovací postupy stanovení steatózy. Na druhou stranu je nutné si pamatovat, že široké signály v *in vivo* spektrech obsahují řadu piků podobných sloučenin a jejich zastoupení se může měnit. Detailnější analýzu tuků *in vivo* může umožnit v budoucnu vyšetřovací technikou ^{13}C MR spektroskopie při 7 T a vyšších polích.

LITERATURA

1. Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L, et al. Proton MR spectroscopy in quantitative *in vivo* determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995; 5(3): 281–285.
2. Guiu B, Petit JM, Loffroy R, Salem DB, Aho S, Masson D, et al. Quantification of liver fat content: comparison of triple-echo chemical shift gradient-echo imaging and *in vivo* proton MR spectroscopy. *Radiology* 2009; 250(1): 95–102.
3. Guiu B, Loffroy R, Petit JM, Aho S, Salem DB, Masson D, et al. Mapping of liver fat with triple-echo gradient echo imaging: validation against 3.0-T proton MR spectroscopy. *Eur Radiol* 2009; 19(7):1786–1793.
4. Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 2006; 49(5): 450–465.
5. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6): 1313–1321.
6. Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, et al. MR spectroscopy as a tool for *in vivo* determination of steatosis in liver transplant recipients. *Magn Reson Mater Phy* 2011; 24(5): 297–304.
7. Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, et al. Stanovení obsahu jaterního tuku metodou ^1H MR spektroskopie. *Čas. Lék. čes.* 2011; 150: 68–71.
8. Hejlová I, Dezortová M, Šedivý P, et al. Metabolický profil pacientů po transplantaci jater ve vztahu k rozvoji NAFLD – výsledky pilotní studie. *Gastroent Hepatol* 2016; 70(4): 325–330.
9. Kahleova H, Belinova L, Malinska H, et al. Eating two larger meals a day (breakfast and lunch) is more effective than six smaller meals in a reduced-energy regimen for patients with type 2 diabetes: a randomized crossover study. *Diabetologia* 2014; 57: 1552–1560.
10. Trout AT, Serai S, Mahley AD, Wang H, Zhang Y, Zhang B, et al. Liver stiffness measurements with MR elastography: agreement and repeatability across imaging systems, field strengths, and pulse sequences. *Radiology* 2016; 281(3): 793–804.
11. Drobny M, Sedivy P, Dezortova M, Wagnerova D, Hajek M. Influence of breathing on the measurement of lipids in the myocardium by ^1H MR spectroscopy. *Phys Res* 2015; 64(Suppl 3): S403–S409.
12. Schick F, Eismann B, Jung WI, Bongers H, Bunse M, Lutz O. Comparison of localized proton NMR signals of skeletal muscle and fat tissue *in vivo*: two lipid compartments in muscle tissue. *Magn Reson Med* 1993; 29(2): 158–167.
13. Skoch A, Jiru F, Dezortova M, Krusino-va E, et al. Intramyocellular lipid quantification from ^1H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCMoDel technique. *J Magn Reson Imaging* 2006; 23: 728–735.
14. Teplan V, Schüick O, Hájek M, et al. Obezita po transplantaci ledviny: metabolické změny a vyšetření pomocí magnetické rezonance. *Aktuality v nefrologii* 2007; 13(1): 11–15.
15. Kratochvilova S, Škoch A, Wohl P, et al. Intramyocellular lipid content in subjects with impaired fasting glucose after telmisartan treatment, a randomised crossover trial. *Magn Reson Imaging* 2016; 34(3): 353–358.
16. Mescher M, Tannus A, Johnson MO, Garwood M. Solvent suppression using selective echo dephasing. *J Magn Reson A* 1996; 123: 226–229.
17. Mescher M, Merkle H, Kirsch J, Garwood M, Gruetter R. Simultaneous *in vivo* spectral editing and water suppression. *NMR Biomed* 1998; 11: 266–272.
18. Skoch A, Tosner Z, and Hajek M. The *in vivo* J-difference editing MEGA-PRESS technique for the detection of n-3 fatty acids. *NMR Biomed* 2014; 27: 1293–1299.
19. Barentsz JO, Richenberg J, Clements R, et al. ESUR prostate MR guidelines 2012. *Eur Radiol* 2012; 22: 746–775.
20. Dezortova M, Jiru F, Skoch A, et al. The aging effect on prostate metabolite concentrations measured by ^1H MR spectroscopy. *Magn Reson Mater Phy* 2017; 30(1): 65–74.

Abstrakta týkající se obsahu dizetační práce
plnohodnotná součást daného čísla časopisu



KAZUISTIKY V ANGIOLOGII

časopis pro angiology

Ročník 2.
Číslo 1/2015

ISSN 2336-2790
Registrační číslo: MK ČR E 21515

Tento sborník vychází současně
jako řádné číslo časopisu Kazuistiky v angiologii
a současně jako neperiodická publikace –
sborník pro potřeby konference:
40. Angiologické dny 2015.

ISBN 978-80-87969-09-0

Vydává:
Nakladatelství GEUM, s.r.o.

Vydavatel:
Nakladatelství GEUM, s.r.o.
Příkrý 118, 513 01 Semily
www.geum.org

Inzertní oddělení:
Jitka Sluková
tel.: 606 734 722
e-mail: inzerce@geum.org

Redakce:
Kazuistiky v angiologii
Nakladatelství GEUM, s.r.o.
Nádražní 66, 513 01 Semily
tel./fax: 481 312 858
tel.: 721 639 079
e-mail: geum@geum.org

Mgr. Karel Vízner (šéfredaktor)
e-mail: karelvizner@geum.org

Klára Krupičková
e-mail: krupickova@geum.org

Redakční rada:
MUDr. Ewald Ambrozy, PhD.
MUDr. Katarína Dostálová, PhD., MPH
doc. MUDr. Jana Hirmerová, Ph.D.
MUDr. Martin Holý
doc. MUDr. Jean-Claude Lubanda, Ph.D.
MUDr. Jiří Matuška
MUDr. Pavlína Pithová
MUDr. Václav Procházka, Ph.D.
MUDr. Karel Roztočil, CSc.
MUDr. Jan Stryja, Ph.D.
prim. MUDr. Jan Zeman

Zástupce vydavatele:
Mgr. Kamila Víznerová

Redakční zpracování, ilustrační fotografie:
GEUM – Mgr. Karel Vízner

Tisk:
Tiskárna Glos Semily, s.r.o.
e-mail: tiskarna@glos.cz



40th Angiological Days 2015

40. Angiologické dny 2015

with Interantional Participation
s mezinárodní účastí

February 19 – 21, 2015
Prague, Czech Republic

Book of Abstracts



ENDOVASCULAR TREATMENT OF ANEURYSMS LOCATED AT THE ORIGIN OF DUCTUS BOTALLI IN ADULT PATIENTS

Šedivý P.¹, El Samman K.¹, Přindišová H.², Černý Š.³

¹Dept. of Vascular Surgery, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

²Dept. of Interventional Radiology, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

³Dept. of Cardiac Surgery, Na Homolce Hospital, Prague, Czech Republic

Introduction: *Ductus arteriosus Botalli* (DA) allows most of the blood in fetal pulmonary artery to by-pass pulmonary circulation directly to the distal part of aortic arch. Early after birth it spontaneously occludes and during three months becomes the fibrous ligamentum arteriosum. Persisting DA is usually diagnosed in early childhood and it is usually corrected by interventional cardiologist or cardiac surgeon. The location of the DA origin on the aortic arch is a locus minoris resistentiae due to abnormal intraductal tissue. Saccular or conical pseudoaneurysms can originate on this spot during adulthood.

Methods: During 2008–2014 we diagnosed and treated symptomatic and asymptomatic aneurysms in a typical location at distal part of the aortic arch in 10 patients. They were 6 men and 4 women aged 66–87 (median 79 years). Hoarseness was the major sign in five persons due to laryngeal nerve compression (Ortner sy.), four aneurysms were asymptomatic. One patient had acute hemorrhage from symptomatic aneurysm. In six patients we treated endovascularly with stent graft (SG), in four we did hybrid intervention. Left subclavian artery was



Fig. 1. “Triple star” sign, an aneurysm at the aortic arch anterior wall

revascularized simultaneously with SG in one patient or early after endovascular intervention in two patients. Branched aorto-anonymal-and-subclavian by-pass was performed before endovascular treatment in one patient.

Results: The pseudoaneurysm was successfully covered with subsequent thrombosis in 9 patients. Perioperatively, one patient had type I endoleak, she suffered transitory ischemic attack and respiratory failure with the necessity of prolonged artificial ventilation and she died on the 31st day after intervention. An average length of stay in survivors was 13 days. An average follow up is 18 months (5–29).

Conclusion: The location of the DA origin on the aortic arch in adults is a weakened spot where rarely pseudoaneurysms may originate. Endovascular treatment with SG represents a less invasive alternative to open surgery in selected patients.

DYNAMIC ³¹P MR SPECTROSCOPY IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERIAL OCCLUSIVE DISEASE

Šedivý P.¹, Dezortová M.¹, Drobný M.¹, Wagnerová D.¹, Rydlo J.¹, Roztočil K.², Hájek M.¹

¹MR-Unit, Dept. Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Transplant Surgery Dept., Transplantcentre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Dynamic phosphorous (³¹P) MR spectroscopy allows non-invasive study of the differences in an energetic metabolism between patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease (PAOD) and healthy subjects.

The aims of the study were: 1) to determine how ischemia influences muscle metabolisms in PAOD patients; 2) to find out the potential of the method in clinical routine to assess the severity of ischemia in individual patients.

We examined 25 patients (70±7 years, BMI=27±4 kg/m², 18 males and 7 females) with PAOD and 21 healthy controls (41±12 years, BMI=28±2 kg/m², 12 males and 9 females). Dynamic ³¹P MR spectroscopy was performed on a whole-body 3T MR system with dual ¹H/³¹P surface coil and home-made pedal ergometer. The subjects were examined in a supine position with the coil fixed to the medial head of the gastrocnemius muscle. The dynamic examination consisted of 2 min rest period followed by 6 min exercise (plantar flexion once every 2 s; 7 kg weights) and final 6 min of recovery. Signal intensity ratios of phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (Pi) and phosphodiester (PDE) to ATP and intramyocellular pH were calculated from the rest spectrum together with drop of PCr, pH, rate of PCr recovery and mitochondrial capacity from the dynamic part of the examination.

We found significantly reduced mitochondrial capacity, very prolonged rate of phosphocreatine recovery and lower pH in the end of exercise in patients compared with healthy subjects.

42nd Czech Angiology Days 2017

42. Angiologické dny 2017

with Interantional Participation
s mezinárodní účastí

February 23 – 25, 2017
Prague, Czech Republic

Book of Abstracts

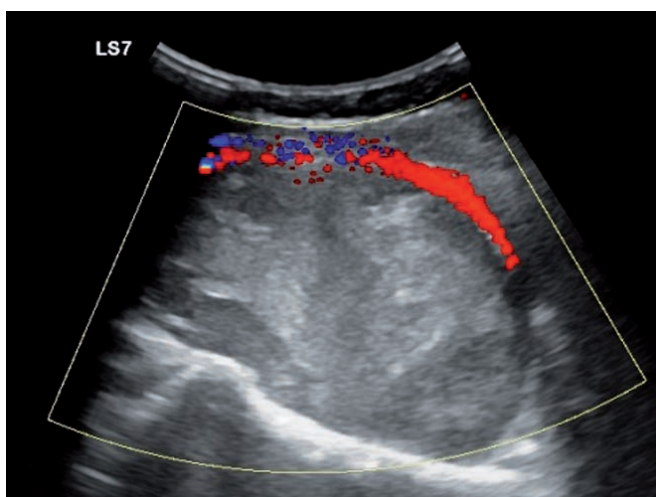


AN ATYPICAL CAUSE OF LEG SWELLING

Čermáková H., Roztočil K., Janoušek L., Froněk J.
Department of Transplantation and Vascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Our case report concerns 49 years old man. He pointed out in the 2013 year an asymmetric swelling of his right calf. It was no painfull. Several times he went to the regional hospital doctor. Deep vein thrombosis were excluded several times. He had been diagnosed as a Baker's cyst and an ortopedy doctor left him without specific treatment except of rehabilitation.

At the beginning of the 2017 year he came to IKEM hospital. We found using an ultrasound under his knee a bearing formation (13 x 7 x 5 cm) seemed to be a tumor. The same was possible to see from the CT documentation. He underwent operational revision of his right calf with the aim of removing formation. Perioperative histology was unfavorable – liposarcoma. Now we are waiting for the definitive histology which will decide on further action.



³¹P MR SPECTROSCOPY IN PATIENTS WITH PERIPHERAL ARTERY OCCLUSIVE DISEASE

Dezortová M.¹, Šedivý P.¹, Drobny M.¹, Roztočil K.², Čermáková H.², Němcová A.³, Dubský M.³, Peregrin J.¹, Hájek M.¹

¹Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Transplant Surgery Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

³Department of Diabetes, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

³¹P MR spectroscopy (MRS) is a powerful tool for the non-invasive investigation of muscular oxidative metabolism and its impairment done by ischemia in patients with peripheral artery occlusive disease (PAOD).

The ³¹P MRS examination at rest provides quantitative parameters that characterize the basal muscle metabolism. From dynamic ³¹P MRS data there can be calculated mitochondrial capacity (Q_{max}), phosphocreatine (PCr) recovery rate or pH changes during exercise.

Our goal was to describe changes in muscle metabolism caused by PAOD with and without diabetes and to find out if the method is applicable under clinical conditions for the disease evaluation.

Calf muscles of 19 PAOD patients (70±8 years, BMI 26.4±4.3 kg/m²) and 28 PAOD patients with diabetes (mean age 67±8 years, BMI 28.6±4.2 kg/m², TcpO₂ 26±12 mmHg) were examined together with a control group of 19 healthy volunteers (mean age 58±10 years, BMI 27.1±4.1 kg/m²). All the subjects provided their informed consent in line with local Ethical Committee rules.

³¹P MRS examination was performed at 3T MR system using a home built ergometer. Dynamic part consisted of 6 mins of plantar flexion (once per 2s, 7 kg weight) followed by 6 mins recovery. Signal intensity ratios of PCr/ATP, inorganic phosphate (Pi)/ATP, PCr/Pi, phosphodiester (PDE)/ATP and intramyocellular pH were estimated from the rest MR spectra. A drop of PCr and pH at the end of the exercise, PCr recovery rate and Q_{max} were calculated from the dynamic part of the examination.

In all patients, significantly lower Q_{max} and pH during exercise were found together with prolongation of PCr recovery rate after the exercise. The effect of diabetes was significantly pronounced at rest compared to controls and PAOD patients without diabetes. Thus, rest and dynamic ³¹P MR spectroscopy can be used for the description of severity of peripheral arterial occlusive disease.

The study was supported by GAUK no. 315 and 00023001IKEM Institutional support.

These results show negative influence of PAOD on oxidative muscle metabolism. Smaller rate of oxidative metabolism caused predominance of anaerobic metabolism and drop of pH. Big drop of pH and prolonged rate of PCr recovery explains the subjective discomfort (e.g. claudications and fatigue) in PAOD patients.

The study was supported by projects IGA MH CR NT11275-6 and MHCZ-DRO 00023001 IKEM.

SUPERFICIAL VENOUS THROMBOSIS – MYTHS AND REALITY

Štvrtinová V., Štvrtina S.

2nd Clinic of Internal Medicine and Department of Pathology, Comenius University, Faculty of Medicine, Bratislava, Slovakia

Superficial venous thrombosis (SVT) is etiologically a heterogeneous group of disorders with a different degree of inflammation and thrombosis. SVT has long been considered as a benign and limited disease or sign of chronic venous insufficiency, to be managed with local and/or systemic anti-inflammatory drugs in combination with elastic stockings. In many cases SVT is a banal condition which resolves spontaneously, but in recent years due to systematic ultrasound investigation of the venous system a large number of deep venous thromboses concomitant with SVT has been revealed. Several studies have confirmed an association between SVT and venous thromboembolism (VTE). SVT located in the saphenous main trunk seems to have the strongest association with VTE. Some physicians consider SVT an integral part of VTE, together with deep venous thrombosis and pulmonary embolism.

The clinical diagnosis of SVT is easy as symptoms and signs are overt. But for precise evaluation of the SVT extension compression duplex ultrasound (DUS) investigation is needed. Clinical investigation may underestimate the real extent of superficial thrombophlebitis, and does not give enough information on the status of the deep venous system. DUS allows evaluate the extension of the thrombus into the deep venous system through perforating veins or through sapheno-femoral and/or sapheno-popliteal junctions.

The aim of the treatment is to stop the extension of SVT in the superficial vein, to reduce the inflammation of the vein and perivenous tissues as well as to prevent the extension of the thrombus formation into the deep and the communicating venous system. The main therapeutic procedure is compression and mobilization. In patients with a limited SVT in a varicose vein (varicophlebitis) local treatment and mobilization with elastic compression will be sufficient. In contrast to SVT of a healthy vein varicophlebitis is a banal condition in majority of cases. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may be given, either systematically or locally. Especially in cases of extensive SVT anticoagulant therapy is a good choice. According the CEVF Consensus Proposal (2011) and Consensus