

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: lékařská biofyzika

Studijní obor: lékařská biofyzika



Mgr. Petr Šedivý

MR zobrazení a MR spektroskopie člověka při fyzické zátěži (MR spektroskopické zobrazování, MR difúzometrie, MR relaxometrie aj.)

MR imaging and MR spectroscopy of human during physical stress (MR spectroscopy imaging, MR diffusometry, MR relaxometry etc.)

Dizertační práce

Školitel: Ing. Milan Hájek, DrSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

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

V Praze, 4.4.2018

Petr Šedivý

Identifikační záznam:

Šedivý, Petr. *MR zobrazení a MR spektroskopie člověka při fyzické zátěži (MR spektroskopické zobrazování, MR difúzometrie, MR relaxometrie aj.), [MR imaging and MR spectroscopy of human during physical stress (MR spectroscopy imaging, MR diffusometry, MR relaxometry etc.)]*. Praha, 2018. 129 stran, 1 příloha. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Vedoucí práce Hájek, Milan.

Abstrakt

Dizertační práce se věnuje *in vivo* fosforové (^{31}P) MR spektroskopii (MRS) a ^1H MR zobrazování (MRI) svalové tkáně spojené s vykonáváním fyzické zátěže. Teoretická část dizertační práce popisuje zejména fosforovou spektroskopii jak z pohledu metodiky měření, tak z pohledu klinického využití fosforové MR spektroskopie ve spojitosti s výzkumem metabolických změn probíhajících ve svalové tkáni při diabetu, srdečním selhání a při ischemické chorobě dolních končetin (ICHDK). Výsledky dizertační práce lze rozdělit na metodické a na klinické. Metodické výsledky zahrnují technické úpravy experimentálního vybavení, vývoj softwaru a experimentální poznatky o reprodukovatelnosti zátěžové ^{31}P MRS. ^1H MR zobrazování v kombinaci se zátěží je v dizertační práci užito k posouzení zapojení jednotlivých svalů lýtko do vykonaného pohybu na chodidlovém MR kompatibilním ergometru. První část klinických výsledků dizertační práce popisuje metabolické změny při diabetu a při kritické ischemii. U kritické ischemie je také hodnocen efekt léčby angioplastikou, nebo transplantací mezenchymálních kmenových buněk. Druhá část klinických výsledků se zabývá porovnáním metabolismu pacientů se srdečním selháním, jež je komplikováno sideropenií. U těchto pacientů byl zkoumán efekt experimentální léčby karboxymaltózou železa.

Klíčová slova

svalový metabolismus, MR zobrazení, MR spektroskopie, lýtkový sval, zátěžová ^{31}P MR spektroskopie, ischemie, diabetes mellitus, srdeční selhání

Abstract

The dissertation is concerned to in vivo phosphorus MR spectroscopy (^{31}P MRS) and ^1H MR imaging (MRI) of muscle in combination with physical workload. The theoretical part of the thesis describes methodology of ^{31}P MRS measurement and its clinical use in research of metabolic changes in diabetes, heart failure and peripheral artery disease (PAD). The results of the thesis are divided into methodical and clinical parts. Methodical results deal with the construction of experimental equipment, software modification and development, and show of the reproducibility of the dynamic ^{31}P MRS. The MRI after exercise was used to describe involvement of the individual calf muscles to muscle contraction during pedal movement in MR compatible ergometer. The first part of the clinical results of the thesis describes changes in muscle metabolism during diabetes and critical ischemia. In patients with critical ischemia the effect of treatment by angioplasty or transplantation of mesenchymal stem cells was evaluated. In the second part of the clinical results the metabolism of patients with heart failure complicated by sideropenia was studied. In these patients the effect of experimental treatment by iron carboxymaltose was described.

Keywords

muscle metabolism, MR imaging, MR spectroscopy, calf muscle, dynamic ^{31}P MR spectroscopy, ischemia, diabetes mellitus, heart failure

Rád bych na tomto místě poděkoval především vedoucímu mé dizertační práce panu Ing. Milanu Hájkovi, DrSc. za všestrannou pomoc a rady. Dále bych chtěl poděkovat za pomoc kolegům Mgr. Monice Dezortové, Ph.D., Mgr. Miloslavu Drobnému, Mgr. Filipovi Jírů, Ph.D., Mgr. Ditě Pajuelo, Ph.D. a Ing. Janu Rydlovi. Dále děkuji všem dobrovolníkům, kteří se účastnili vyšetření vykonaných v rámci mé dizertační práce a kolegům z Vídeňské univerzitní nemocnice. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu při studiu a při sepisování této dizertační práce.

Studie byly podpořeny výzkumným záměrem IKEM (IKEM00023001), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 315), Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (projekt: NT11275-6) a Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky (projekt: 15-26906A).

Obsah

Seznam zkratek a nejdůležitějších proměnných	9
1 Úvod.....	11
2 Cíle dizertační práce	13
3 Teoretický úvod	14
3.1 Základní fyzikální principy magnetické rezonance, MR zobrazování a MR spektroskopie	14
3.2 ³¹ P MRS	17
3.2.1 Charakteristika ³¹ P MRS	17
3.2.2 Fosforové metabolity ve tkáni	18
3.2.3 Lokalizační techniky ³¹ P MRS	22
3.2.4 Parametry zátěžové ³¹ P MRS.....	28
3.2.5 ³¹ P MR saturační transfer.....	37
3.2.6 Klinické využití ³¹ P MRS	39
3.3 ¹ H MR zobrazení svalu ve spojitosti s fyzickou zátěží	46
4 Experimentální část.....	48
4.1 Pacientské skupiny a dobrovolníci.....	48
4.2 Experimentální vybavení	50
4.2.1 MR tomografy.....	50
4.2.2 Ergometry	50
4.3 Vyšetřovací protokoly	52
4.3.1 Protokoly ³¹ P MRS	52
4.3.2 ¹ H MRI protokol	54
4.4 Použitý vyhodnocovací software a metodika zpracování zátěžové ³¹ P MRS..	56
4.5 Statistické hodnocení	57
5 Výsledky	58
5.1 Metodické výsledky	58
5.1.1 Hodnoty reprodukovatelnosti zátěžové ³¹ P MRS a posouzení vlivu magnetického pole a experimentálního vybavení na výsledné parametry zátěžové ³¹ P MRS.....	58
5.1.2 Simulace vlivu parametrů vyšetření na přesnost určení PCr recovery konstanty.....	64
5.1.3 Technické úpravy ergometru a další zdokonalení experimentálního vybavení pro zátěžovou ³¹ P MRS provedené v rámci dizertační práce....	65
5.1.4 Vyvinutý software.....	68
5.1.5 Zapojení svalů z ¹ H MRI	74
5.2 Klinické ³¹ P MRS studie	76
5.2.1 ³¹ P MRS u pacientů s diabetem mellitus - vliv nefropatie a pohlaví.....	76
5.2.2 ³¹ P MRS u pacientů s ischemií dolních končetin.....	76
5.2.3 Svalový metabolismus u srdečního selhání a sideropenie	84
6 Diskuze	87
6.1 Metodické výsledky ³¹ P MRS.....	87

6.1.1	Hlavní faktory ovlivňující klidovou a zátěžovou ^{31}P MRS a omezení metody	87
6.1.2	Nastavení protokolu ^{31}P MRS a výběr použitých parametrů s ohledem na možnosti měření v IKEM.....	92
6.1.3	Hodnocení reprodukovatelnosti zátěžové ^{31}P MRS a posouzení vlivu magnetického pole a experimentálního vybavení na výsledné parametry zátěžové ^{31}P MRS	97
6.1.4	Simulace vlivu parametrů vyšetření na přesnost určení τ_{PCr}	99
6.1.5	^1H EPI MR zobrazení svalu po zátěži.....	100
6.2	Klinické výsledky.....	101
6.2.1	^{31}P MRS u pacientů s diabetem mellitus - vliv nefropatie.....	101
6.2.2	^{31}P MRS u pacientů s ischemií dolních končetin v kombinaci s diabetem mellitus	102
6.2.3	Srdeční selhání	107
7	Závěr	109
8	Literatura.....	110
	Příloha I - přehled publikací a jejich manuscripty	

Seznam zkratek a nejdůležitějších proměnných

^1H , ^{13}C , ^{31}P MRS	Protonová, uhlíková a fosforová spektroskopie magnetickou rezonancí
ABI	Ankle Brachial Index, kotníkový index
Acq	Akvizice
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
AU	Arbitrary Unit, arbitrární jednotka
BMI	Body Mass Index, index tělesné hmotnosti
BOLD	Blood Oxygenation Level Dependent
CEMR	Center of Excellence for MR research (Medical University of Vienna)
CNS	Centrální Nervová Soustava
CRLB	Cramér–Rao Lower Bound, Cramer Raova dolní mez
CSI	Chemical Shift Imaging, chemické zobrazování, spektroskopické zobrazování
<i>CV</i>	Coefficient of Variation, koeficient variace
<i>APCr</i>	Pokles fosfokreatinu během zátěže
DM1	Diabetes mellitus typu 1
DM2	Diabetes mellitus typu 2
DRESS	Depth Resolved Surface Coil Spectroscopy
DTI	Diffusion Tensor Imaging, traktografie
EPI	Echo Planar Imaging
FA	Flip Angle, sklápěcí úhel
FID	Free Induction Decay, signál volné precese
fMRI	Functional MR Imaging, funkční MR zobrazování
FT	Fourierova Transformace
GUI	Graphical User Interface, grafické uživatelské rozhraní
HF	Heart Failure, srdeční selhání
<i>ICC</i>	Intra–Class Correlation
ICHDK	Ischemická Choroba Dolních Končetin
IR	Inversion Recovery
ISIS	Image-Selected In-vivo Spectroscopy
LASER	Localization by Adiabatic SElective Refocusing
LV EF	Left Ventricular Ejection Fraction, ejekční frakce levé komory
m.	Musculus, sval
Meas.	Measurements, měření

MRI	Magnetic Resonance Imaging, zobrazování magnetickou rezonancí
MVF	Maximal Voluntary Force, maximální vynutitelná síla
NADH	NikotinamidAdeninDinukleotid
NYHA	New York Heart Association Functional Classification, funkční klasifikace srdečního selhání
Q_{max}	Mitochondriální kapacita
p	Pravděpodobnost
PCA	Principal Component Analysis, analýza hlavních komponent
PCr	Fosfokreatin
PDE	Fosfodiesterý
pH	Intramyocelulární pH
PHP	Hypertext PreProcessor, programovací jazyk PHP
Pi	Anorganický fosfát
PME	Fosfomonoestery
PTA	Perkutánní Transluminální Angioplastika
r	Pearsonův korelační koeficient
P_{tot}	Suma signálu metabolitů v ^{31}P MRS spektru
rf	Radiofrekvenční
S	Sideropenie
SAR	Specific Absorption Rate, měrný absorbovaný výkon
SNR	Signal Noise Ratio, poměr signálu vůči šumu
ST	Saturační transfer
T_1	Spin-mřížkový relaxační čas
T_2	Spin-spinový relaxační čas
T_{cpO_2}	Transkutánní tenze kyslíku
TE	Echo čas
TI	Inverzní čas v IR
TR	Repetiční čas
TXT	Textový soubor/formát
τ_{PCr}	Recovery čas (konstanta) fosfokreatinu
VOI	Volume Of Interest, vybraná oblast zájmu
V_{PCr}	Počáteční rychlost tvorby PCr

1 Úvod

MR spektroskopie (MRS), MR zobrazování (MRI) a další odvozené MR techniky jsou moderní vyšetřovací metody, které umožňují získat strukturní, biochemickou či jinou požadovanou informaci o tkáni. Jejich hlavní výhoda spočívá v neinvazivnosti a v možnosti daná vyšetření u jednotlivých osob bez známého zdravotního rizika opakovat. Z těchto uvedených důvodů se magnetická rezonance, zejména MR zobrazování, stala velmi rychle důležitou diagnostickou metodou v lékařství. Speciálnější techniky jako zmíněná MR spektroskopie nebo kvantitativní difúzometrie, relaxometrie, traktografie, funkční MRI, MRI elastografie se úspěšně rozvíjejí především ve specializovaných centrech, kde byly tyto metody použity k výzkumu řady onemocnění a kde neustále dochází k jejich technickým inovacím.

Ačkoliv se stále největší pozornost použití magnetické rezonance v lékařství soustřeďuje na CNS, je také svalová tkáň jedním z nejpříhodnějších orgánů, které lze vyšetřovat pomocí MR. V poškození svalové tkáně a v limitaci její funkce se totiž odráží postup řady závažných onemocnění, jako je diabetes mellitus nebo ischemická choroba. Konkrétně fosforová MR spektroskopie (^{31}P MRS) přináší možnost detailního *in vivo* zkoumání energetického metabolismu svalu. Mimo zjišťování klidového zastoupení metabolitů fosfokreatinu, anorganického fosfátu, adenosintrifosfátu, fosfodiesterů a pH, jež vypovídají o klidovém energetickém a membránovém metabolismu, lze využít i zátěžovou ^{31}P MRS, která poskytuje údaje o funkci svalu za zvýšených metabolických nároků. Zátěžová ^{31}P MRS obnáší vyšetření konkrétního svalu při fyzické zátěži. Z takto provedeného vyšetření lze dopočítat pokles pH během zátěže, rychlost obnovy PCr nebo celkovou teoreticky dosažitelnou výkonnost oxidativního metabolismu mitochondrií, tzv. mitochondriální kapacitu - Q_{max} (Kemp G. J. et al., 1993). Protonová MR spektroskopie (^1H MRS) u svalu podává doplňkovou informaci zejména o zastoupení mastných kyselin, cholinových sloučenin a celkového kreatinu. U mastných kyselin lze rozlišit signály od alifatického řetězce lipidů pocházejícího z extra nebo intramyocelulárního tuku (Skoch A. et al., 2006). Při zátěži lze navíc získat informaci o produkci laktátu (Meyerspeer M. et al., 2007) nebo saturaci myoglobinu (Richardson R. S. et al., 2001).

Technicky nejsložitější je ^{13}C MR spektroskopie (^{13}C MRS), která umožňuje zjistit zastoupení svalového glykogenu (de Graaf R. A., 2007).

Další oblast MR metod obnáší sledování T_1 , T_2 a T_2^* relaxačních časů. T_1 , T_2 relaxační časy jsou parametry, které popisují vývoj magnetizace v transverzální (T_2 čas) a podélné (T_1 čas) rovině ke statickému magnetickému poli. Jejich velikost závisí na několika různých typech spinových interakcí (Levitt M. H., 2008) a je úměrná i pohyblivosti molekul (de Graaf R. A., 2007) nebo přítomnosti feromagnetických látek (Hájek M. et al., 2005). T_2^* vyjma toho, že závisí na nehomogenitě magnetického pole MR tomografu, tak jeho velikost ovlivňuje i poměr mezi okysličenou (diamagnetická) a neokysličenou (paramagnetickou) krví ve tkáni. Proto lze buď v kombinaci s fyzickou zátěží (Towse T. F. et al., 2011) nebo zaškrcením končetiny (Schewzow K. et al., 2013) určovat dynamiku prokrvení svalové tkáně v reakci na tyto zmíněné podněty.

Pomocí měření difúze a z ní odvozené traktografie je možné u svalu zjišťovat architekturu svalových vláken (Heemskerk A. M. et al., 2005). MR elastografie slouží u svalu k určení jeho mechanických vlastností (Uffmann K. et al., 2004). Speciální tzv. „tagging sekvence“ dokonce dovolují měřit deformaci svalu při jeho kontrakci (Finni T. et al., 2003).

Z nastíněného přehledu metod je patrné, že výčet informací, které umožňuje magnetická rezonance získat o svalu, je opravdu velký. Je pochopitelné, že je nutné udělat jejich konkrétní výběr tak, aby vyšetření bylo pro pacienta časově akceptovatelné a podávalo potřebnou klinicky využitelnou informaci. Dizertační práce je zejména zaměřena na ^{31}P MRS, která byla využita k charakterizaci svalového metabolismu u pacientů trpících diabetem nebo kardiovaskulárními onemocněními.

2 Cíle dizertační práce

Dizertační práce měla několik cílů. Prvním úkolem dizertační práce bylo navrhnout a optimalizovat vyšetřovací postup a vybavení pro zátěžovou ^{31}P MRS v IKEM a vyzkoušet další možné MR techniky v kombinaci se zátěží.

Druhým úkolem bylo vyšetřit a vyhodnotit zdravé dobrovolníky a pacienty s diabetem mellitus a kardiovaskulárními onemocněními (srdeční selhání, ischemická choroba dolních končetin) pomocí ^{31}P MRS a zjistit, zda existuje závislost mezi koncentrací metabolitů v tkáních a klinickými parametry, a popřípadě, zda ^{31}P MRS dovoluje hodnotit efekt léčby u těchto pacientů. Tyto choroby byly vybrány z toho důvodu, že se jedná o závažná onemocnění, která postihují velké procento populace a v odborné literatuře se diskutuje o podílu svalového metabolismu na patofyziologii těchto onemocnění (zejména u diabetu druhého typu (Petersen K. F. et al., 2004)). V rámci léčby se u diabetických pacientů trpících syndromem diabetické nohy hodnotil efekt perkutánní transluminální angioplastiky (PTA) a efekt implantace mezenchymálních kmenových buněk na svalový metabolismus. U pacientů trpících srdečním selháním a sideropenií se zkoumal vliv podávání intravenózního přípravku s obsahem železa (karboxymaltóza železa).

Třetím úkolem dizertační práce bylo vyvinout vyhodnocovací software s GUI rozhraním (grafické uživatelské rozhraní) pro zpracování naměřených dat souvisejících s provedenou zátěží v MR tomografu, který by mohli jednoduše využívat i ostatní vědečtí pracovníci a lékaři v IKEM nebo v jiných institucích.

Nedílnou součástí dizertační práce byla i publikační činnost, zvláště tvorba recenzovaných a impaktovaných publikací a příprava jednotlivých abstrakt na vědecké konference týkající se tématu dizertační práce.

3 Teoretický úvod

3.1 Základní fyzikální principy magnetické rezonance, MR zobrazování a MR spektroskopie

Využití tomografu magnetické rezonance je založeno na principu zákonitostí pohybu a orientace atomových jader v magnetickém poli a možnosti tento pohyb ovlivnit radiofrekvenčními pulzy a zpětně ho i detekovat.

MRS stejně jako MRI využívá statické magnetické pole tomografu pro vytvoření dvou populací atomových jader, které mají odlišný průmět svého jaderného spinu (vnitřní moment hybnosti) do magnetického pole. Každý průmět je kvantován a charakterizován odlišnou energií a magnetickým momentem. Atomová jádra mohou měnit svůj průmět jaderného spinu, k tomu je však potřeba přijmout nebo odevzdat přesnou velikost energie. Velikost této energie určuje rezonanční podmínka:

$$\omega_{\text{rezonanční}} = \gamma B_0 \quad (1)$$

kde B_0 je statické pole vytvářené magnetem nebo solenoidem tomografu a γ je gyromagnetický poměr daného jádra izotopu.

Potřebnou energii lze dodat pomocí radiofrekvenčního záření o frekvenci odpovídající rezonanční podmínce. To je realizováno MR cívkami, které mimo tvorby radiofrekvenčního pole manipulujícího s orientací jaderného spinu, slouží také k samotné detekci signálu. Signál pochází od jader, jejichž jaderné spiny podléhají časovému vývoji v transverzální rovině k magnetickému poli. Makroskopicky se detekuje magnetizace, což je suma magnetických momentů atomových jader.

Další velmi důležitou součástí MR tomografu je systém gradientních cívek, který umožňuje modulovat velikosti statického magnetického pole, a tím kódovat do signálu prostorové souřadnice.

Vývoj magnetizace lze ve značné části případů popsat pomocí Blochových rovnic (de Graaf R. A., 2007). Rovnice jsou odvozené od pohybu částice s magnetickým momentem v magnetickém poli a doplněné o členy, které vystihují tzv. spin-mřížkovou (T_1) a spin-spinovou (T_2) relaxaci. Spin-spinová relaxace vyjadřuje úbytek magnetizace v transverzální rovině ke statickému magnetickému poli (charakterizována T_2 relaxačním časem) v důsledku rozfázování pohybu jader vlivem lokálních magnetických polí od spin-spinových interakcí (Levitt M. H., 2008). Spin-mřížková

relaxace (charakterizována T_1 relaxačním časem) popisuje návrat magnetizace do rovnovážného stavu vlivem výměny energie s okolím, tzv. mřížkou.

Vyřešením Blochových rovnic pro vývoj magnetizace po jejím sklopení do transverzální roviny získáme tvar signálu tzv. volné precese:

$$s(t) = n \cdot e^{-\frac{t}{T_2}} \cdot e^{i(\omega t + \varphi)} \cdot e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (2)$$

kde je t čas od sklopení magnetizace, T_2 spin-spinový relaxační čas, T_1 spin-mřížkový relaxační čas, n relativní četnost, φ fáze signálu a ω Larmorova frekvence.

Detekovaný signál má obvykle několik komponent, každé komponentě odpovídá pozice konkrétního jádra izotopu v určité chemické sloučenině (jedné sloučenině může tudíž odpovídat i více komponent). Přesnou Larmorovu (úhlovou) frekvenci určuje konstanta chemického posunu σ vztahující se ke konkrétnímu signálu v molekule:

$$\omega = \gamma (1 - \sigma) B_0 \quad (3)$$

Velikost σ je závislá na chemickém okolí kolem jádra atomu, který tento signál poskytuje.

V MR zobrazování se předpokládá, že hlavní část signálu pochází od molekul vody a že ostatní signály jsou zanedbatelné, nebo se speciálně potlačují. Za těchto podmínek lze souřadnice polohy kódovat do fáze (tzv. fázové kódování) a frekvence (tzv. frekvenční kódování) signálu. U MRS nelze použít frekvenční kódování, neboť Larmorova frekvence poskytuje identifikaci chemické látky, od které pochází daná část přijímaného signálu. Lokalizaci signálu lze ve spektroskopii provést buď postupným kódováním do fáze ve dvou (tzv. 2D spektroskopické zobrazování, 2D CSI) či třech na sebe kolmých směrech (3D CSI) (Skoch A. et al., 2008), nebo vhodným užitím gradientů a MR pulzů (sekvence tzv. single voxel spectroscopy) (Klose U., 2008).

Tvar signálu vyjádřený rovnicí (2) je závislý na čase. Pro získání standardního MR spektra, kde jednotlivé signály mají tvar absorpčních píků, je třeba provést Fourierovu transformaci (FT, viz vztah (4) a Obr. č. 1) a fázové korekce prvního a nultého řádu (de Graaf R. A., 2007).

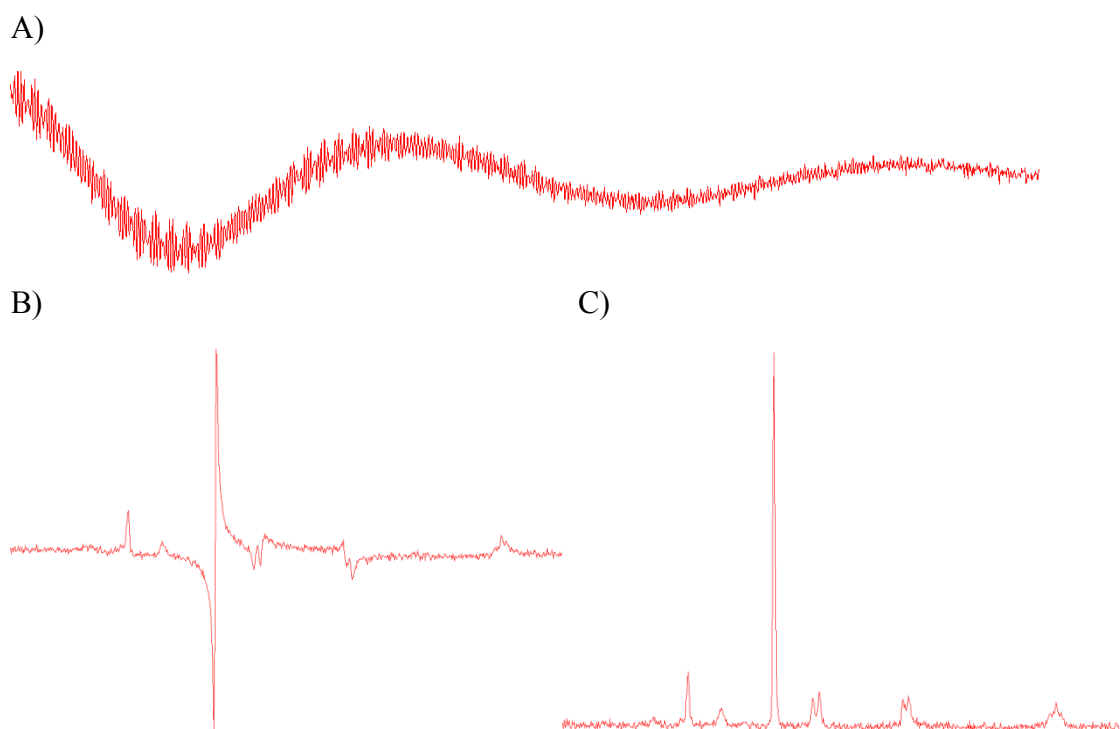
$$s(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) \exp(-i \omega t) dt \quad (4)$$

V čistě absorpčním spektru je pak integrální velikost jednotlivých signálů úměrná zastoupení metabolitu ve tkáni. Signály jsou na ose x vyneseny buď vůči frekvenci, nebo chemickému posunu. Vzhledem k tomu, že Larmorova frekvence každé

chemické látky závisí na vnějším magnetickém poli, je výhodnější používat bezrozměrný chemický posun, který vystihuje pozici jednotlivých signálů vůči zvolenému standardu bez vlivu velikosti magnetického pole:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{standard}}{\omega_{standard}} 10^6 = \frac{\sigma - \sigma_{standard}}{1 - \sigma_{standard}} 10^6 \quad (5)$$

kde $\omega_{standard}$ je Larmorova frekvence a $\sigma_{standard}$ chemický posun zvoleného standardu, nejčastěji tetramethylsilanu (TMS) či vody v ^1H MRS a fosfokreatinu (PCr) v ^{31}P MRS.



Obr. č. 1. ^{31}P MR signál.

A) Signál v časové doméně a fosforové MR spektrum po FT ve frekvenční doméně před B) a po C) fázových korekcích nultého a prvního řádu.

3.2 ^{31}P MRS

3.2.1 Charakteristika ^{31}P MRS

^{31}P MRS umožňuje detekovat látky, které mají ve své struktuře izotop ^{31}P . Tento izotop má nenulový jaderný spin $\frac{1}{2}$ a 100% zastoupení, tudíž při vhodné excitaci a detekci na jeho příslušné Larmorově frekvenci (na 3 T cca 52 MHz) lze získat signál fosforových metabolitů obsažených v lidské tkáni.

Ve srovnání s dnes převládající *in vivo* ^1H MRS má ^{31}P MRS několik významných odlišností. Její provádění usnadňuje zejména fakt, že v lidském těle není žádná dominantní fosforová sloučenina, která by překrývala ostatní signály. Naproti tomu nevýhodou ^{31}P MRS je velikost gyromagnetického poměru fosforu, která činí pouze 41 % vodíkového, čímž celková receptivita měření dosahuje ani ne 7 % ^1H MRS (receptivita izotopu je úměrná 3. mocnině gyromagnetického poměru (Brown R. W. et al., 2014)).

Receptivitu měření a rozlišení jednotlivých signálů lze zlepšit použitím několika technik. Jednak lze využít nukleární Overhauserův efekt (Lagemaat M. W. et al., 2015), nebo selektivní přenos polarizace (Weber-Fahr W. et al., 2003) a pak i heteronukleární decoupling (na ^1H), který navyšuje signál a zlepšuje rozlišení některých signálů (zejména fosfodiesterů a fosfomonoesterů v játrech (Sevastianova K. et al., 2010)). Výše uvedené techniky mají však několik nevýhod. První nevýhodou je zvýšení tzv. SAR (měrný absorbovaný výkon), který je pro humánní aplikace přísně limitován. Druhá nevýhoda spočívá v nestejném navýšení intenzit, respektive změně poměrů mezi signály jednotlivých metabolitů.

Avšak nejvíce omezující podmínkou pro měření ^{31}P MRS je hardwarové vybavení. Jedná se o speciální excitační a detekční cívku, jež je naladěná na frekvenci fosforu. Existují objemové a povrchové fosforové MR cívky. Objemové cívky se používají pro měření např. mozkové tkáně. V případě ^{31}P MRS jsou běžnější povrchové cívky, protože se dostávají blíže k vyšetřované oblasti těla. Druhým potřebným technickým vybavením je multinukleární přijímací/vysílací kanál MR tomografu (speciální detekční kanál pro izotopy, které rezonují na odlišné frekvenci než je vodíková).

Největší uplatnění v medicíně a v klinickém výzkumu nachází ^{31}P MRS při sledování oxidativního i anaerobního energetického metabolismu a membránového poškození a proliferace buněk (Argov Z. et al., 2000; Maintz D. et al., 2002; Mattei J. P.

et al., 2004; Valkovič L. et al., 2017). Spektrum metabolitů, které lze detekovat, se odvíjí od vyšetřovaného orgánu. V případě vyšetření svalové tkáně jsou experimentální možnosti největší. Je možné se setkat s třemi různými variantami vyšetření, které se mohou kombinovat. Nejjednodušší metodou je měření klidového zastoupení fosforových sloučenin. Tato metoda je nedílnou součástí každého vyšetřovacího protokolu svalu, kdy se používá ^{31}P MRS. Druhou, více pokročilejší technikou, je zátěžová (dynamická) ^{31}P MRS. Ta obnáší vyšetření konkrétního svalu během a po fyzické zátěži. Toto vyšetření je náročné právě ve sladění měření ^{31}P MR spekter s danou fyzickou zátěží. Další experimentální problémy jsou spojeny s vhodnou konstrukcí ergometru a s volbou velikostí zátěže, nastavením vyšetřovacího protokolu a MRS sekvence, zpracováním dat a správnou interpretací výsledků. Dizertační práce je věnována zejména použití této metody. Třetí, zatím nejméně používanou a rozšířenou metodou, je ^{31}P MR saturační transfer.

Samostatnou kapitolou ^{31}P MRS je vyšetření srdečního svalu, které je pokládáno za nejvíce obtížné z důvodu pohybových artefaktů z dýchání a samotné srdeční akce, relativně malého objemu srdeční svaloviny a uložení srdce v nitru hrudní dutiny (Rodgers C. T. et al., 2014).

3.2.2 Fosforové metabolity ve tkáni

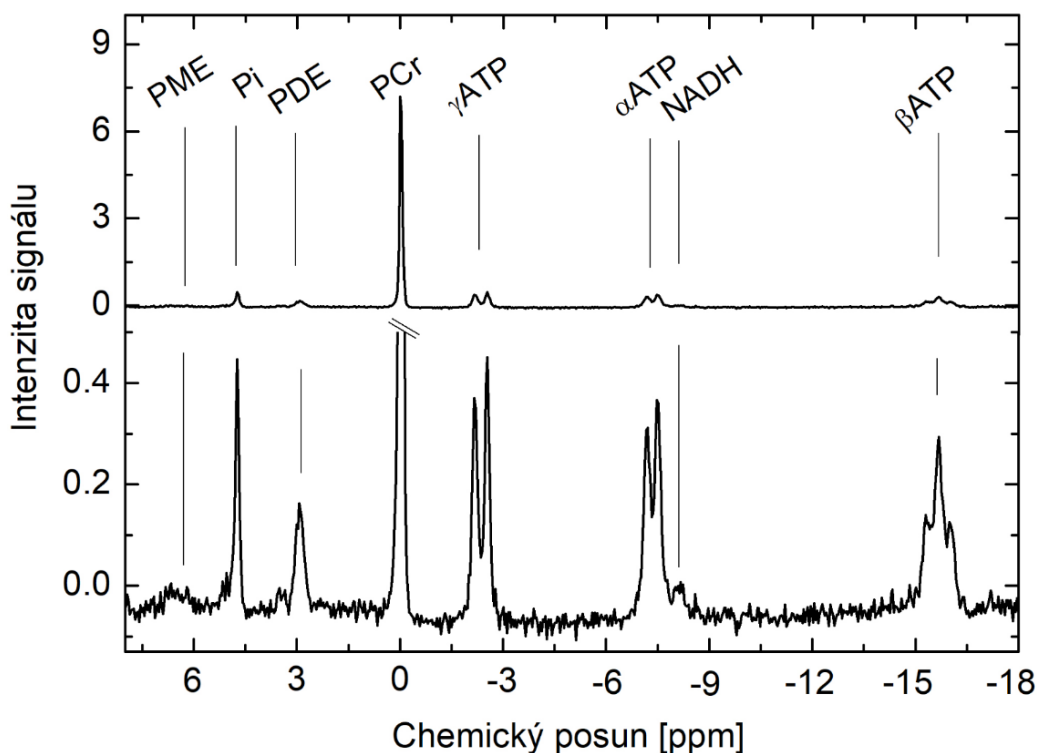
Ve ^{31}P MR spektru získaném *in vivo* ze svalové tkáně jsou zastoupeny signály fosfokreatinu (PCr), adenosintrifosfátu (ATP: 3 multipletní signály – α (dublet), β (dublet), γ (triplet) – od každého atomu fosforu v této molekule), anorganického fosfátu (Pi), fosfodiesterů (PDE: glycerolfosfoetanolamin (GPE) a zejména glycerolfosfocholin (GPC)) a dalších méně majoritních sloučenin jako jsou fosfomonoestery (PME: fosfocholin (PC) a fosfoetanolamin (PE)) a nikotinamidadenin dinukleotid (NADH), viz Tab. č. 1. a Obr. č. 2. Z Tab. č. 1 je patrné, že fosforové metabolity leží v rozsahu 25 ppm (za referenční signál s nulovým chemickým posunem je obvykle volen PCr) a mají relativně krátké T_2 a dlouhé T_1 relaxační časy. Při 3 T je větší rozsah chemických posunů spíše výhodou, protože jednotlivé signály se nepřekrývají, což usnadňuje kvantitativní vyhodnocení jednotlivých signálů. Rozsah 25 ppm je velký (ve srovnání s ^1H) a při vyšších magnetických polích (7 T a více) je problém dosáhnout patřičný frekvenční rozsah excitačních pulzů při splnění SAR limitu a povoleného napětí vysílače.

Dlouhé T_1 relaxační časy prodlužují dobu potřebnou pro obnovu podélné magnetizace a T_2 relaxační časy kladou naopak nároky na krátkou vývojovou periodu magnetizace v transverzální rovině v lokalizačních sekvencích. Nepřítomnost nepoměrně velkých nebo širokých signálů se projevuje tím, že základní čára (baseline) fosforového MR spektra je obvykle rovná, což opět zjednodušuje měření (není potřeba saturačních pulzů) a vyhodnocení jednotlivých signálů v porovnání s ^1H MRS.

Uvedené chemické posuny v Tab. č. 1 nejsou zcela striktní, protože polohu některých signálů ovlivňují další parametry. Signál P_i je závislý na pH a zpětně lze z jeho pozice vůči PCr dopočítat pH svalu pomocí Henderson-Hasselbachovy rovnice (Moon R. B. & Richards J. H., 1973):

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

$$\text{pH} = 6,75 + \log \left(\frac{\delta - 3,27}{5,63 - \delta} \right) \quad (7)$$



Obr. č. 2. ^{31}P MR spektrum *in vivo* z lýtkového svalu s označenými jednotlivými signály.

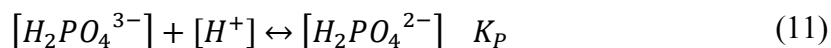
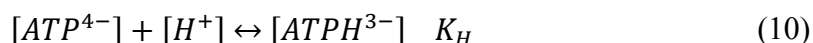
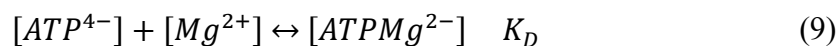
Tab. č. 1. Chemické posuny, event. relaxační časy, hlavních MR viditelných fosforových metabolitů (de Graaf R. A., 2007; van der Kemp W. J. M. et al., 2016; Merchant T. E. & Glonek T., 1990).

fosforová sloučenina	δ
α ATP	-7,52 (3,4*; 47**)
β ATP	-16,26 (3,9*; 55**)
γ ATP	-2,48 (5,5*; 62**)
PCr	0,00 (6,7*; 350**)
Pi	5,02 (6,9*; 153**)
α ADP	-7,05
β ADP	-3,09
AMP	-6,33
nikotinamidadenindinukleotid (NADH)	-8,3
2,3 difosfoglycerát	6,6; 5,5
glukóza-6-fosfát	7,20
glukóza-1-fosfát	5,15
glycerol-1-fosfát	7,02
fruktóza-6-fosfát	6,64
fosfoetanolamin (PME)	6,78 (8,1*)
fosfocholin (PME)	5,88 (8,1*)
glycerolfosfocholin (PDE)	2,80 (8,6*; 414**)
1,2 dihexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfocholin	2,18
glycerolfosfoetanolamin (PDE)	3,30 (8,6*; 414**)
1,2 dihexadecanoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamin	2,80
fosfoenolpyruvát	2,06

Chemické posuny jsou vztaženy k signálu fosfokreatinu; vodné roztoky, pH 7. Relaxační časy nejdůležitějších metabolitů při 3 T jsou uvedeny v závorkách (Rodgers C. T. et al., 2014); *T₁ [s]; **T₂ [ms]. V publikované literatuře je u jednotlivých osob uváděna značná variabilita (Meyerspeer M. et al., 2003).

Pozice jednotlivých signálů ATP naopak ovlivňuje i koncentrace hořčnatých kationtů, proto lze např. z posunu α ATP a β ATP dopočítat koncentraci těchto iontů (Bock J. L. et al., 1985; Hájek M. et al., 2002):

$$[Mg^{+}_{volný}] = \frac{K_D \left\{ (\Delta\delta_{\alpha\beta obs} - \Delta\delta_{\alpha\beta ATP}) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_H} \right) + \frac{[H^+]}{K_H} (\delta_{ATP^4-} - \Delta\delta_{\alpha\beta ATP H^3-}) \right\}}{(\Delta\delta_{ATP Mg^2-} - \Delta\delta_{\alpha\beta obs})} \quad (8)$$



kde $K_{D,H,P}$ jsou disociační konstanty definované příslušnými chemickými rovnicemi ((9) až (11)), $\Delta\delta_{\alpha\beta\text{obs}}$ jsou naměřené *in vivo* rozdíly mezi signály α ATP a β ATP. Ostatní chemické posuny odpovídají maximálním hodnotám obdržným při titracích *in vitro*.

Metabolit adenosintrifosfát představuje hlavní energetický zdroj organismu. Sval ho spotřebovává v každé chvíli a ve zvýšené míře při svalové kontrakci. Jeho koncentrace se ale udržuje téměř konstantní jak v klidu, tak při zátěži v důsledku několika mechanismů (kreatin–kinázová reakce, adenylátová reakce, oxidativní a anaerobní glykolýza), které rychle dorovnávají jeho pokles (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994).

Dalším zmíněným význačným metabolitem je fosfokreatin. Ten slouží jako okamžitá energetická zásoba, kterou sval používá na resyntézu ATP (přes kreatin–kinázovou reakci). K jeho značnému poklesu dochází zejména na začátku fyzické námahy, než se ATP začne hradit jinými pozvolněji se rozbíhajícími mechanismy.

Anorganický fosfát je produkt rozpadu ATP v buňce a jeho klidový poměr vůči PCr je nejčastěji brán jako hlavní ukazatel svalového metabolismu (Argov Z. et al., 2000). Při zátěži má jeho růst signalizační a pufrovací funkci.

U fosfodiesterů se uvádí, že jsou to metabolity pocházející z degradace buněčných membrán, takže vyšší signál je spojován s poškozením buněk (Younkin D. P. et al., 1987). Řada vědeckých prací nachází vyšší signál PDE u osob starších (Szendroedi J. et al., 2011), s vyšším BMI (Valkovič L. et al., 2016) i paradoxně s vyšší sportovní aktivitou (Hug F. et al., 2006), takže interpretace tohoto signálu není jednoduchá.

Fosfomonoestery jsou metabolity vznikající jako glykolytické meziprodukty a buňky je mohou využívat na tvorbu buněčných membrán (Argov Z. et al., 2000). Za fyziologického stavu je signál PME ve svalů na úrovni šumu, ale v jiných tkáních (např. v játrech) je jejich signál, respektive zastoupení, větší (Dezortova M. et al., 2005).

Vyhodnocení fosforových spekter lze provádět jednak absolutně vůči externímu nebo internímu standardu nebo udáváním pouhých poměrů mezi jednotlivými signály. Absolutní hodnocení signálu vůči externímu standardu je komplikované z důvodu

častého používání povrchových cívek (nutno pak zvážit ještě vzdálenost měřeného objemu od cívky a detekční, resp. excitační profil cívky), anebo je téměř nemožné v případě použití nelokalizované MRS, a proto i většina dostupných studií pracuje s relativními poměry či používá pseudo-absolutní kvantifikaci, kde koncentrace jednotlivých signálů jsou přepočítány na koncentrace pomocí poměru k β ATP a zjištěné referenční koncentrace 8,2 mM/l ATP ve svalu zdravých osob (Kemp G. J. et al., 2007; Taylor D. J. et al., 1986). Podrobnější popis absolutní kvantifikace lze najít v (Šedivý P., 2013; Tosner Z. et al., 2001).

3.2.3 Lokalizační techniky ^{31}P MRS

Lokalizační techniky umožňují definovat oblast, z které bude pocházet měřený signál. Některé sekvence (např. CSI) vymezenou oblast rozdělují ještě na menší objemy, z kterých je pak samostatně dostupné ^{31}P MR spektrum. Použitím lokalizované MRS se vyšetření stává více specifické pro konkrétní sval. Na druhou stranu použitím lokalizace dochází k poklesu poměru signálu vůči šumu (SNR) a vyšetření je více citlivé na pohybové artefakty.

MR sekvence, které se používají pro měření ^{31}P MR spekter, jsou principiálně podobné sekvencím používaným pro ^1H MRS, ale musí se přizpůsobit popsáním vlastnostem ^{31}P metabolitů (dlouhé T_1 , krátké T_2 relaxační časy, J-coupling, velký rozsah ppm, nízká citlivost).

3.2.3.1 DRESS - Depth Resolved Surface Coil Spectroscopy

DRESS (Bottomley P. A., 1987; Valkovič L. et al., 2014) je MR sekvence, která provádí 1D lokalizaci definováním jedné vrstvy, z které pochází většina přijímaného signálu. Vrstva je vybrána pomocí současného zapnutí gradientu magnetického pole a radiofrekvenčního 90° pulzu, který sklopí spiny, respektive magnetizaci, pouze ve vrstvě, kde je splněna rezonanční podmínka. Tato sekvence se nejlépe kombinuje s povrchovými cívkami, protože jejich současným použitím se zlepšuje lokalizace (dochází k průniku detekčního objemu cívky a definovaného měřícího objemu). DRESS sekvence není příliš citlivá na pohybové artefakty a poskytuje dostatek signálu i pro lokalizovanou zátěžovou ^{31}P MRS při 3 T.

3.2.3.2 ISIS – Image Selected In vivo Spectroscopy

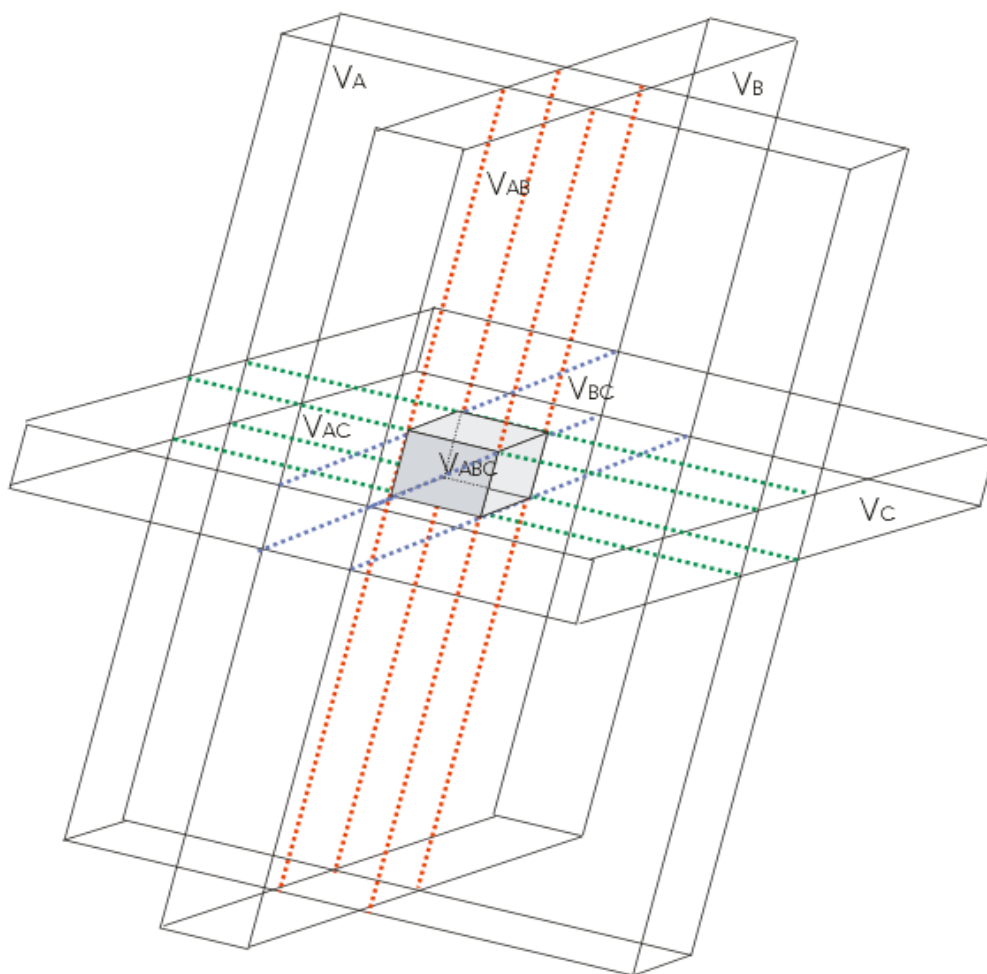
ISIS (Bogner W. et al., 2011; Ljungberg M. et al., 2002) je sekvence, při které se obdrží výsledná fosforová spektra z požadovaného objemu až po provedení sledu několika samostatných, na sebe navazujících akvizic. Sekvence ISIS má varianty pro vytyčení objemu v 1D, 2D i 3D prostoru. V případě 3D ISIS musí být sekvence složena nejméně z 8 akvizic, ale objevují se i složitější varianty sekvence ISIS, které jsou složeny až z kombinací 32 akvizic, tzv. e-ISIS (Ljungberg M. et al., 2000).

První akvizice ISIS představuje obyčejný neselektivní $\pi/2$ pulz bez použití přídavného gradientu, výsledný signál je klasický FID z celého detekčního objemu. V dalších akvizicích se již invertují spiny v konkrétních vrstvách pomocí selektivních π pulzů v přítomnosti jednotlivých na sebe kolmých gradientů magnetického pole. V případě 1D ISIS se používá pouze jeden π pulz s jedním gradientem, u 2D ISIS se musí po sobě použít dva π pulzy s dvěma gradienty a v případě 3D ISIS dokonce tři π pulzy s třemi různými gradienty. Po π pulzech s gradienty následuje vždy neselektivní $\pi/2$ pulz a detekce signálu. Po $\pi/2$ pulzu je všechna magnetizace jednotlivých vrstev v rovině kolmé na statické magnetické pole, avšak část z ní je orientována antiparalelně vůči zbytku.

Označením vzájemně se protínajících rovin a jejich průniku písmeny A, B, C, resp. AB, BC, AC, ABC, lze efektivně popsat průběh 3D ISIS a názorně ukázat získání požadovaného objemu vhodným odečtením a sečtením jednotlivých signálů (označení rovin, respektive jednotlivých objemů V, je naznačeno na Obr. č. 3).

Schéma zapínání gradientů a jejich vlivu na výsledný signál je vyneseno v Tab. č. 2. Po provedení celé série osmi měření se signál z jednotlivých měření sečte podle rovnice (12). Operací se získá požadovaný signál pouze z krychličky V_{ABC} (de Graaf R. A., 2007).

Sekvence ISIS je velice citlivá na pohybové artefakty. Určení výsledného objemu voxelu je založeno na předpokladu, že během celého měření nedojde k pohybu měřené oblasti. Její výhodou však je, že neobsahuje žádná spinová echa, takže je vhodná pro měření metabolitů s krátkým T_2 relaxačním časem.



Obr. č. 3. Vytnutí objemu sekvencí ISIS.

Tab. č. 2. Schéma zapínání gradientů magnetického pole Gx, Gy, Gz sekvence ISIS (0 – vypnutý gradient, 1 – zapnutý gradient).

Č. měř.	Gx	Gy	Gz	Příspěvky jednotlivých vrstev
1	0	0	0	$S_1 = V_{mimo} + V_A + V_B + V_C + V_{AB} + V_{BC} + V_{AC} + V_{ABC}$
2	1	0	0	$S_2 = V_{mimo} - V_A + V_B + V_C - V_{AB} + V_{BC} - V_{AC} - V_{ABC}$
3	0	1	0	$S_3 = V_{mimo} + V_A - V_B + V_C - V_{AB} - V_{BC} + V_{AC} - V_{ABC}$
4	0	0	1	$S_4 = V_{mimo} + V_A + V_B - V_C + V_{AB} - V_{BC} - V_{AC} - V_{ABC}$
5	1	1	0	$S_5 = V_{mimo} - V_A - V_B + V_C + V_{AB} - V_{BC} - V_{AC} + V_{ABC}$
6	1	0	1	$S_6 = V_{mimo} - V_A + V_B - V_C - V_{AB} - V_{BC} + V_{AC} + V_{ABC}$
7	0	1	1	$S_7 = V_{mimo} + V_A - V_B - V_C - V_{AB} + V_{BC} - V_{AC} + V_{ABC}$
8	1	1	1	$S_8 = V_{mimo} - V_A - V_B - V_C + V_{AB} + V_{BC} + V_{AC} - V_{ABC}$

$$8V_{ABC} = S_1 - S_2 - S_3 - S_4 + S_5 + S_6 + S_7 - S_8 \quad (12)$$

3.2.3.3 CSI – spektroskopické zobrazování

Spektroskopické zobrazování (de Graaf R. A., 2007; Skoch A. et al., 2008) je sekvence, která je hojně využívána i pro ^1H MRS, protože umožňuje získat prostorovou charakterizaci metabolického složení tkáně. Princip sekvence spektroskopického zobrazování je založen na aplikaci fázových gradientů, které během jednotlivých ech kódují do precese spinů informaci o souřadnici signálu. Kódování polohy signálu je u spektroskopického zobrazování podobné klasickému MR zobrazování s tím rozdílem, že nelze použít frekvenční kódování pro žádný směr, jelikož frekvence nese chemickou informaci identifikující metabolit. Sekvence má variantu 2D (2 fázové směry kódování) a 3D (3 fázové směry kódování), ve které se obdrží dvoj-, respektive troj-dimenzionální matice spekter. Zjednodušené schéma 2D CSI sekvence je zobrazeno na Obr. č. 4.

Na začátku sekvence 2D CSI je klasicky pomocí gradientu magnetického pole vybrána vrstva, ve které se sklopí magnetizace (podobně jako v DRESS sekvenci). Poté následuje použití $N \times M$ ekvidistantně se měnících gradientů magnetického pole. V jednom náběru dat se použije pouze jedna jediná kombinace gradientů, z čehož plyne časová náročnost sekvence 2D a zejména 3D.

Gradientsy se zapínají podél x -ové a y -ové osy (zde pro popsání arbitrárně zvoleny x a y). Tím se vnáší závislost fázového posunu signálu na souřadnici x a y :

$$\varphi_x(t) = \omega(x)\tau = -\gamma G_x x \tau \quad (13)$$

$$\varphi_y(t) = \omega(y)\tau = -\gamma G_y y \tau \quad (14)$$

Ve vztazích (13) a (14) je τ časová délka působícího gradientu, x a y je pozice jader podél x -ové a y -ové osy s uvážením středu gradientu G v $x = 0$ a $y = 0$. Po zavedení tzv. k -prostoru rovnicemi (15) a (16) (de Graaf R. A., 2007):

$$k_l = \omega(x)\tau = \frac{\gamma}{2\pi} G_{xn} \tau = \frac{\gamma}{2\pi} \Delta G_x n \tau = -\frac{N}{2} \text{ až } \frac{N}{2} - 1 \quad (15)$$

$$k_m = \omega(y)\tau = \frac{\gamma}{2\pi} G_{ym} \tau = \frac{\gamma}{2\pi} \Delta G_y m \tau = -\frac{M}{2} \text{ až } \frac{M}{2} - 1 \quad (16)$$

lze fázový posun $\varphi_{nm}(x, y)$ odpovídající l, m -tému kroku fázového kódování zapsat jako:

$$\varphi_{nm}(x, y) = -(2\pi k_n x + 2\pi k_m y) \quad (17)$$

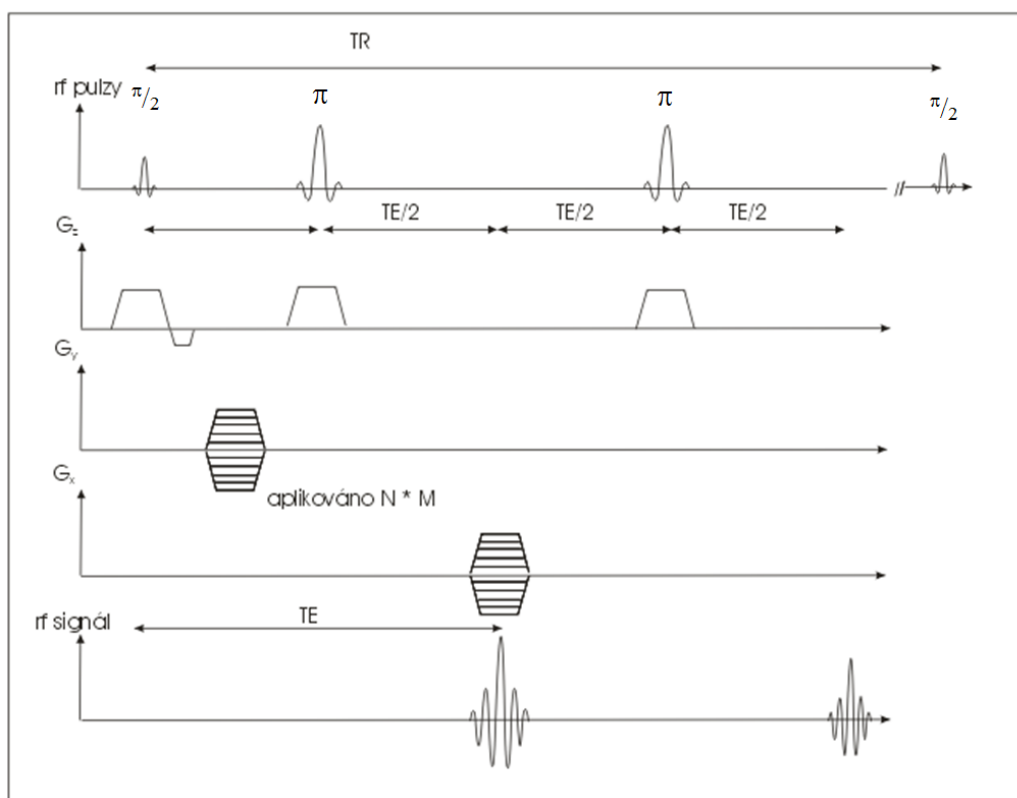
Po fázovém kódování následuje π pulz a za dvojnásobný čas dochází k tvorbě spinového echa. Detekuje se signál, který je funkcí velikostí použitých gradientů, resp. k_x, k_y :

$$\text{signál}(t, k_{nm}) = \iint_{\text{vrstva}} s(t, x) e^{-i(2\pi k_x x + 2\pi k_y y)} dx dy \quad (18)$$

Signál závislý na prostorových souřadnicích se získá provedením zpětné diskrétní Fourierovy transformace:

$$\text{signál}(t, \Delta x n', \Delta y m') = \frac{1}{N} \frac{1}{M} \sum_{n,m} S(t, k_{nm}) e^{i(2\pi k_x \Delta x n' + 2\pi k_y \Delta y m')} \quad (19)$$

Rozlišení velikosti voxelu je nepřímě úměrné počtu fázových gradientů. Výhoda spektroskopického zobrazování je, že mřížka jednotlivých voxelů není pevná, ale lze ji pouze matematickou operací posouvat. Na druhou stranu CSI má i své nevýhody. Mimo zmíněnou časovou náročnost spočívá problém metody v tom, že každý jednotlivý voxel obsahuje malý příspěvek signálu všech ostatních voxelů. Míchání signálů je dáno funkcí bodové odezvy (point spread function) a zmenšuje se se zvyšováním počtu kroků fázových gradientů. Nežádoucí příspěvky signálů z ostatních voxelů mohou být významné, pokud VOI zasahuje oblast s velmi silným nežádoucím signálem, proto součástí sekvence CSI jsou často saturační pulzy, např. pro potlačení okolních tuků (Skoch A. et al., 2008).



Obr. č. 4. Zjednodušené schéma sekvence 2D CSI (TR – repetiční čas, TE – echo čas, rf signál – radiofrekvenční signál)

3.2.3.4 Další víceobjemové a vícejaderné sekvence

V posledních letech se objevily návrhy víceobjemových (multivoxel) sekvencí, které dokážou být dostatečně rychlé, aby na 7 T i 3 T zvládly zátěžové ^{31}P MRS vyšetření s přijatelným časovým rozlišením. Zástupcem těchto sekvencí je dvouvrstvá selektivní sekvence publikovaná Niessem (Niess F. et al., 2017). Sekvence využívá lokalizační schéma SEMI-LASER (de Graaf R. A., 2007; Slotboom J. & Bovée W. M. M. J., 1995) a dovoluje pomocí sensitivity encoding (Boer V. O. et al., 2015) měření dvou na sobě nezávislých vrstev s časovým rozlišením 6 s při 7 T. Druhým zástupcem víceobjemové MRS je sekvence vyvinutá Parasoglouem na bázi turbo-spinového echa (Parasoglou P. et al., 2012), která poskytuje výborné prostorové rozlišení, ale pouze pro jeden zvolený metabolit. Pro zátěžovou ^{31}P MRS spektroskopii lze použít i 2D CSI, pokud se zredukuje počet fázových kroků a použije se nekarteziánské vzorkování k -prostoru, jak ukázal Valkovič (Valkovič L. et al., 2016). Druhý směr, kterým se vývoj ubírá, jsou sekvence, které umožňují současné měření různých jader. Současné měření ^1H a ^{31}P je výhodné z důvodu obdržení dvou sad různých dat během jediného

zátěžového protokolu. Takový postup může více než o polovinu zkrátit čas vyšetření, protože se odstraní i čas, kdy se musí čekat, než se sval dostane do opětovné rovnováhy. Kombinace ^1H a ^{31}P lze využít pro ^1H MR spektroskopii (Meyerspeer M. et al., 2005) i pro ^1H MRI (Schmid A. I. et al., 2014).

3.2.4 Parametry zátěžové ^{31}P MRS

Po zahájení fyzické činnosti se sval vychyluje z metabolické rovnováhy v důsledku vyšší, nebazální spotřeby ATP. Porušení metabolické rovnováhy umožňuje studovat další metabolické parametry, které mohou být více citlivé na patologický proces než klidová ^{31}P MRS data (Mattei J. P. et al., 2004), nebo přinášejí lepší pochopení fyziologických procesů spojených s energetickým metabolismem ve svalové tkáni.

Část určovaných parametrů se váže na vývoj metabolismu po zátěži (teoretický výpočet maximální oxidativní kapacity svalu, tzv. mitochondriální kapacity (Q_{max}), rychlost obnovy klidových koncentrací PCr, Pi, ADP atd.), další parametry se týkají přímo probíhající zátěže (oxidativní, anaerobní a kreatin-kinázový příspěvek k tvorbě ATP, celková ekonomika svalové kontrakce, změna pH během zátěže atd.).

V každém okamžiku lze popsat energetické změny ve svaly následujícím vztahem (Kemp G. J. et al., 2015):

$$\Delta ATP = ATP_{\text{kreatin-kinázová reakce}} + ATP_{\text{oxidativní fosforylace}} + \quad (20)$$

$$ATP_{\text{anaerobní glykolýza}} - ATP_{\text{bazální spotřeba}}$$

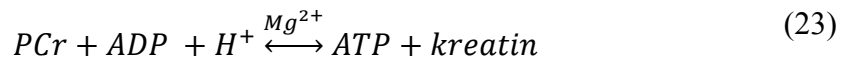
Při zátěži se nejvýrazněji mění intenzita PCr a Pi (viz Obr. č. 5). Naproti tomu intenzita (respektive koncentrace) ATP zůstává téměř konstantní v důsledku velmi rychle probíhající kreatin-kinázové reakce (Kemp G. J. et al., 1998), a proto se ΔATP v rovnici (20) zpravidla vynechává a sleduje se zejména změna PCr. Ve vztahu (20) není také zahrnut vznik ATP adenylát-kinázovou reakcí (21), která přispívá pouze málo k produkci ATP, ale její produkt adenosinmonofosfát (AMP) má signální charakter, který stimuluje produkci ATP mitochondriemi (Doliba N. M. et al., 2015).



PCr je nejdůležitější metabolit pro vyhodnocení zátěžové ^{31}P MRS, protože jeho návrat na klidové hodnoty po zátěži odráží schopnost svalu oxidativně syntetizovat ATP a míra jeho poklesu při zátěži vypovídá o energetické rezervě umožňující danou zátěž zvládnout. Navíc signál PCr má největší intenzitu a nepodléhá při zátěži štěpení v důsledku různého pH, jako je tomu u anorganického fosfátu, takže je zároveň nejvěrohodněji vyhodnotitelným metabolitem. Po celou dobu vyšetření lze monitorovat jeho okamžitou změnu podle vztahu (22),

$$V_{PCr}(t) = ATP_{flux\ PCr} = \frac{\Delta PCr}{\Delta t} \quad (22)$$

která udává výsledný metabolický tok ATP v kreatin-kinázové reakci:

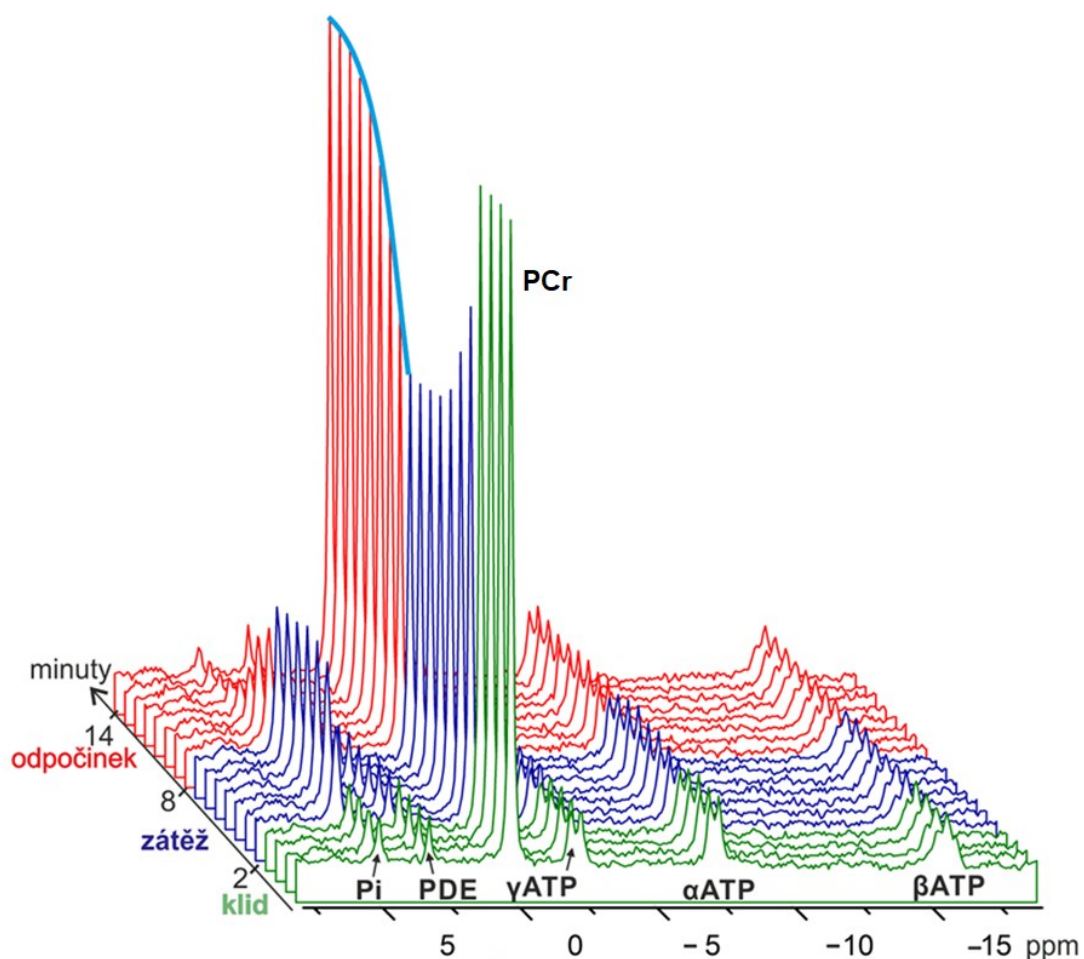


Nejpřínosnější je hodnota parametru $V_{PCr}(t)$ na začátku zátěže. Počáteční rychlost poklesu PCr na začátku zátěže odpovídá spotřebě ATP, kterou sval využívá na svalovou kontrakci (anaerobní glykolýza se ještě nestačila aktivovat a oxidativní fosforylace pokrývá pouze bazální spotřebu ATP (Layec G. et al., 2010)). Při znalosti okamžitého počátečního výkonu $ATP_{flux\ PCr}$, který je normalizován na plochu svalu (P_0), lze vypočítat jednotkovou účinnost svalové kontrakce (24)

$$E_{účin} = \frac{ATP_{flux\ PCr}}{P_0} \quad (24)$$

charakterizující množství ATP, který sval potřebuje na vykonávání svalové práce (Boska M., 1994). Parametr $E_{účin}$ však není zcela stejný pro různé velikosti zátěže v důsledku různého podílu zapojení jednotlivých typů vláken při konkrétní intenzitě zátěže (Cannon D. T. et al., 2014; Christie A. D. et al., 2014).

Pokles PCr se přibližně exponenciálně zpomaluje v závislosti na rychlosti aktivizace dalších mechanismů hradících úbytek ATP. Při určité intenzitě zátěže však nemusí nastat dynamická rovnováha mezi spotřebou a syntézou ATP a sval nakonec nebude schopen pokračovat v kontrakci v důsledku vyčerpání zásoby PCr (na svalové únavě se mimo poklesu PCr podílí vzrůst P_i , pokles pH, hromadění laktátu a další faktory (Allen D. G. et al., 2008)).



Obr. č. 5. Kumulovaný graf zátěžové ^{31}P MRS lýtkových svalů. Zeleně vybarvená spektra představují klidovou část experimentu, modrá jsou spektra při zátěži a červená po ukončení zátěže (V grafu je vykreslen jen malý výběr spekter z celého experimentu, který tvoří větší set spekter).

3.2.4.1 $ATP_{flux\ ox}$ a $ATP_{flux\ gl}$ během zátěže

Během zátěže lze dopočítat i okamžitou tvorbu ATP oxidativní fosforylací $ATP_{flux\ ox}$ a anaerobní glykolýzou $ATP_{flux\ gl}$. Výpočet $ATP_{flux\ ox}$ lze provést dvěma rozdílnými způsoby (Layec G. et al., 2010). První možnost je určit ho z rovnováhy spotřeby a tvorby ATP během zátěže:

$$ATP_{flux\ ox}(t) = E_{\text{účin}} \cdot P(t) - ATP_{flux\ gl}(t) - ATP_{flux\ PCr}(t) \quad (25)$$

Tento způsob výpočtu předpokládá znalost příspěvku ATP produkovaného v anaerobní glykolýze $ATP_{flux\ gl}$ a konstantní účinnost svalové kontrakce přes celé vyšetření. Druhá varianta výpočtu vychází ze znalosti maximální oxidativní kapacity svalu, která se vypočítá z regenerační fáze vyšetření. Pro výpočet existuje opět několik variant v závislosti na vzorcích pro výpočet celkové oxidativní kapacity svalu.

Dva nejčastěji užívané vztahy jsou (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994; Lanza I. R. et al., 2005):

$$ATP_{flux\ ox}(t) = Q_{max-ADP} / \left(1 + \frac{K_{Menten}}{[ADP(t)]} \right) \quad (26)$$

kde $K_{Menten} = 30$ μ mol odpovídá hodnotě koncentrace $[ADP]$, která vyvolá $ATP_{flux\ gl} = \frac{Q_{max-ADP}}{2}$

$$ATP_{flux\ ox}(t) = Q_{max-pot} / (1 + K_m) / \frac{[ADP(t)][Pi(t)]}{[ATP(t)]} \quad (27)$$

kde $K_m = 0,11$.

Vztah (26) pro výpočet $ATP_{flux\ ox}$ vychází z toho, že tvorba ATP je řízena hyperbolicky přes koncentraci ADP, vztah (27) předpokládá, že řízení je realizováno tzv. fosfátovým potenciálem $\frac{[ADP][Pi]}{[ATP]}$.

Velikost tvorby ATP v anaerobní glykolýze lze určit ze sledování změn intramyocelulárního pH. Obecně má pH svalu složitou závislost během celého zátěžového vyšetření. Na počátku zátěže pH rychle, ale mírně vzroste (přibližně z 7,03 na 7,10) v důsledku kreatin-kinázové reakce, která spotřebovává H^+ , poté pH obvykle začne rychle klesat v důsledku anaerobní glykolýzy, která produkuje H^+ . Pokles pH se postupem času zpomaluje, jak je anaerobní glykolýza nahrazena oxidativní fosforylací, která okyseluje sval pouze produkcí CO_2 (Kemp G. J. et al., 1993). Po zátěži se pH vrací ke klidové hodnotě v důsledku odplavování H^+ krevním řečištěm navzdory produkci H^+ kreatin-kinázovou reakcí, která probíhá opačným směrem než na začátku zátěže. Tvorba a spotřeba H^+ ve svaly, odstraňování H^+ krevním řečištěm i vlastní pufrční kapacita buňky tak ovlivňují její pH (Kemp G. J. et al., 1993).

Při anaerobní glykolýze připadá na jeden mol ATP $2/3$ molu H^+ . V kreatin-kinázové reakci (ve spřažení s hydrolýzou ATP, která naopak produkuje H^+ ; tzv. Lochmanova reakce (Kemp G. J. et al., 2001)) vzniká na jeden mol ATP θ molu H^+ podle rovnice (28) a v oxidativní fosforylaci připadá na jeden mol ATP κ molu H^+ podle rovnice (29).

$$\theta(t) = \frac{1}{1+10^{pH(t)-6,75}} \quad (28)$$

$$\kappa(t) = \frac{0,16}{1+10^{6,1-pH(t)}} \quad (29)$$

Příspěvek H^+ z oxidativní fosforylace je velmi malý ($\kappa \sim 0,1$) a někdy se zanedbává (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994). Celkově lze rovnici vystihující zákon zachování H^+ zapsat následovně (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994):

$$\frac{2}{3}ATP_{flux\ gl}(t) - \theta \cdot ATP_{flux\ PCr}(t) - \kappa \cdot ATP_{flux\ ox}(t) + H_{efflux}(t) \quad (30)$$

$$+ H_{pufer}(t) = 0$$

Z rovnice (30) lze po určení pufráčního členu H_{pufer} a rychlosti eliminace protonů krevním řečištěm H_{efflux} vypočítat $ATP_{flux\ ox}$. Druhá, obrácená varianta pro výpočet $ATP_{flux\ gl}$ je její vyjádření ze vztahu (25), kde $ATP_{flux\ ox}$ se určí pomocí vztahu (26) nebo (27). Pufráční člen H_{pufer} je závislý na velikosti pufráční kapacity svalu β_{total} (Layec G. et al., 2010):

$$H_{pufer}(t) = -\beta_{total}(t) \frac{dpH(t)}{dt} \quad (31)$$

Pufráční kapacita svalu je složena zejména z pufráční schopnosti fosfátu, bikarbonátů, fosfomonoesterů a dalších funkčních skupin schopných vázat a disociovat H^+ (např. imidazolové nebo histidinové skupiny atomů) (Kemp G. J. et al., 1993). Pro účely výpočtu lze pufráční konstantu β_{total} rozdělit na dvě části (viz vztah (32)). První části odpovídají fosfáty β_{Pi} , druhá část, β_a , zahrnuje ostatní složky, které se podílejí na pufrování (tyto látky nemění během zátěže výrazně svoji koncentraci, a tím zůstává příspěvek β_a konstantní) (Layec G. et al., 2010).

$$\beta_{total}(t) = \beta_{Pi}(t) + \beta_a \quad (32)$$

β_{Pi} je možno vypočítat pomocí následující rovnice (Conley K. E. et al., 1998):

$$\beta_{Pi} = 2,303 \cdot H^+(t) \cdot K \cdot P_i(t) / (K + [H^+(t)])^2 \quad (33)$$

kde $K = 1,77 \cdot 10^{-7}$ mol je disociační konstanta. β_a se získá ze vztahu (34) odečtením fosfátového příspěvku β_{Pi} z počáteční pufráční kapacity $\beta_{total}(t_0)$, jejíž přibližnou hodnotu lze odhadnout z počátečního poklesu fosfokreatinu (ΔPCr_{start}) a nárůstu pH (ΔpH_{start}) na začátku zátěže, viz vztah (35).

$$\beta_a = \beta_{total}(t_0) - \beta_{Pi}(t_0) \quad (34)$$

$$\beta_{total}(t_0) = \frac{\theta \cdot \Delta PCr_{start}}{\Delta pH_{start}} \quad (35)$$

Druhou variantou pro odhadnutí pufrací kapacity je její výpočet z regenerační periody (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994) a to za podmínky, že pH příliš nekleslo, pak lze člen H_{efflux} v (30) zanedbat. H_{efflux} uvedený v rovnici (30) je úměrný rozdílu pH mezi klidem a aktuální hodnotou pH během vyšetření:

$$H_{efflux}(t) = -\lambda \Delta pH(t) \quad (36)$$

Konstantu úměrnosti λ lze vyjádřit ze vztahu (30) pro případ regenerační periody (při výrazném poklesu pH), kdy se neuvažuje člen popisující glykolýzu, protože anaerobní glykolýza neprobíhá po skončení zátěže (nebo jen velmi málo) (Kemp G. J. et al., 2015):

$$\lambda = \frac{\beta_{total} \frac{dpH}{dt} + \theta \cdot ATP_{flux\ PCr} + \kappa \cdot ATP_{flux\ ox}}{\Delta pH_i} \quad (37)$$

3.2.4.2 Regenerační perioda a výpočet mitochondriální kapacity

Regenerační perioda je charakterizována postupným obnovením počátečních koncentrací všech metabolitů a pH. Chování PCr, Pi a ADP lze popsat exponenciálním návratem na klidové hodnoty podle rovnic (38), (39), (40) (Argov Z. et al., 1996; Kemp G. J. & Radda G. K., 1994):

$$[PCr](t) = [PCr]_{klid} + \Delta[PCr] \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{PCr}}}\right) \quad (38)$$

$$[Pi](t) = [Pi]_{klid} + \Delta[Pi] \left(e^{-\frac{t}{\tau_{Pi}}}\right) \quad (39)$$

$$[ADP](t) = [ADP]_{klid} + \Delta[ADP] \left(e^{-\frac{t}{\tau_{ADP}}}\right) \quad (40)$$

Samotná koncentrace ADP je pod měřitelným limitem, ale dopočítá se přes koncentraci metabolitů ATP, PCr a pH (respektive H^+) účastnících se kreatin-kinázové reakce:

$$ADP = \left(\frac{[celkový\ kreatin]}{[PCr(t)]} - 1\right) \cdot \frac{[ATP(t)]}{K_{CK}[H^+(t)]} \quad (41)$$

Rovnovážná konstanta kreatin-kinázové reakce je $K_{CK} = 1,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994). Celkové množství kreatinu může být vypočteno na základě předpokladu, že v klidu je ve svalu 85 % celkového množství kreatinu (PCr + Cr)

ve formě fosfokreatinu (Kemp G. J. et al., 2001), nebo z předpokladu, že celková průměrná hodnota sumy PCr + Cr je stálá a rovná se 42,5 mmol/l (Kemp G. J. et al., 2007). První ani druhý způsob výpočtu nemusí podávat zcela správnou a totožnou hodnotu celkového kreatinu. První způsob výpočtu alespoň eliminuje problémy, které vzniknou, když koncentrace PCr určená z ^{31}P MR spektra normalizací přes signál βATP je větší než 42,5 mM/l.

Experimentální hodnoty PCr, Pi a ADP se obvykle fitují uvedenými rovnicemi (38), (39) a (40). Z obdržných fitovacích parametrů je nejdůležitější tzv. recovery čas (či konstanta) τ_{X_i} , který charakterizuje rychlost návratu metabolitu X_i na klidové hodnoty, a celková změna koncentrace metabolitu $\Delta[X_i]$ během zátěže. Mimo absolutních změn $\Delta[X_i]$ v milimolech je užitečným parametrem i relativní změna $\frac{\Delta[X_i]_{cv}}{[X_i]_{klid}}$ (vzrůst, či pokles) metabolitu, pomocí které se mohou jednotlivá vyšetření mezi vyšetřovanými subjekty porovnávat a jehož hodnota není závislá na počáteční absolutní koncentraci PCr, respektive „pseudonormalizací“ pomocí poměru PCr/ βATP .

Nejčastěji se fituje závislost PCr a porovnává se velikost PCr recovery času τ_{PCr} , protože u některých onemocnění dochází k jeho velmi dramatickému prodloužení (viz oddíl výsledků 5.2.2.1). Na druhou stranu velikost τ_{PCr} je velkou měrou ovlivněna pH svalové tkáně (nízké pH inhibuje oxidativní fosforylaci jednak přímo (Jubrias S. A. et al., 2003) a jednak přes nižší hodnotu ADP (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994)).

Používaným parametrem je i hodnota $[\text{ADP}]_{cv}$ na konci zátěže a hodnota jeho recovery času τ_{ADP} , u které se uvádí, že je citlivějším ukazatelem mitochondriálních funkcí než τ_{PCr} (Arnold D. L. et al., 1985; Kemp G. J. & Radda G. K., 1994), protože svalová buňka se vyšší koncentrací ADP a jejím pomalejším návratem ke klidové hodnotě snaží více stimulovat oxidativní fosforylaci, a tím udržet dostatečně velkou produkci ATP poškozenými mitochondriemi.

τ_{Pi} je do velké míry komplementární k τ_{PCr} , ale částečně jeho hodnota odráží rychlost přesunu Pi z cytosolu do matrix mitochondrií (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994).

Pro výpočet několikrát zmíněné Q_{max} je potřebným parametrem i počáteční rychlost obnovy PCr (V_{PCr}) na začátku regenerační periody, kterou lze získat buď proložením počátečních hodnot PCr v regenerační periodě přímkou nebo derivováním rovnice (38) a dosazením $t = 0$, viz rovnice (42).

$$V_{PCr} = \frac{d [PCr](t = 0)}{dt} = \frac{\Delta[PCr]}{\tau_{PCr}} \quad (42)$$

Q_{max} charakterizuje maximální oxidativní možnosti svalu. Pro její výpočet existuje opět několik vztahů podle různých teorií regulace produkce ATP mitochondriemi. Nejjednodušší, tzv. lineární model předpokládá lineární vztah mezi V_{PCr} a velikostí poklesu PCr. Při extrapolaci k 100% poklesu PCr by pak V_{PCr} mělo odpovídat Q_{max} (Layec G. et al., 2010):

$$Q_{max-lin} = V_{PCr} \cdot \frac{[PCr]_{klid}}{\Delta[PCr]} = \frac{\Delta[PCr]}{\tau_{PCr}} \cdot \frac{[PCr]_{klid}}{\Delta[PCr]} = \frac{[PCr]_{klid}}{\tau_{PCr}} \quad (43)$$

Lineární model je považován za hrubý odhad Q_{max} . Jednak je hodně závislý na τ_{PCr} , takže se ho doporučuje používat pouze při malých změnách pH, jednak tento model vůbec nebere ohled na bazální složku tvorby ATP (Valkovič L. et al., 2017). Druhou možností je použití modelu odvozeného z Michaelise–Mentenové kinetiky prvního řádu, kde produkci ATP řídí koncentrace ADP (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994):

$$Q_{max-ADP} = V_{PCr} \left(1 + \frac{K_{Menten}}{ADP_{cv}} \right) \quad (44)$$

kde ADP_{cv} je hodnota ADP na konci zátěže, kterou lze vypočítat pomocí vztahu (41).

Tento model je nejpoužívanější, ale zcela správný úplně není, protože vede k nerealistickým hodnotám bazální tvorby ATP. Vylepšený model se dostane upravením vztahu (44) na vztah (45) (Jeneson J. A. et al., 1996), lépe zpětně popisuje $ATP_{flux\ ox}$ při nízké koncentraci ADP (při bazálním stavu) a je pojmenovaný jako „model druhého řádu“ podle Hillova exponentu $n_H \approx 2$ ($ATP_{flux\ ox}$ je stále určován koncentrací ADP, ale křivka produkce ATP v závislosti na ADP má sigmoidální tvar).

$$Q_{max-sec} = (ATP_{flux\ ox-bazální} + V_{PCr}) \left(1 + \left(\frac{K_{Menten}}{ADP_{cv}} \right)^{n_H} \right) \quad (45)$$

Ve vztahu (45) se používá tabulková bazální hodnota $ATP_{flux\ ox-bazální}$ od 1,5 do 2,4 mM/min (Valkovič L. et al., 2017).

Třetí způsob výpočtu pro hodnotu mitochondriální kapacity vychází z termodynamického pohledu. Původní práce Meyerové (Meyer R. A., 1988) uváděla na základě rozboru experimentálních dat, že $ATP_{flux\ ox}$ je lineárně úměrný hodnotě volné energie ATP (G_{ATP}) (46), avšak pouze v určitých mezích G_{ATP} . Později zavedený

složitější model (47) převádí lineární závislost $ATP_{flux\ ox}$ vůči G_{ATP} na sigmoidální křivku, která lépe odpovídá skutečným hodnotám Q_{max} (Jeneson J. A. et al., 1996)

$$\Delta G_{ATP} = \Delta G_{ATP}^0 + RT \ln \left\{ \frac{[ADP][Pi]}{[ATP]} \right\} \quad (46)$$

$$Q_{max-G_{ATP}} = (ATP_{flux\ ox-bazální} + V_{PCr}) \frac{\exp\left(\frac{\Delta G_{ATP} - C}{RT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{\Delta G_{ATP} - C}{RT}\right) - B} \quad (47)$$

kde B je konstanta vztahující se k termodynamické reverzibilitě a C je volná energie ATP při nulovém V_{PCr} .

Posledním zmíněným modelem je analogický model k $Q_{max-ADP}$, kde místo hodnoty ADP se použije hodnota fosfátového potenciálu (Layec G. et al., 2016), jenž by měl v případě nadbytku kyslíku určovat rychlost oxidativní fosforylace:

$$Q_{max-pot} = V_{PCr} \left(1 + \frac{0,11}{\frac{[ADP][Pi]}{[ATP]}} \right) \quad (48)$$

3.2.5 ³¹P MR saturační transfer

Měření ³¹P MR spekter na tomografech s magnetickým polem 3 T a 7 T umožňuje využít techniku magnetizačního transferu pro sledování reakční kinetiky a energetického metabolismu svalu. Nejčastěji se používá saturační transfer (ST) založený na přenosu magnetizace mezi jádry, která jsou propojena chemickou výměnou. Je tak možné neinvazivně měřit rychlosti chemické výměny a metabolické toky za ustálených podmínek. To znamená, že vyšetření se provádí zejména v klidu, proto je saturační transfer zejména vhodný pro sledování orgánů, kde fyzická zátěž není možná, nebo u pacientů, kteří nemohou vyšetření při fyzické zátěži absolvovat. Na druhou stranu interpretace získaných dat ST není jednoznačná (Kemp G. J. & Brindle K. M., 2012; Prompers J. J. et al., 2014; Valkovič L. et al., 2017) a ne zcela koresponduje s daty naměřenými zátěžovou ³¹P MRS, přestože jistá korelace mezi hodnotami získanými pomocí těchto dvou metod byla zjištěna (Valkovič L. et al., 2013). Ačkoliv je saturační transfer oproti zátěžové ³¹P MRS šetrnou technikou, je toto vyšetření na 3 T tomografech velmi dlouhé, což omezuje jeho praktické možnosti využití.

ST je zaměřen především na zjišťování rychlosti přeměny PCr na ATP a vychází z rovnice (23). Při této reakci krajní atom fosforu v molekule ATP (γ ATP) přechází kreatin–kinázovou reakcí do PCr a obráceně. Po selektivní saturaci (ozáření) signálu γ ATP jsou atomová jádra γ fosforu po svém odštěpení od ATP a navázání na PCr ještě určitý čas saturována a nemohou poskytovat MR signál. To způsobuje po neselektivním 90° pulzu následný pokles velikosti signálu PCr (Obr. č. 6), který je úměrný syntéze ATP kreatin–kinázovou reakcí. Protože se jedná o enzymatickou reakci, kde rychlostní konstanta vypočtená ze saturačního experimentu v sobě zahrnuje vstupní i výstupní produkty, hovoříme o aparentní (nebo pseudo) rychlostní konstantě pro reakci prvního řádu $k_{PCr \rightarrow ATP}$ (Valkovič L. et al., 2017). Ve spektrech je možné současně vidět i pokles Pi úměrný rychlosti syntézy ATP $k_{Pi \rightarrow ATP}$, která je daná činností ATP syntetázy a rychlou glykolytickou výměnou (Kemp G. J. & Brindle K. M., 2012).

$$k_{Pi \rightarrow ATP} = \left(1 - \frac{I_{Pi}^{sat}}{I_{Pi}}\right) / T1_{Pi}^{app} \quad (49)$$

$$k_{PCr \rightarrow ATP} = \left(1 - \frac{I_{PCr}^{sat}}{I_{PCr}}\right) / T1_{PCr}^{app} \quad (50)$$

I_{Pi}^{sat} , I_{PCr}^{sat} jsou velikosti signálů Pi a PCr ve spektru se saturací na frekvenci -2,48 ppm (chemický posun γ ATP). I_{Pi} je velikost signálu Pi ve spektru, které je zrcadlově

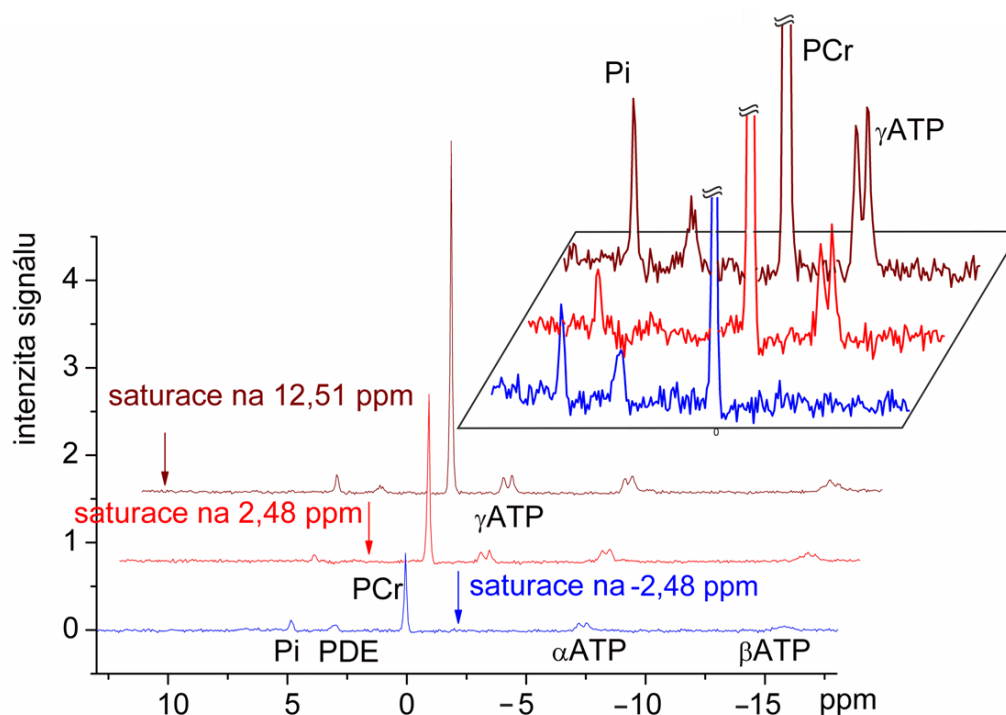
saturováno na 12,51 ppm (zrcadlení saturace γ ATP kolem pozice signálu Pi), I_{PCr} je analogicky velikost signálu PCr ve spektru, které je zrcadlově saturováno na 2,48 ppm (zrcadlení saturace γ ATP kolem pozice signálu PCr). $T1_{Pi}^{app}$ a $T1_{PCr}^{app}$ jsou T_1 aparentní časy Pi a PCr (Valkovič L. et al., 2013), které je nutno proměřit sekvencí inversion recovery. Inversion recovery je sekvence, která obsahuje neselektivní radiofrekvenční 180° pulz, po němž s určitým časovým odstupem (tento čas je obvykle značen TI) následuje další neselektivní 90° radiofrekvenční pulz. V průběhu TI času prodělává magnetizace časový vývoj, který je daný pouze T_1 relaxací. Druhý MR pulz sklopí magnetizaci do transverzální roviny, ve které se detekuje signál.

Metabolický tok charakterizující metabolický obrat PCr a Pi v kreatin-kinázové a ATPázové reakce je dán součinem aparentní rychlostní konstanty a koncentrace metabolitu:

$$F_{PCr} = k_{PCr \rightarrow ATP} \cdot [PCr]_{klid} \quad (51)$$

$$F_{Pi} = k_{Pi \rightarrow ATP} \cdot [Pi]_{klid} \quad (52)$$

Vyjma saturačního transferu lze provádět experimenty s inverzní magnetizací (Buehler T. et al., 2015), které poskytují informace i o zpětné rychlosti zmíněných chemických reakcí, nebo upravené verze saturačního transferu s pouze částečnou saturací, jež dovolují zrychlení měření a provedení saturačního transferu i při fyzické zátěži (Tušek Jelenc M. et al., 2016).



Obr. č. 6. ^{31}P MR spektra v průběhu saturačního experimentu.

^{31}P MR spektrum se saturací na a) -2,48 ppm (γATP) – zmenšuje se signál PCr (kreatin-kinázová reakce), Pi (ATPázová reakce) a signál γATP je zcela potlačen saturačním pulzem (viz detail modré spektrum); b) 2,48 ppm (zrcadlení saturace γATP okolo signálu PCr) – pro vyhodnocení relativního poklesu PCr; c) 12,51 ppm (zrcadlení saturace γATP okolo signálu Pi) – pro vyhodnocení relativního poklesu signálu Pi.

3.2.6 Klinické využití ^{31}P MRS

^{31}P MRS obvykle neposkytuje samostatně jednoznačnou diferenciální diagnózu onemocnění (viz Tab. č. 3), ale je užitečnou metodou ve sledu několika jednotlivých vyšetření. Navíc podává objektivní informaci o metabolických možnostech svalové tkáně u jednotlivých pacientů, čímž může charakterizovat závažnost postižení (Argov Z. et al., 2000; Mattei J. P. et al., 2004). Třetí neocenitelnou výhodou ^{31}P MRS je, že pomocí ní lze dlouhodobě sledovat konkrétní pacienty, a tím mapovat efekt léčby, nebo progresu onemocnění.

Klinická část dizertační práce se zabývá svalovým metabolismem u pacientů se srdečním selháním, diabetem a ischemickou chorobou dolních končetin. Nemoci, na které se práce zaměřila, jsou na rozdíl od většiny diagnóz uvedených v Tab. č. 3 velmi časté a pacienti nezdědka trpí jejich kombinací, protože jsou mezi nimi příčinné souvislosti. Detailnější popis patofyziologie těchto onemocnění je nad rámec dizertační práce. V následujících oddílech bude uvedena pouze krátká charakteristika onemocnění a důležité výzkumy z oblasti ^{31}P MRS, které se pojí s těmito onemocněními.

Tab. č. 3. Projevy onemocnění v parametrech zátěžové a klidové ^{31}P MRS svalu. V tabulce nejsou začleněny diabetes, ischemická choroba dolních končetin a srdeční selhání (diskutovány samostatně).

Onemocnění	^{31}P MRS
amyotrofická laterální skleróza (Ryan T. E. et al., 2014)	Zátěž: prodloužení τ_{PCr} na hranici statistické významnosti.
chronický únavový syndrom (Jammes Y. et al., 2005; Lane R. J. et al., 1998; Wong R. et al., 1992)	Variabilní změny z důvodu pravděpodobně různé etiologie onemocnění u jednotlivých osob. Zátěž: v některých studiích prodloužení τ_{PCr} .
dystrofie - Beckerova a Duchennova (Hájek M. et al., 1991; Kemp G. J. et al., 1993; Lodi R. et al., 1999; Newman R. J. et al., 1982)	Klid: vyšší Pi/PCr poměr a pH; u některých subjektů vyšší PDE. Zátěž: normální hodnota mitochondriální kapacity, ale relativně malý pokles pH při cvičení.
fibromyalgie (Gerdle B. et al., 2013; Jubrias S. A. et al., 1994; Mattei J. P. et al., 1997)	Klid: některé studie uvádějí sníženou hodnotu koncentrace ATP a zvýšenou koncentraci PDE. Zátěž: beze změn vůči kontrolám.
glykogenózy (Coriho nemoc – GIII, McArdle choroba – GV, Taruiova choroba – GVII (Argov Z. et al., 1987a; Chance B. et al., 1982; Duboc D. et al., 1987; Wary C. et al., 2010; Zange J. et al., 2003))	V závislosti na místě defektu se metabolické dráhy projevují různě. Klid: zvýšené PME. Zátěž: v případě poruchy enzymu glykolýzy (fosfofruktokinázy, fosfoglycerátkinázy) se během zátěže hromadí PME, pH může mírně klesat, větší relativní pokles PCr; po zátěži pomalejší návrat Pi na klidové hodnoty. Při poruše glykogenolýzy (typ III, V) je při zátěži pozorován vzrůst pH, větší relativní pokles PCr a nárůst Pi, pokles ATP signálu. Po zátěži prodloužení τ_{PCr} .
hypotyreóza (Khushu S. et al., 2010)	Klid: vyšší Pi/PCr, PDE/ATP a Pi/ATP. Zátěž: prodloužení τ_{PCr} .
hypertyreóza (Erkintalo M. et al., 1998)	Klid: Pi/PCr, PDE/ATP a Pi/ATP snížený. Zátěž: zvýšená utilizace ATP, resp. větší relativní pokles PCr během zátěže.
jaterní cirhóza (Doi J. et al., 2004)	Zátěž: vyšší pokles PCr a pH.
maligní hypertermie (Monsieurs K. et al., 1997; Payen J. F. et al., 1993)	Klid: některé studie uvádějí vyšší Pi/PCr. Zátěž: relativně rychlý pokles PCr a pH při zátěži a prodloužení τ_{PCr} .
myeastenien gravis (Ko S.-F. et al., 2008)	Klid: bez signifikantních změn. Zátěž: vyšší relativní pokles PCr/Pi a pH při zátěži. Změna pH je variabilní. Snížení Q_{max} .

Onemocnění	³¹ P MRS
mitochondriální onemocnění (Argov Z. et al., 1987b; Arnold D. L. et al., 1985; Jeppesen T. D. et al., 2007; Taylor D. J. et al., 1994)	Variabilní výsledky z důvodu velkého spektra onemocnění. Klid: vyšší Pi/PCr a nižší PCr/ATP. Zátěž: vyšší relativní pokles PCr při zátěži. Změna pH je variabilní. Prodloužení τ_{PCr} a snížení Q_{max} .
polymyozitida a dermatomyozitida (Cea G. et al., 2002; Park J. H. et al., 1990; Pfliegerer B. et al., 2004)	Klid: zvýšený Pi/PCr, Pi/ATP. Zátěž: větší vzrůst poměru Pi/PCr při zátěži; prodloužení τ_{PCr} a snížení Q_{max} .
pustulózní psoriáza (Kiricuta I. C. et al., 1993)	Zátěž: nárůst PME během zátěže.
uremický syndrom (Nishida A. et al., 1991; Táborský P. et al., 1993)	Klid: nižší koncentrace PCr, ATP. Zátěž: větší pokles PCr a pH při zátěži; prodloužení τ_{PCr} .

3.2.6.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) jsou nosologicky dvě různá onemocnění, projevující se úplným nebo relativním nedostatkem inzulínu. V důsledku nedostatku inzulínu mají DM pacienti porušenou fyziologickou hladinu glykémie a postupem doby trpí i chronickými komplikacemi diabetu. U pacientů s M1 je úplný nedostatek inzulínu způsoben autoimunitním zánětem, který ničí pankreatické β -buňky Langerhansových ostrůvků, jež produkují tento hormon. Pacienti s DM2 mají pouze sníženou produkci inzulínu, ale navíc zpravidla trpí inzulínovou rezistencí (neadekvátně malá odpověď periferních tkání na inzulín). Inzulínovou rezistenci lze zjistit i u části pacientů s DM1 (Miura J. & Uchigata Y., 2008). V poslední době se dělení diabetu upřesňuje a byly definovány jednotlivé podtypy diabetu I a II typu (Flannick J. et al., 2016; Miura J. & Uchigata Y., 2008).

Inzulín má v organismu kromě funkce regulace hladiny glukózy v krvi řadu dalších funkcí. Např. se podílí na regulaci tvorby glykogenu, proteosyntéze, glukoneogenezi a syntéze lipidů (Barrett K. E. & Ganong W. F., 2012). Mimo život ohrožujících akutních komplikací diabetu, jako je hyperglykemické, nebo hypoglykemické kóma, se objevují i závažné dlouhodobé komplikace v podobě mikrovaskulární a makrovaskulární angiopatie, která způsobuje např. selhání ledvin (diabetická nefropatie), ztrátu zraku (diabetická retinopatie) a může se i částečně podílet na poškození periferní nervové tkáně (Chawla A. et al., 2016). Angiopatie

a neuropatie vede ke vzniku syndromu diabetické nohy a nutnosti amputace končetiny (American Diabetes Association, 2015).

Více ^{31}P MR vědeckých publikací se soustředilo na výzkum diabetu druhého typu, a to na podíl svalového metabolismu v rozvoji inzulinové rezistence a metabolického syndromu (Petersen K. F. et al., 1998; Slattery M. J. et al., 2014). Zejména Petersen spojoval možnou mitochondriální myopatii s inzulinovou rezistencí a s poklesem schopností produkce inzulínu β -buňkami na základě výzkumu s osobami s velkým rizikem vzniku diabetu druhého typu (Petersen K. F. et al., 2004). Tyto osoby projevovaly zmenšenou mitochondriální fosforylaci při kontrolovaném experimentu s podáváním glukózy a inzulínu.

Souběžně s prací Petersena se objevovaly i klinicky zaměřené studie, které přinášely konkrétní poznatky o zhoršeném svalovém metabolismu u pacientů, u kterých DM2 již probíhal. Klinické práce popsaly zejména nižší poměr Pi/PCr, pomalejší obnovu PCr, menší toleranci zátěže a větší pokles pH během zátěže (Scheuermann-Freestone M. et al., 2003; Wu F.-Y. et al., 2012).

Některé ^{31}P MRS práce zkoumaly i efekt diabetických léčiv (Lim E. et al., 2011; Petersen K. F. et al., 2000) nebo vliv fyzické aktivity na svalový metabolismus (DeVries D. A. et al., 1996), případně celkovou vhodnost ^{31}P MRS jako metody pro sledování svalového metabolismu u pacientů s DM2 (Praet S. F. E. et al., 2007).

Publikací, které se zabývají výhradně diabetiky I typu, je relativně méně. V jedné z prvních prací se Cline a Petersen (Cline G. W. et al., 1997) zabývali glukoneogenezí a fosfátovým metabolismem ve svalové tkáni při kontrolovaném podávání glukózy a inzulínu. Ve studii bylo zjištěno, že i pacienti s DM1 mají porušenou tvorbu glykogenu, jež souvisí s metabolickými pochody souvisejícími s příjmem glukózy do buňky a hladinou glukózy-6-fosfátu (G6P). Po práci Clina následovaly práce zabývající se změnami oxidativního metabolismu při zátěži, zvláště u DM1 mužů (Crowther G. J. et al., 2003), zvláště u DM1 žen (Item F. et al., 2011). V případě DM1 mužů byla nalezena snížená mitochondriální kapacita, u DM1 žen nikoliv, ačkoliv mitochondriální funkce byla u nich korelovaná s glykosylovaným hemoglobinem. V roce 2011 vyšla další studie (Kacerovsky M. et al., 2011), která využívala i ^{31}P MR saturační transfer k hodnocení metabolického obratu u DM1 pacientů při hyperinzulinovém-euglykemickém clampu. Pacienti vykazovali menší produkci ATP a fosforylaci glukózy na G6P, přičemž produkce ATP byla korelovaná s inzulinovou rezistencí. Zatím poslední práce věnující se nekomplikovaným DM1 pacientům byla

publikovaná v roce 2015 a srovnávala adolescentní DM1 subjekty se zdravými kontrolami pomocí zátěžové ^{31}P MRS, přičemž i tato práce (Cree-Green M. et al., 2015) potvrdila zhoršenou mitochondriální funkci u pacientů s DM1 a vztah této dysfunkce k inzulinové rezistenci.

^{31}P MR spektroskopii byly studováni pacienti i s pokročilými komplikacemi diabetu. Konkrétně bylo sledováno poškození svalového metabolismu při syndromu diabetické nohy klidovou (Greenman R. L. et al., 2005; Suzuki E. et al., 2000) i zátěžovou (Tecilazich F. et al., 2013) ^{31}P MR spektroskopii. Z těchto prací vyplynulo, že pacienti se syndromem diabetické nohy mají výrazně snížený poměr PCr/Pi, vyšší klidové pH a prodloužený τ_{PCr} .

Vyjma ^{31}P MRS je ke studiu svalového metabolismu u diabetiků používána i ^1H MRS (Kacerovsky M. et al., 2011), která poskytuje informaci o zastoupení intramyocelulárního tuku (Skoch A. et al., 2006) a jehož zvýšená koncentrace je dávana do spojitosti s inzulinovou rezistencí (Krssak M. et al., 1999), poškozením mitochondrií. ^{13}C MRS u diabetiků byla použita při clampových studiích jako doplňující metoda k ^{31}P MRS k sledování vzniku svalového glykogenu (Cline G. W. et al., 1997; Lim E. et al., 2011; Lim E. L. et al., 2011).

3.2.6.2 Srdeční selhání

Srdeční selhání je stav, kdy srdce pacienta je poškozeno natolik, že klesá jeho minutový srdeční objem a jeho funkcí nejsou kryty metabolické potřeby ostatních tkání. Limitaci svalového metabolismu při srdečním selhání potvrdila řada zátěžových ^{31}P MRS studií, které ukázaly, že pacienti mají zhoršenou toleranci k zátěži - větší pokles PCr, větší pokles pH (Adamopoulos S. et al., 1993; Mancini D. M. et al., 1988; Massie B. M. et al., 1988) a pomalejší obnovu PCr po zátěži (Cohen-Solal A. et al., 1995; Hanada A. et al., 2000; Toussaint J. F. et al., 1998).

Limitace svalového metabolismu je u srdečního selhání dána zejména sníženou dodávkou kyslíku z důvodu nedostatečně fungujícího srdce (Kemps H. M. C. et al., 2009), ale i jiné vlivy, které nejsou spojeny s nedostatečnou perfúzí svalu, se mohou podílet na detekovaném oslabení svalového metabolismu (Hanada A. et al., 2000; Mancini D. M. et al., 1994; Wiener D. H. et al., 1986). Snížená dlouhodobá perfúze a snížená svalová činnost (Drexler H. et al., 1992) či další přidružené komplikace srdečního selhání (diabetes, ischemická choroba) vedou totiž i ke strukturním změnám

svalové tkáně - převaha pomalých svalových vláken (Drexler H. et al., 1992; Mancini D. M. et al., 1989), vyšší obsah tuku ve svalu (Haykowsky M. J. et al., 2014) - a projevují se zmíněným posunem metabolismu od aerobního k anaerobnímu.

3.2.6.3 Ischemická choroba dolních končetin

Ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) výrazně limituje pacienty v pohybu, způsobuje jim klaudikace a může vést ke vzniku ulcerací a k odumření tkáně v případě kritické tkáňové ischemie. Lze očekávat, že zmenšené zásobení kyslíkem dané ischemií bude limitovat svalový metabolismus.

Efekt krátkodobé ischemie na svalový metabolismus lze zkoumat na zdravých subjektech, případně i na nemocných při okluzi svalu. Vědeckých studií bylo provedeno několik (Argov Z. et al., 1996; Greiner A. et al., 2005, 2007), přičemž Greiner ukázal, že lze i měnit velikost tkáňové ischemie různým stupněm okluze a pozorovat tím postupný efekt tkáňové ischemie u jednotlivých osob.

Jedna z prvních větších souborných prací věnující se přímo efektu tkáňové ischemie u pacientů trpících ICHDK vyšla už v roce 1986 (Zatina M. A. et al., 1986). Práce Kempa vydaná v roce 1995 (Kemp G. J. et al., 1995), je z metodického hlediska velmi obsáhlá a ukázala u pacientů trpících ischemií jasný posun od oxidativního k anaerobnímu metabolismu (pomocí výpočtu metabolických toků během zátěže) a menší eliminaci H^+ ze svalových buněk. V oblasti hodnocení léčby se zkoumal vliv provedené angioplastiky na svalový metabolismus nebo efekt léčebných preparátů (Di Marzo L. et al., 1999; Pipinos I. I. et al., 2002; Wahl D. G. et al., 1994) či pravidelné fyzické zátěže (Back M. R. et al., 2000). Konkrétně Brotzakis (Brotzakis P., 1995) zkoumal efekt angioplastiky na klidový svalový metabolismus (po PTA vyšší PCr/Pi). Vyšetření při zátěži před a po PTA provedli Schunk (Schunk K. et al., 1998) a West (West A. M. et al., 2012). Oba autoři se shodují ve zrychlení obnovy PCr po zátěži díky prodělané PTA, i když nedochází k dosažení kontrolních hodnot zdravých osob. Podobný efekt měly i vasoaktivní látky (Wahl D. G. et al., 1994) nebo lék Pentoxilin (Pipinos I. I. et al., 2002).

Někteří jiní autoři se zajímali, zda výsledky ^{31}P MRS korelují s dalšími metodami měření okysličení a měření svalové perfúze (Anderson J. D. et al., 2009; Kemp G. J. et al., 2001). Výsledky prací jsou však protichůdné. Ve výzkumech Kempa korelace byla nalezena, na rozdíl od práce Andersona, kde se korelace nepotvrdila.

Bez signifikantních korelací často vychází srovnání metabolických parametrů s indexem kotníkových tlaků (Isbell D. C. et al., 2006; West A. M. et al., 2012). Vysvětlení lze nalézt v pracích Pipinose, který popisuje vznik vnitřního poškození mitochondrií u ICHDK, které by mělo být dáno dlouhodobým negativním působením ischemie na svalové buňky (Pipinos I. I. et al., 2000, 2003).

Při shrnutí všech ^{31}P MRS vědeckých prací lze konstatovat, že ischemie u pacientů vede vždy k prodloužení τ_{PCr} a vyššímu poklesu pH během zátěže. Naproti tomu změny v klidovém metabolismu jsou nalezeny jen někdy – vyšší poměr PCr/Pi (Brotzakis P., 1995; Zatina M. A. et al., 1986), vyšší klidové pH (Hands L. J. et al., 1986; Wahl D. G. et al., 1994) – stejně jako korelace se standardními klinickými parametry (nejčastěji je popisována korelace s délkou chůze na běžícím pásu a τ_{PCr} (Kemp G. J. et al., 2001; Pipinos I. I. et al., 2002)).

3.3 ^1H MR zobrazení svalů ve spojitosti s fyzickou zátěží

Fyzická zátěž má vliv na změnu charakteru ^1H MR obrazu skrze ovlivnění T_1 (de Sousa P. L. et al., 2011; Varghese J. et al., 2015), T_2 a T_2^* relaxačních časů (Caterini J. E. et al., 2015; Damon B. M. et al., 2007; Schmid A. I. et al., 2014) svalové tkáně. Na změně relaxačních časů se podílí několik faktorů. Jedním je změna prokrvení a oxygenace tkáně. Oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin mají odlišnou magnetickou permeabilitu, kolísání signálu v důsledku změn poměru okysličené a neokysličené krve se využívá zejména ve funkčním zobrazování, tzv. BOLD efekt (Blood Oxygenation Level Dependent). Druhým podstatným faktorem je změna zastoupení vody v jednotlivých kompartmentech svalů způsobená změnou osmotického tlaku metabolitů, jež vznikají během zátěže (Prompers J. J. et al., 2006).

Relativně jednoduchý způsob monitorování změny relaxačních časů (zejména T_2^*) je použití echo-planární (EPI) sekvence, jež se používá standardně ve funkčním MR zobrazování (fMRI). Tyto sekvence jsou rychlé (umožňují MR zobrazení celého svalů během 2-3 s) a velikost detekovaného signálu velkou měrou závisí právě na T_2^* relaxačním času tkáně.

Efekt změny intenzity obrazu, respektive relaxačních časů se může hodnotit ve vztahu k zátěži, ale i jiné formy podnětu se mohou použít k ovlivnění kontrastu obrazu. Mimo použití fyzické zátěže je takovým podnětem zejména reaktivní hyperémie, ke které dochází po uvolnění zaškrcovadla (Huegli R. W. et al., 2009; Ledermann H.-P. et al., 2006; Schewzow K. et al., 2013).

Při zátěžovém MR vyšetření se obvykle obraz vyhodnocuje až po zátěži, protože během zátěže jsou pohybové artefakty příliš velké. V rámci publikovaných prací se můžeme setkat se dvěma typy experimentů. V prvním experimentu se vyhodnocuje signál EPI po delší, několika minutové zátěži. Zde je nacházena markantní změna intenzity obrazu v řádu až desítek procent (Caterini J. E. et al., 2015; Damon B. M. et al., 2007; Schmid A. I. et al., 2014), křivka nárůstu a poklesu intenzity má charakteristický průběh a parametry fitování mohou korelovat s dalšími klinickými parametry nebo parametry zátěže (Damon B. M. et al., 2007), či přímo s výsledky zátěžové fosforové MRS (Schmid A. I. et al., 2014).

Fitování vývoje intenzity obrazu po zátěži se může provést například součtem gama funkce ($g(t)$), sigmoidální funkce ($s(t)$) a lineární funkce ($l(t)$) (Schmid A. I. et al., 2014):

$$S(t) = g(t) + s(t) + l(t) \quad (53)$$

$$S(t) = g_0(t - t_0)^{g_1} e^{-g_2(t-t_0)} + s_0 \frac{1}{1 + e^{-s_1(t-t_0-t_1)}} + l_0 + l_1(t - t_0) \quad (54)$$

kde t je čas, t_0 je počátek regenerace, g_1 a g_2 jsou škálovací faktory gama funkce (g_1 vyjadřuje zejména její vzrůst a g_2 její pokles), s_0 je rozdíl intenzity signálu mezi koncem zátěže a zcela klidovým stavem l_0 , s_1 je rychlost nárůstu sigmoidální funkce a t_1 je relativní zpoždění mezi sigmoidální a gama funkcí.

V druhé verzi experimentu je sledována změna intenzity obrazu pouze po jedné kontrakci (Meyer R. A. et al., 2004; Towse T. F. et al., 2005, 2011). V případě tohoto protokolu stojí pravděpodobně za změnou intenzity obrazu zejména změna prokrvení a oxygenace tkáně dané BOLD efektem. To potvrzuje korelace mezi velikostí změny signálu EPI sekvence a infračervenou spektroskopií (saturace a objem krve) a rychlostí průtoku krve určenou dopplerovskou ultrasonografií po jedné svalové kontrakci (Towse T. F. et al., 2011).

Po jedné kontrakci je změna detekovaného signálu mnohem menší, v řádu pouze maximálně několika procent. Stejně tak celý časový vývoj nárůstu a poklesu signálu k hodnotám před kontrakcí je v řádu maximálně desítek sekund na rozdíl od vývoje signálu po delším cvičení, kde se jedná o několik minut, než se velikost signálu vrátí na hodnoty, které jsou detekovány hned při konci zátěže, či ještě před jejím celým zahájením.

4 Experimentální část

4.1 *Pacientské skupiny a dobrovolníci*

Všichni pacienti a zdraví dobrovolníci byli seznámeni s účelem jednotlivých studií a podepsali informovaný souhlas s MR vyšetřením. Pacienti byli vybíráni ve spolupráci s lékaři. Jednotlivé projekty byly schváleny etickou komisí Thomayerovy nemocnice a IKEM.

V rámci dizertační práce byly ^{31}P MRS vyšetřeny 4 větší kohorty pacientů a několik desítek zdravých dobrovolníků, kteří sloužili jako kontroly pro pacientské skupiny nebo na nich byla prováděna optimalizace jednotlivých metod a protokolů. Některé osoby byly vyšetřeny opakovaně pro hodnocení léčby (pacienti) nebo reprodukovatelnosti měření (zdraví dobrovolníci). Zdraví dobrovolníci byli vybíráni do dotyčných skupin tak, aby byli s pacienty fyzicky, věkově a BMI srovnatelní. Pro posouzení fyzické aktivity a zdravotního stavu byl zdravým dobrovolníkům dáván dotazník.

První kohorta pacientů se skládala z osob trpících diabetem mellitus (DM) v různém stádiu komplikací. Jednalo se zejména o nekomplikované DM1 pacienty, DM2 pacienty s inzulinovou rezistencí, pacienty s DM1 se selháním ledvin před a po transplantaci ledvin a pankreatu a pacienty s DM1 a DM2 s kritickou ischemií dolní končetiny. Pacienti s kritickou ischemií podstupovali experimentální léčbu mezenchymálními kmenovými buňkami, nebo perkutánní transluminální angioplastikou (PTA). Klinická charakterizace diabetických pacientů je uvedena v kapitole 5.2 a v publikaci (Němcová A. et al., 2017) a v (Sedivy P. et al., 2018).

Druhou velkou skupinu tvořili pacienti se srdečním selháním. Část z těchto pacientů měla sideropenii a experimentálně podstupovali léčbu intravenózním přípravkem s obsahem Fe (karboxymaltóza železa, dávka 2 x 500 mg).

V třetí vyšetřované skupině byli nediabetičtí pacienti trpící ischemickou chorobou dolních končetin. Tito pacienti vhodně doplňovali studii o porovnání s diabetickými pacienty s kritickou ischemií dolních končetin (Sedivy P. et al., v tisku).

Čtvrtou, zatím neuzavřenou skupinu vyšetřovaných pacientů tvoří osoby se selháním jater, z nichž část následně prodělala transplantaci jater. U pacientů se zkoumá vztah mezi vznikem nealkoholické steatohepatitidy či diabetu a parametrů oxidativního metabolismu svalu. Vzhledem k tomu, že vyšetřování čtvrté skupiny pacientů není stále

ukončeno, nejsou tito pacienti v dizertační práci dále zmiňováni, pouze první výsledky jsou uvedeny v článku (Hejlová I. et al., 2016), který je součástí příloh dizertační práce.

V rámci hodnocení jednotlivých metod a interpretace výsledků byly od pacientů získány i klinické údaje. Porovnávány byly údaje vztahující se k danému onemocnění, kterým pacienti přednostně trpěli. V první skupině se jednalo o glykosylovaný hemoglobin, inzulinovou rezistenci, délku diabetu, aktuální glykemii či kreatinin. U pacientů se srdečním selháním byla hodnocena ejekční frakce, NYHA (Dolgin M. & New York Heart Association. Criteria Committee., 1994) a MLHFQ (Rector T. S. & Cohn J. N., 1992) skóre a biochemické parametry krve vztahující se k sideropenii (zastoupení hemoglobinu, Fe v séru, objem erytrocytů, koncentrace feritinu a jeho saturace). U pacientů s ischemií se jednalo o ABI index nebo hodnotu transkutánní tenze kyslíku.

4.2 Experimentální vybavení

4.2.1 MR tomografy

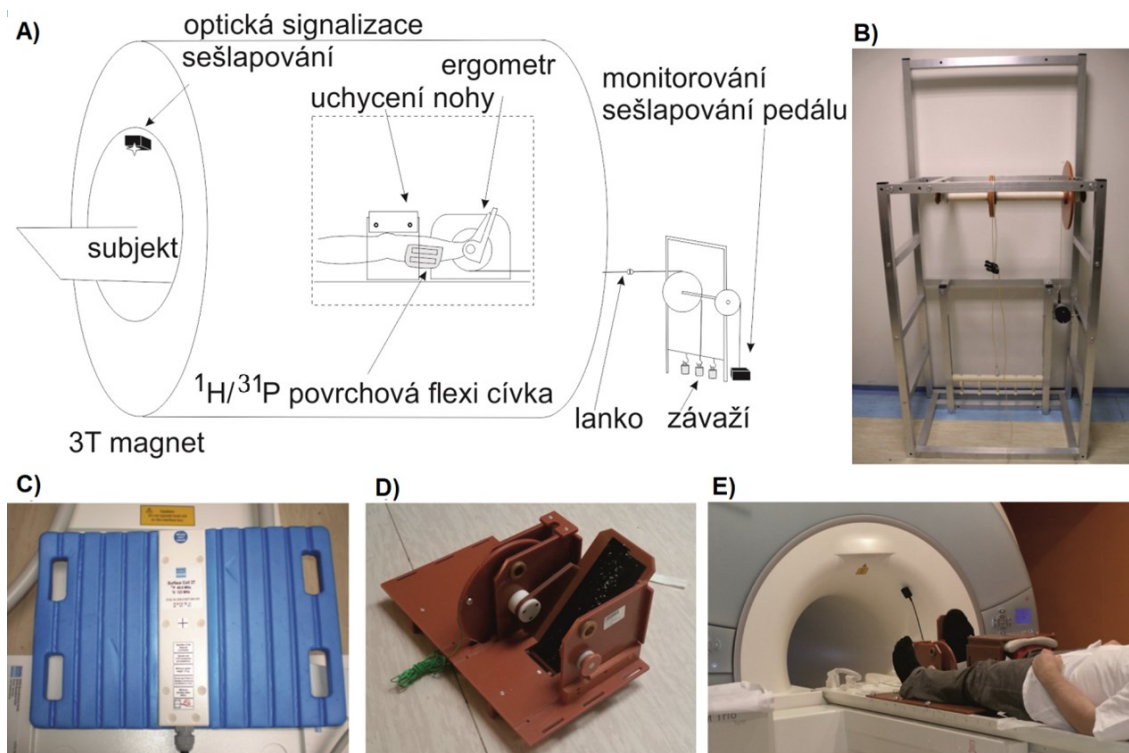
Měření uvedená v dizertační práci probíhala zejména na 3 T MR přístroji Magnetom Trio Tim (Siemens Healthcare, Erlangen, Německo) v IKEM. Část měření se uskutečnila na 3 T a 7 T (Magnetom Trio a 7 T Magnetom, Siemens Healthcare) tomografu v MR centru Excellence Vídeňské univerzity (CEMR; The Center of Excellence for MR Research) v Rakousku.

Jak tomograf Trio v IKEM, tak tomografy v CEMR jsou vybaveny multinukleárním kanálem pro měření ^{31}P MRS. V CEMR byla použita povrchová duální $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ cívka o poloměru 10 cm s rigidním tělem, v IKEM je k dispozici povrchová duální flexi $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ cívka o průměru 11 cm (Rapid Biomedical, Rimpar, Německo - viz Obr. č. 7d). Pro ^1H MRI končetiny lze v IKEM využívat buď 16 kanálovou objemovou kolenní cívku nebo povrchovou dvoukanálovou flexi cívku (obě od Siemens Healthcare).

4.2.2 Ergometry

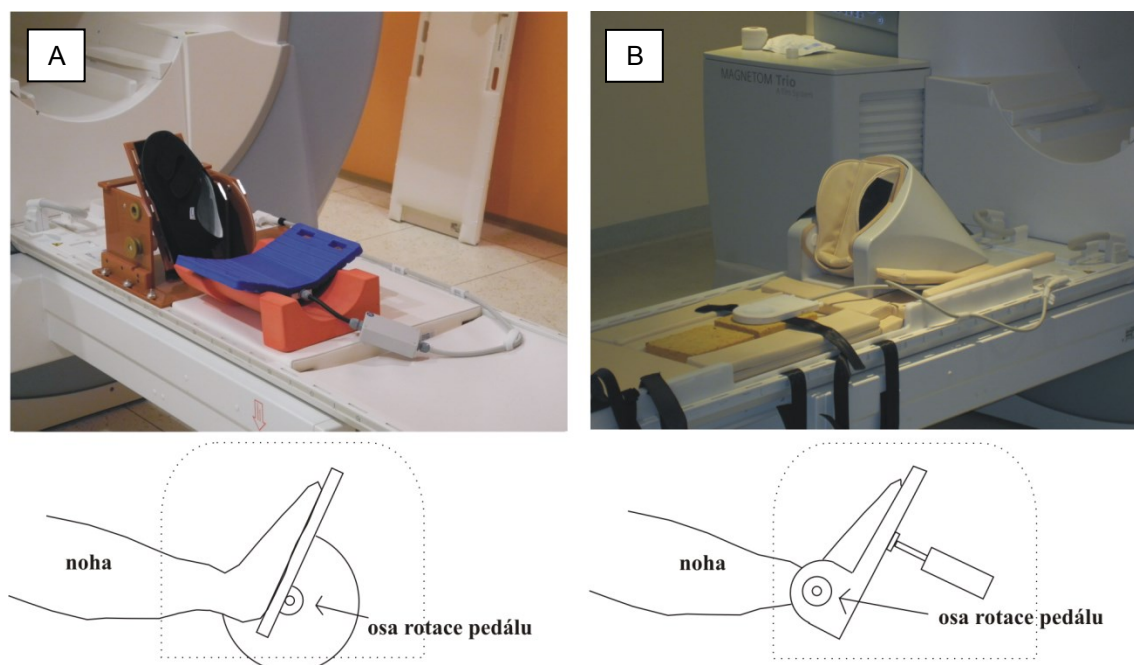
V IKEM je pro zátěžovou ^{31}P MRS lýtkového svalu k dispozici pedálový ergometr vlastní konstrukce. Tento ergometr je založen na mechanickém principu, odpor pedálu je nastavován pomocí kladky se závažím (viz Obr. č. 7). Monitorování sešlapování pedálu je realizováno potenciometrem, který snímá posun závaží. Ergometr má dvě analogická provedení, pro levé a pravé chodidlo. Trigrování sešlapování je prováděno optickou signalizací, která je automaticky synchronizována s během MR sekvence.

V CEMR se používá komerční chodidlový ergometr Trispect (Ergospect, Innsbruck, Rakousko, viz Obr. č. 8), který je založen na pneumatickém principu. Odpor pedálu se nastavuje pomocí tlaku vzduchu, stejně tak monitorování pohybu je prováděno pomocí tlakového čidla. Další rozdíl mezi ergometrem Trispect a ergometrem v IKEM byl v poloze osy rotace šlapky ergometru (viz Obr. č. 8 a oddíl 5.1.3).



Obr. č. 7. Experimentální vybavení.

A) schéma konstrukce MR kompatibilního ergometru; B) konstrukce nosiče závaží a monitorování zátěže; C) duální $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ povrchová cívka; D) pedálový systém ergometru v nejnovější konstrukční verzi; E) umístění zařízení a vyšetřovaného subjektu před magnetem tomografu.



Obr. č. 8. Porovnání konstrukce ergometrů.

A) mechanický ergometr v IKEM (před druhou přestavbou); B) pneumatický ergometr v CEMR. Mimo nastavování zátěže je zejména odlišné provedení pedálu šlapky, viz schémata pod fotografiemi.

4.3 Vyšetřovací protokoly

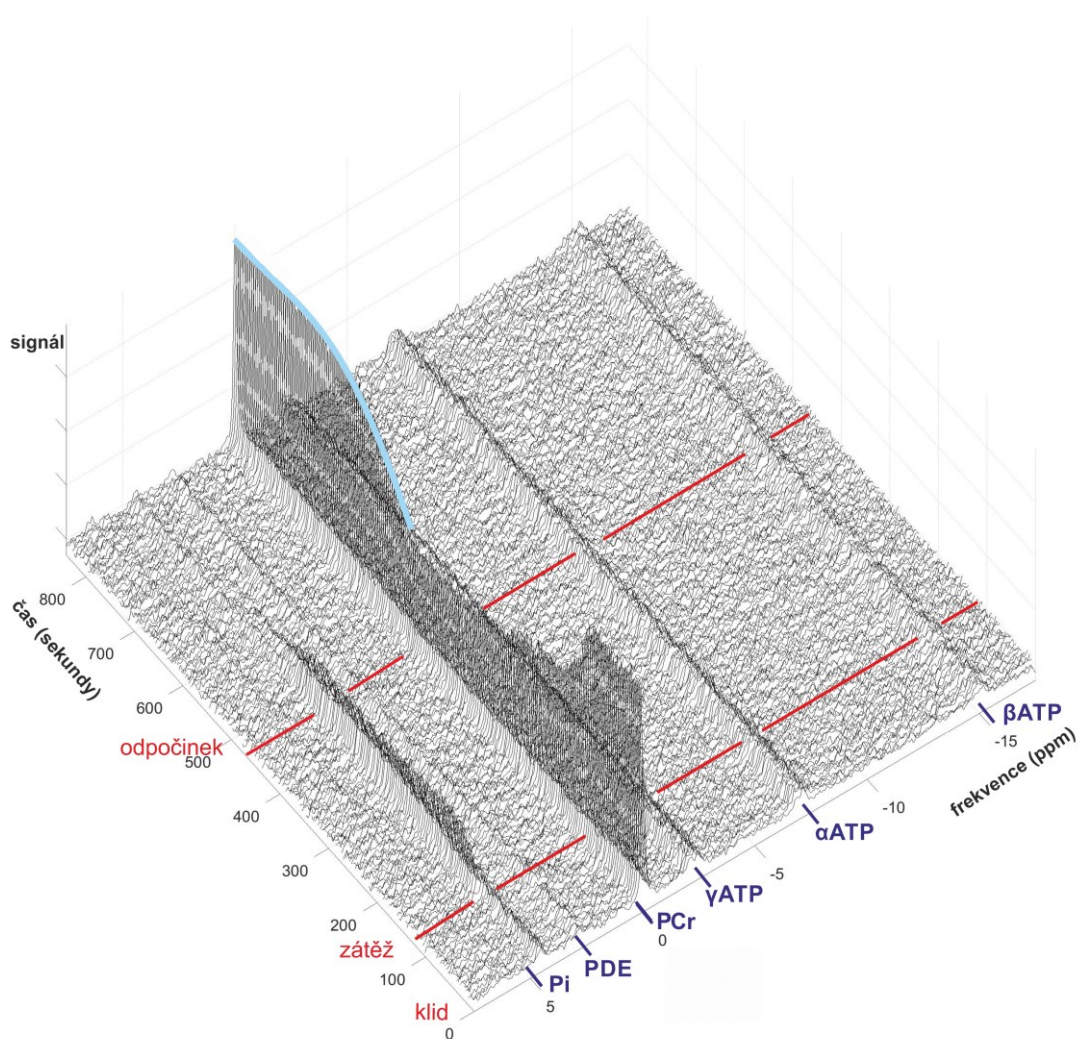
4.3.1 Protokoly ³¹P MRS

4.3.1.1 Klinicky využívaný protokol zátěžové ³¹P MRS

Protokol zátěžové ³¹P MRS se skládal ze dvou částí:

- 1) MR zobrazení pro určení průřezu svalu a ověření polohy cívky vůči lýtkovému svalu (dvě kratší proton-denzitní sekvence);
- 2) dvě nelokalizované ³¹P MRS sekvence FID:
 - a) pro klidový metabolismus svalu (TR = 15 s, sklápěcí úhel (FA) = 90°, 16 akvizic (Acq), 1 měření (meas), délka 4 minuty);
 - b) pro dynamické měření se samostatným ukládáním každé změřené akvizice (TR = 2 s, FA = 42°, 420 meas, délka 14 minut). Pacient během této sekvence byl dvě minuty v klidu (60 spekter), 6 minut vykonával flexi (7 kg závaží, jedno případně dvě sešlápnutí za akvizici (2 s), 180 spekter) a 6 minut odpočíval (regenerační perioda, 180 spekter). Ukázkový záznam dat je na Obr. č. 9. Celková doba vyšetření činila přibližně 30 minut.

Mimo fosforového metabolismu se měřila u osob i maximální síla (MVF), kterou jsou schopny stlačit pedál (měřeno na MR nekompatibilním dynamometru mimo místnost tomografu). Z MR vyšetření byl spočten průřez m. gastrocnemius určený z ¹H MRI transverzálních řezů a celková vykonaná práce během sešlapování pedálu v tomografu.



Obr. č. 9. Záznam ^{31}P MRS spekter během 14 minutového zátěžového protokolu.

4.3.1.2 Protokol ^{31}P saturačního transferu

Protokol ^{31}P saturačního transferu se skládal z MR zobrazení pro ověření polohy cívků vůči lýtkovému svalu, klidové nelokalizované ^{31}P MRS (sekvence shodná se zátěžovým ^{31}P MRS protokolem) a sekvencí pro měření nelokalizovaného ^{31}P saturačního transferu. V případě pacientů byla použita saturační sekvence s postupně nastavenou saturací na: γATP (-2,48 ppm), 2,48 ppm a 12,51 ppm (každá sekvence: 32 Acq, TR = 15 s, 8 minut). V případě zdravých dobrovolníků byl získán navíc T_1 aparentní čas PCr a Pi pomocí nelokalizované ^{31}P MR sekvence Inversion Recovery (s inverzním časem TI = 100, 300, 700, 1 250, 1 900, 3 650, 4 800, 6 200, 8 000 ms, TR = 15 s, 16 Acq, 4 minuty na každé TI).

4.3.1.3 Metodický protokol pro porovnání zátěžové ³¹P MRS

Další měření zátěžové ³¹P MRS zahrnovalo protokoly na metodické srovnání vlivu experimentálního vybavení (cívky a ergometru), vlivu velikosti zátěže a velikosti magnetického pole na parametry získávané zátěžovou ³¹P MRS. V rámci vyšetřovacích protokolů se v IKEM provedlo měření dvou zátěží – 7 a 10,5 kg s odstupem 15 minut během jednoho vyšetření (perioda sešlapování byla stejná jako u klinického protokolu TR = 2 s). V CEMR se provedlo na 3 T a 7 T tomografech měření 3 zátěží s odporem 1,2; 1,8 a 2,4 baru během jednoho vyšetření se stejným časovým odstupem 15 minut (1,2 a 1,8 baru odpovídá zátěži 7 a 10,5 kg v IKEM. Odpory byly vybrány na základě kalibrace pomocí závaží z IKEM).

Parametry ³¹P MR sekvencí byly identické jako v případě uvedeného klinického protokolu zátěžové ³¹P MRS, pouze na 7 T byl zvětšen frekvenční rozsah pulzů a navýšen FA. Pro vyhodnocení reprodukovatelnosti bylo dvakrát vyšetřeno 5 osob na obou pracovištích stejným vyšetřovacím protokolem (vyjma největší zátěže). U těchto osob se měřila i sekvence ³¹P 3D CSI (matice 12 x 12 x 12, rozměry matice (VOI) 200 x 200 x 200 cm, FA = 42°, 2 Acq, TR = 2 s) pro hodnocení detekčního objemu obou fosforových cívek.

Pro výpočet metabolických parametrů se použil stejný postup jako u klinického protokolu vyjma normalizace signálu PCr, která byla provedena přes poměr PCr/γATP (na 7 T signál βATP není plně excitován, protože SAR limity a zesilovač nedovolují použít dostatečně velký výkon sklápěcích pulzů v požadovaném frekvenčním rozsahu).

Podrobnější popis experimentu je uveden v (Šedivý P. et al., 2015).

4.3.2 ¹H MRI protokol

4.3.2.1 Protokol na hodnocení změny intenzity obrazu svalové tkáně vázané na prodělanou zátěž

Vyšetřovací schéma se skládalo ze základní lokalizační sekvence a šestiminutové zátěže (7 kg), kdy osoby měly za úkol sešlapovat pedál jako při zátěžové ³¹P MRS. Během samotné zátěže se žádná MR sekvence neměřila, ale po jejím dokončení okamžitě následovala sekvence EPI (TR = 3 s, FA = 70°, TE = 30 ms, VOI = 180 x 180 x 5 mm, 36 vrstev, matice 64 x 64, 1 Acq, 180 meas, celková doba sekvence 9 minut, transverzální orientace), jež měla zaznamenat změnu v kontrastu

tkáně způsobenou provedenou zátěží. Na závěr vyšetření byla použita T_1 vážená sekvence s 4x vyšším prostorovým rozlišením než měla EPI sekvence (TR = 1,2 s, TE = 11 ms, FA = 90°, VOI = 180 x 180 x 5 mm, matice 256 x 256, 36 vrstev, doba trvání 3:53 min) pro anatomické mapování změn zjištěných EPI sekvencí.

4.4 Použitý vyhodnocovací software a metodika zpracování zátěžové ³¹P MRS

Pro řešení jednotlivých úkolů dizertační práce byl použit program jMRUI 5.0 (jMRUI Consortium) a Matlab (MathWorks). Program jMRUI umožňuje vyhodnocení integrálních intenzit jednotlivých metabolitů ve ³¹P MR spektru pomocí několika metod. Pro řešení dizertační práce byla zvolena metoda, jež je implementována v modulu AMARES, který fituje spektrum signály, jejichž přítomnost se očekává v kosterním svalu. Očekávaná informace o jednotlivých metabolitech (Larmorova frekvence metabolitu, přibližná pološířka, multičetná struktura atd.) je pro modul AMARES uložena v tzv. bázi, kterou předem musí definovat uživatel programu.

Program Matlab (verze R2007b a R2016b) byl využit jako vývojové prostředí pro tvorbu vlastních programů na zpracování MRI a MRS dat (popis vyvinutých programů ve výsledcích dizertační práce, viz kapitola 5.1.4). Program Matlab spolu se software R, GraphPad Prism (GraphPad Software) a Statistica (StatSoft) byly využity ke statistickému zpracování výsledků.

Jako výsledné parametry klidové ³¹P MRS z programu jMRUI byly vzaty poměry metabolitů (Pi, PCr, PDE) vůči signálu β ATP nebo vůči celkové sumě signálu všech fosforových metabolitů v ³¹P MR spektru. Ze zátěžové ³¹P MRS se hodnotil zejména relativní a absolutní pokles PCr (absolutní kvantifikace provedena přes poměr PCr/ β ATP a předpokládanou stálou ATP koncentraci 8,2 mM/l), V_{PCr} , τ_{PCr} (monoexponenciální fit), pH na konci zátěže (pH_{cv}) a Q_{max} . Pro statistické vyhodnocení Q_{max} se vybral výpočet podle ADP modelu, viz vztah (44).

4.5 Statistické hodnocení

Pro porovnávání dvou skupin parametrů byl zvolen Studentův t–test v případě shodných rozptylů (hodnoceno F–testem), v případě různých rozptylů nebo nesplnění podmínky normality byl zvolen neparametrický Mann-Whitneyův test (U–test). Pro hodnocení efektu léčby byl používán párový t-test.

Porovnání více skupin bylo provedeno pomocí jednofaktorové (one–way ANOVA) nebo vícefaktorové analýzy rozptylu (při hodnocení kombinovaných vlivů, např. stupně onemocnění a pohlaví). Jestliže ANOVA ukázala signifikantní změny, byla jako post–hoc test vybrána Tukeyova metoda mnohonásobného porovnávání. Hladina statistické významnosti byla zvolena na $p = 0,05$.

Pro korelační analýzy byl použit Pearsonův korelační koeficient.

Pro porovnání vyšetření na dvou odlišných ergometrech byly vzaty Bland–Altmanovy grafy (Altman D. G. & Bland J. M., 1983).

Pro určení reprodukovatelnosti měření byl změřen Test–retest s výpočtem intra–class korelace (*ICC*) a koeficient variace (*CV*) (Shrout P. E. & Fleiss J. L., 1979):

$$CV = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|test_i - retest_i|}{(test_i + retest_i)/2} \quad (1)$$

Některá data byla hodnocena také pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) nebo lineární diskriminační analýzou (LDA).

5 Výsledky

5.1 Metodické výsledky

5.1.1 Hodnoty reprodukovatelnosti zátěžové ^{31}P MRS a posouzení vlivu magnetického pole a experimentálního vybavení na výsledné parametry zátěžové ^{31}P MRS

Porovnání vlivu experimentálního vybavení (cívek, magnetického pole a ergometrů) na konečné metabolické parametry proběhlo u 11 osob (3 ženy, 8 mužů) na 3 T tomografu v IKEM a na 3 T a 7 T tomografu v CEMR. Průměrný věk vyšetřovaných osob činil 36 ± 13 let s indexem $\text{BMI} = 23,5 \pm 2,5 \text{ kg/m}^2$, všechny osoby byly nekuřáci a fyzicky středně aktivní. Součástí studie bylo určení reprodukovatelnosti vyšetření (určeno pomocí 5 osob v IKEM a 5 osob v CEMR) a kalibrace odporu ergometru v CEMR. U vyšetřovaných osob byla změřena i maximální vynutitelná síla, na jejímž základě bylo určeno, že použitý odpor 1,2 bar odpovídá $15 \pm 5 \%$ MVF, respektive 1,8 bar = $24 \pm 8 \%$ MVF a 2,4 bar = $32 \pm 11\%$ MVF. Výsledky byly shrnuty v publikaci (Šedivý P. et al., 2015).

5.1.1.1 Reprodukovatelnost zátěžové ^{31}P MRS

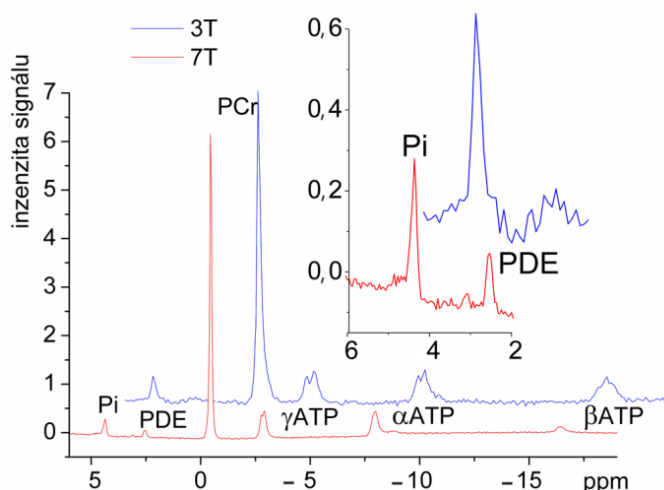
Pro hodnocení reprodukovatelnosti byl použit Test–retest (výpočet koeficientů variace a intra-class korelačních koeficientů). Pro zátěž 7 kg a 10,5 kg jsou výsledky CV a ICC uvedeny v Tab. č. 4.

Tab. č. 4. Koeficienty variace (CV) a intra-class korelační koeficienty (ICC) pro vybrané parametry ($[PCr]_{\text{klid}}$ – klidová koncentrace PCr, ΔPCr – pokles PCr, τ_{PCr} – recovery čas PCr, pH_{cv} – pH na konci zátěže, V_{PCr} – počáteční rychlost tvorby PCr, Q_{max} – mitochondriální kapacita) zátěžové ^{31}P MRS u vyšetření provedených v IKEM a v CEMR při 3 T a 7 T poli.

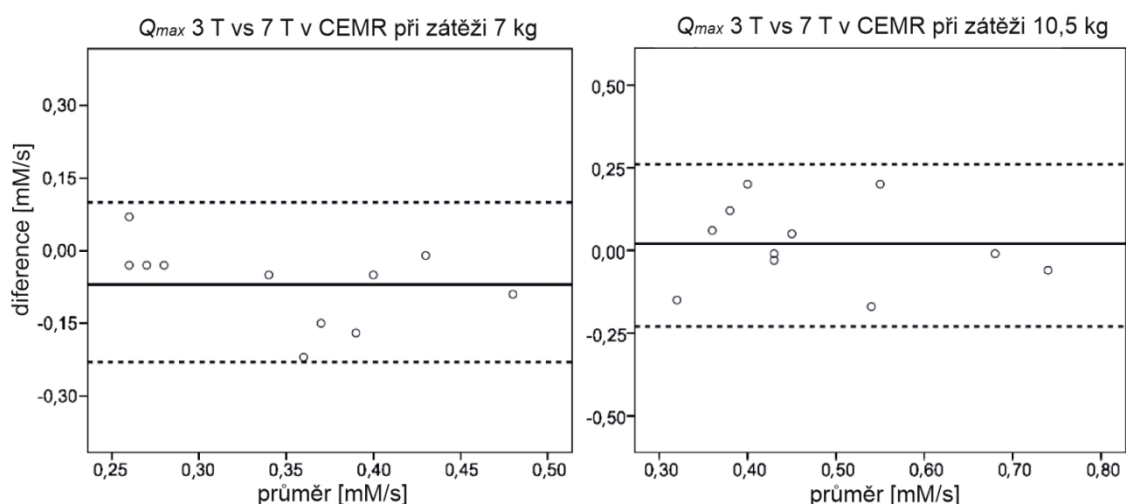
CV [%]	B_0	zátěž	$[PCr]_{\text{klid}}$	ΔPCr	τ_{PCr}	pH_{cv}	V_{PCr}	Q_{max}
IKEM	3 T	7 kg	1,9	9	6,1	0,3	8,6	6,5
IKEM	3 T	10,5 kg	6	13,3	6,1	0,1	6,9	6,1
CEMR	3 T	~7 kg	2,8	14,5	9	0,1	17,8	13,2
CEMR	3 T	~10,5 kg	1,1	6,6	9,6	0,1	10,8	10,3
CEMR	7 T	~7 kg	1,7	15,4	7,6	0,1	16,5	12,4
CEMR	7 T	~10,5 kg	4,7	16,1	7,9	0,2	12,5	8,3
$ICC_{2,1}$	B_0	zátěž	$[PCr]_{\text{klid}}$	ΔPCr	τ_{PCr}	pH_{cv}	V_{PCr}	Q_{max}
IKEM	3 T	7 kg	0,95	0,94	0,98	0,79	0,94	0,94
IKEM	3 T	10,5 kg	0,82	0,94	0,96	0,93	0,99	0,97
CEMR	3 T	~7 kg	0,95	0,83	0,80	0,78	0,89	0,92
CEMR	3 T	~10,5 kg	0,97	0,99	0,83	0,98	0,97	0,94
CEMR	7 T	~7 kg	0,98	0,95	0,81	0,96	0,92	0,88
CEMR	7 T	~10,5 kg	0,95	0,85	0,96	0,88	0,90	0,91

5.1.1.2 Vliv velikosti magnetického pole na parametry zátěžové ^{31}P MRS

Použití vyššího magnetického pole (7 T vůči 3 T) se projevilo navýšením poměru signálu vůči šumu (SNR), jak je patrné z Obr. č. 10. U PCr vzrostl SNR z 270 ± 40 na 660 ± 50 . Nárůst SNR u PCr následně způsobil zvýšení jeho přesnosti fitování v jMRUI (Cramer-Rao dolní mez (CRLB) PCr: $1,06 \% \pm 0,44 \%$ na 7 T vs $1,22 \% \pm 0,38 \%$ na 3 T). Vyšší SNR zlepšil i přesnost fitování exponenciálou pro hodnoty PCr v regenerační periodě (adjustované $R = 0,962 \pm 0,049$ na 7 T vs $0,828 \pm 0,135$ na 3 T). Porovnání Q_{max} pomocí Bland-Altmanových grafů je ukázáno na Obr. č. 11, hodnoty ostatních parametrů jsou uvedeny v Tab. č. 4.



Obr. č. 10. Porovnání ^{31}P MR spektra lýtkového svalu měřeného při 3 T a 7 T stejnou nelokalizovanou sekvencí FID a cívkou se stejným poloměrem a konstrukcí. Nárůst SNR je zřejmý zejména ve zvětšeném detailu spektra mezi 6 a 2 ppm. Signál βATP je na 7 T zmenšený, protože SAR limity nedovolují nastavení dostatečného frekvenčního rozsahu sklápěcího pulzu, který by pokryl všechny signály v ^{31}P MR spektru.



Obr. č. 11. Bland–Altmanovy grafy mitochondriální kapacity vytvořené z hodnot vyšetření provedených v CEMR na 3 T a 7 T tomografu při dvou různých zátěžích.

Tab. č. 5. Průměrné vypočítané parametry zátěžové ^{31}P MRS z vyšetření provedených v CEMR na 3 T a 7 T tomografech při třech různých zátěžích.

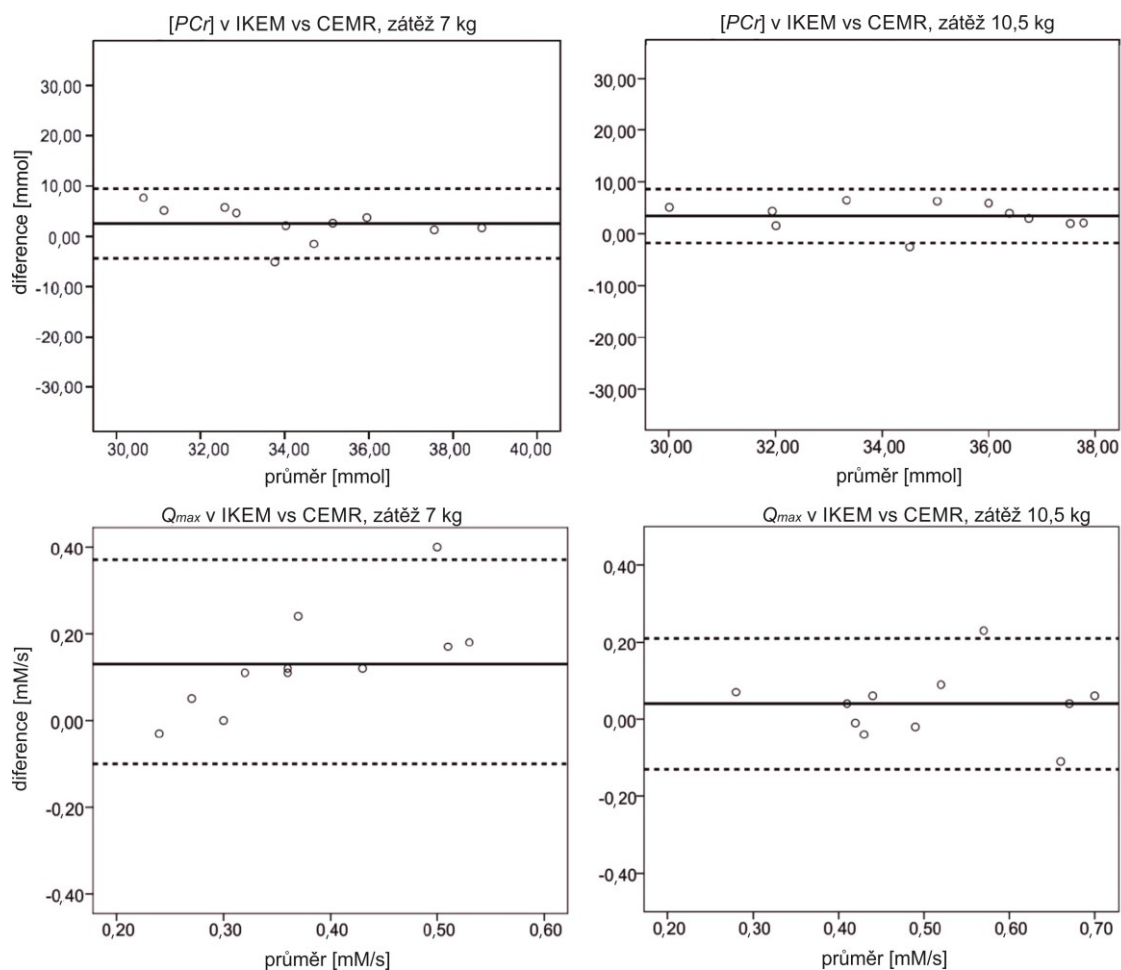
zátěž	7 kg (1,2 bar)		10 kg (1,8 bar)		14 kg (2,4 bar)	
	3 T	7 T	3 T	7 T	3 T	7 T
B_0	3 T	7 T	3 T	7 T	3 T	7 T
$[\text{PCr}]_{\text{kld}}$ [mM]	$33,0 \pm 3,8$	$32,5 \pm 3,6$	$33,0 \pm 3,2$	$32,5 \pm 3,8$	$32,2 \pm 3,4$	$31,2 \pm 3,1$
ΔPCr [%]	12 ± 5	12 ± 3	22 ± 10	20 ± 8	31 ± 14	28 ± 13
τ_{PCr} [s]	31 ± 7	33 ± 4	31 ± 6	31 ± 6	31 ± 10	31 ± 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_{cv}	$7,08 \pm 0,01$	$7,07 \pm 0,02$	$7,05 \pm 0,04$	$7,05 \pm 0,03$	$7,04 \pm 0,04$	$7,05 \pm 0,03$

5.1.1.3 Vliv cívky a různé konstrukce ergometru na parametry zátěžové ^{31}P MRS

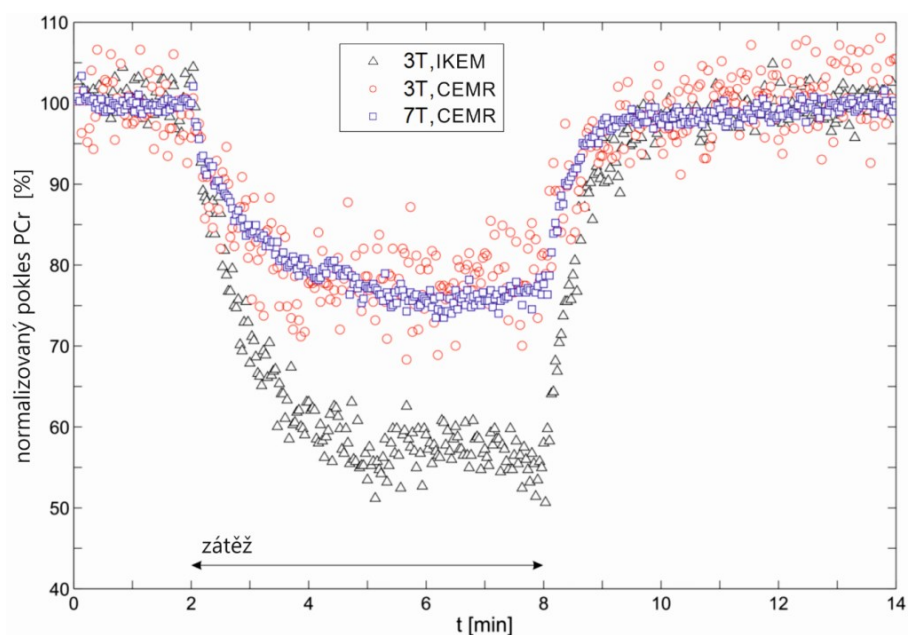
Hodnoty vypočítaných metabolických parametrů z vyšetření provedených na 3 T MR tomografech v IKEM a v CEMR jsou uvedeny v Tab. č. 6. Bland–Altmanovy grafy Q_{max} a klidové koncentrace PCr jsou zobrazeny na Obr. č. 12. Kvalitativní ukázka typicky naměřených závislostí PCr z CEMR a IKEM je na Obr. č. 13. Jak z uvedené tabulky, tak i z Bland–Altmanových grafů PCr je patrné, že vypočítaná koncentrace PCr v Praze je přibližně o 10 % větší než v CEMR. Pro vysvětlení bylo provedeno hodnocení detekčního objemu cívky pomocí koregistrace hodnot PCr z ^{31}P 3D CSI s anatomickým ^1H MRI v Matlabu, viz Obr. č. 14. Relativní příspěvky k celkovému signálu z jednotlivých svalů jsou zaznamenány v Tab. č. 7.

Tab. č. 6. Průměrné vypočítané parametry zátěžové ^{31}P MRS z vyšetření provedených v IKEM a v CEMR při 3 T s dvěma různými zátěžemi.

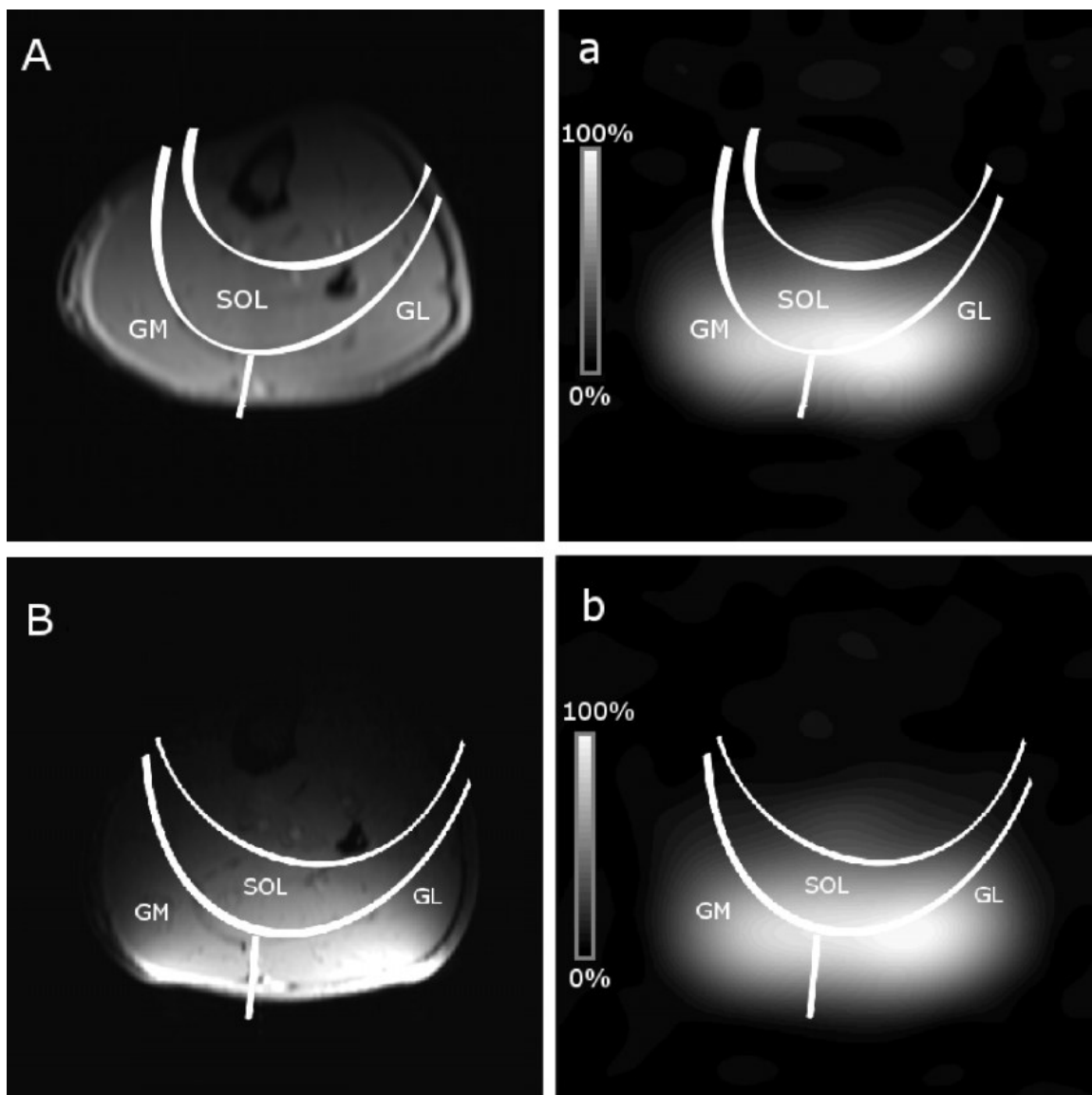
zátěž	7 kg (1,2 bar)		10,5 kg (1,8 bar)	
	IKEM	CEMR	IKEM	CEMR
$[\text{PCr}]_{\text{klid}}$ [mM]	$35,5 \pm 2,7$	$33,0 \pm 3,8$	$36,7 \pm 2,7$	$33,0 \pm 3,2$
ΔPCr [%]	20 ± 14	12 ± 5	33 ± 15	22 ± 10
τ_{PCr} [s]	34 ± 7	31 ± 7	41 ± 9	31 ± 6
V_{PCr} [mM/s]	$0,21 \pm 0,12$	$0,13 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,13$	$0,24 \pm 0,11$
Q_{max} [mM/s]	$0,45 \pm 0,16$	$0,31 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,15$	$0,49 \pm 0,15$
pH_{cv}	$7,04 \pm 0,04$	$7,08 \pm 0,01$	$7,02 \pm 0,04$	$7,05 \pm 0,04$



Obr. č. 12. Bland–Altmanovy grafy Q_{max} a klidové koncentrace PCr [PCr] vytvořené z hodnot vyšetření provedených v IKEM a v CEMR na 3T MR tomografu při dvou různých zátěžích (7 a 10,5 kg).



Obr. č. 13. Graf PCr ze zátěže 10,5 kg (tj. 1,8 bar) u jedné vybrané osoby z vyšetření provedených na 3 T a 7 T MR tomografu v CEMR (komerční ergometr) a na 3 T tomografu v IKEM (ergometr domácí výroby).



Obr. č. 14. Transverzální ^1H a ^{31}P MR obrázky lýtkového svalu.

A, B - transverzální ^1H MR obrázky lýtkového svalu naměřené pomocí dvou duálních $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ MR cívek v Praze a v CEMR s manuálně zhotovenou segmentací svalů GM (m. gastrocnemius medialis), GL (m. gastrocnemius lateralis) a SOL (m. soleus).

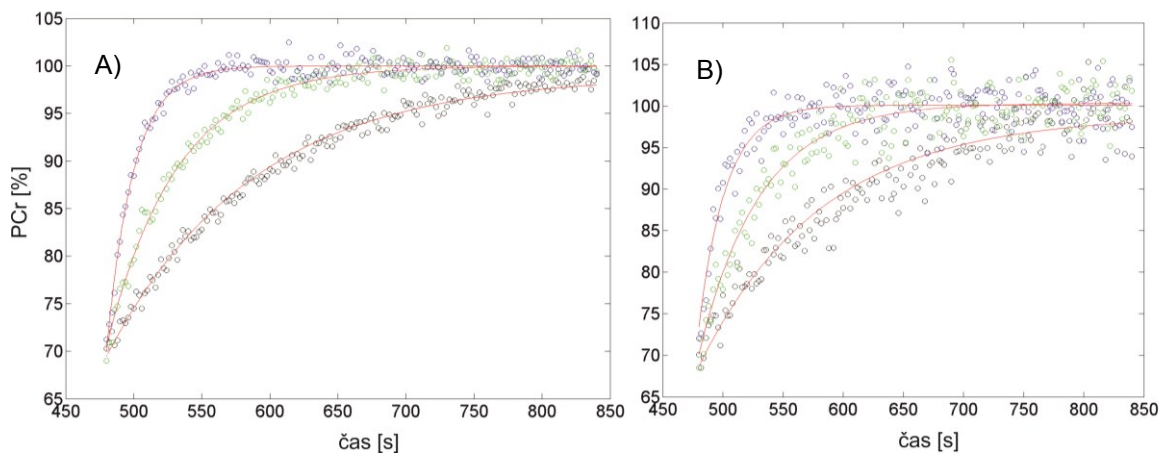
a,b - velikost signálu PCr následně změřená těmito cívkami pomocí 3D CSI v IKEM a v CEMR.

Tab. č. 7. Podíl signálu PCr (M) z vybraného svalu vůči celkové sumě signálu PCr (S).

cívka	flexi cívka (Ø 11 cm) - IKEM			rigidní cívka (Ø 10 cm) - CEMR		
	gastroc. lateralis	gastroc. medialis	soleus	gastroc. lateralis	gastroc. medialis	soleus
M/S [%]	22,6 ± 5,2	27,6 ± 8,8	27,8 ± 7,2	25,0 ± 8,0	23,2 ± 7,1	26,2 ± 2,5

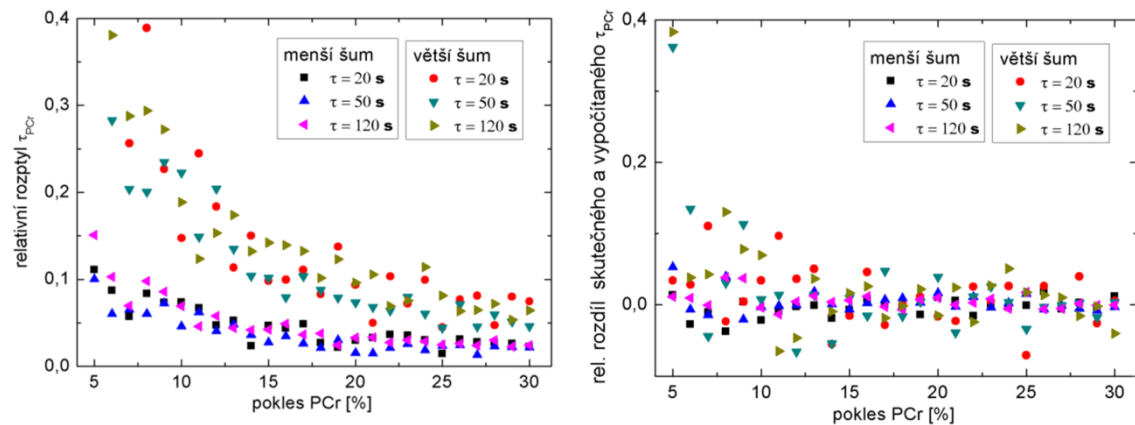
5.1.2 Simulace vlivu parametrů vyšetření na přesnost určení PCr recovery konstanty.

Byly provedeny Monte Carlo simulace (pro každou variantu 20 simulovaných křivek) pro tři různé $\tau_{PCr} = 20, 50, 100$ s a se dvěma kombinacemi velikosti šumu. V druhé kombinaci je šum 3x větší než v první, šum je generován pseudonáhodně s Gaussovým rozdělením, viz Obr. č. 15. Výsledné hodnoty relativního rozptylu a relativní skutečné chyby jsou zobrazeny na Obr. č. 16. Dále byla provedena simulace kombinovaného vlivu frekvence vzorkování a poklesu PCr. Zde se použilo pro každou kombinaci parametrů 50 simulovaných křivek, šum byl zvolen dvojnásobný než v první simulaci. Výsledky těchto simulací jsou znázorněny na Obr. č. 17.

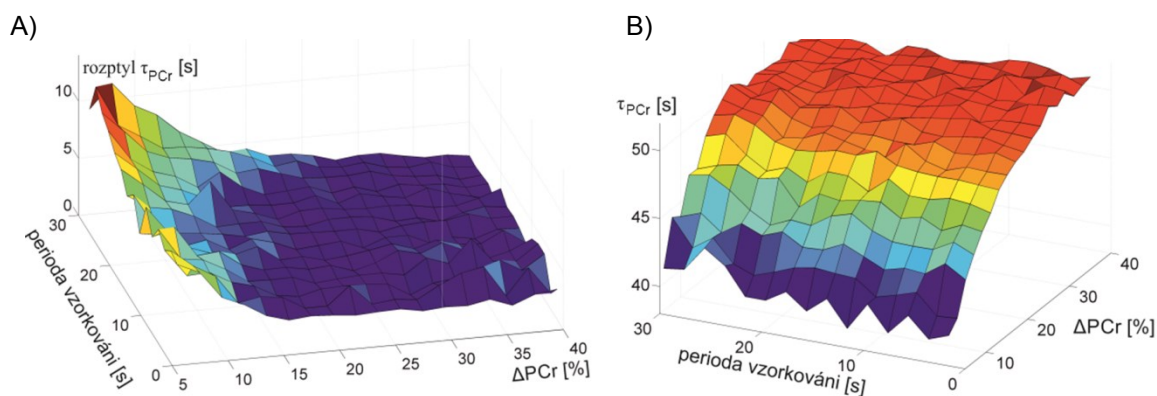


Obr. č. 15. Simulované závislosti PCr v regenerační periodě.

A) simulované hodnoty PCr v regenerační periodě pro $\tau_{PCr} = 20$ s (modré body), 50 s (zelené body) a 120 s (černé body) s menším šumem; B) simulace pro stejné hodnoty τ_{PCr} (20, 50 a 120 s) s nastaveným trojnásobným šumem.



Obr. č. 16. Grafy relativního rozptylu τ_{PCr} a relativního rozdílu skutečné a vypočítané hodnoty τ_{PCr} v závislosti na poklesu PCr a velikosti šumu.

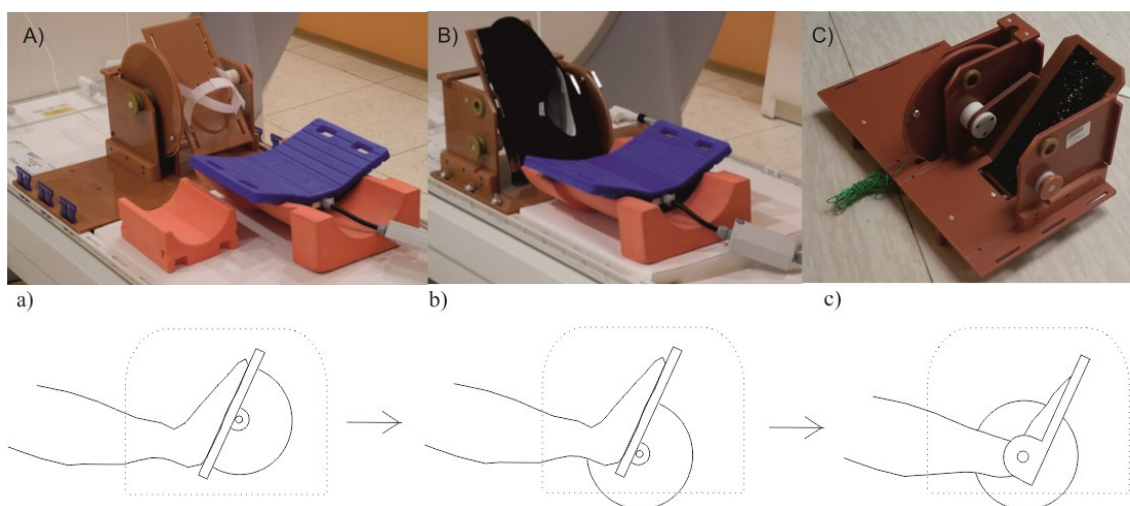


Obr. č. 17. Grafy rozptylu τ_{PCr} a průměrné vypočítané hodnoty τ_{PCr} .
 A) 3D graf rozptylu τ_{PCr} (pro $\tau_{PCr} = 50$ s) v závislosti na poklesu PCr (ΔPCr) a periodě vzorkování; B) 3D graf průměrných hodnot τ_{PCr} v závislosti na poklesu PCr (ΔPCr) a periodě vzorkování.

5.1.3 Technické úpravy ergometru a další zdokonalení experimentálního vybavení pro zátěžovou ^{31}P MRS provedené v rámci dizertační práce

Jedním z výsledků dizertační práce jsou navržené a následně řemeslníkem provedené technické úpravy zařízení pro měření zátěžové ^{31}P MRS.

Ergometr prošel celkem dvěma rekonstrukcemi, obě se týkaly změny polohy a konstrukce jeho šlapky. První rekonstrukce se skládala z posunutí osy rotace šlapky pod patu nohy, viz Obr. č. 18.

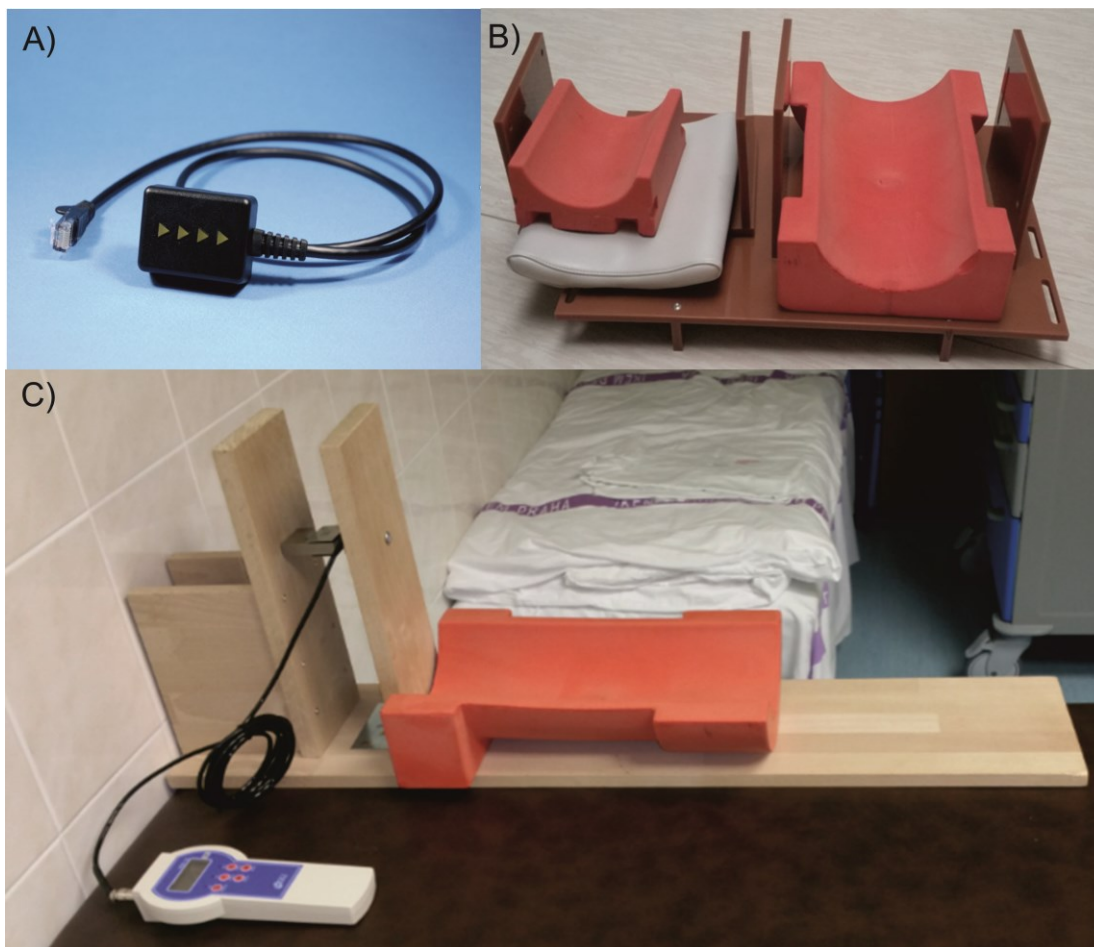


Obr. č. 18. Jednotlivé konstrukční verze šlapadla mechanického MR ergometru v IKEM.

A), B) a C) fotografie jednotlivých verzí šlapadla a k nim odpovídající technické znázornění jejich konstrukce - a), b) a c). U šlapadel se měnila zejména pozice osy rotace pedálu.

Tato změna byla navržena tak, aby se pohyb na ergometru stal více pohodlný a sešlapování nezpůsobovalo významné pohybové artefakty. Navíc bylo zlepšeno i fixování nohy ke šlapce pomocí diabetické obuvi. Upevnění boty ke šlapce je realizováno suchým zipem a do bot se používají návleky.

Se zmíněnými inovacemi proběhlo srovnání s komerčním ergometrem, který mají zakoupený na magnetické rezonanci v CEMR. Při srovnání dat (viz Obr. č. 13) je patrné, že pohyb na ergometru v IKEM nezpůsobuje významně větší pohybové artefakty než pohyb na CEMR ergometru. Ačkoliv lze výsledek považovat za uspokojivý, stále bylo sešlapování na ergometru v IKEM pocitově méně pohodlné a pozice osy rotace pod šlapkou nutila osoby vykonávat při sešlapování komplexnější pohyb, než je pouhý ohyb nohy v kotníku (část osob si pomáhala při sešlapování pohybem celé dolní končetiny). Z těchto důvodů bylo navrženo upevnění lýtka a kolene (Obr. č. 19B) pomocí konstrukce, kterou se noha z boku a shora pevně fixuje. Zároveň došlo ke druhé konstrukční změně šlapky ergometru. Pro změnu konstrukce šlapky byly využity zkušenosti z měření s komerčním ergometrem v CEMR. Zde je šlapka konstrukčně realizována tak, že osa její rotace je umístěna přímo do středu kotníku (viz Obr. č. 8), čímž je flexe zcela přirozená a šlapka si nevynucuje žádný dodatečný pohyb končetiny. Pro ergometr v IKEM to znamenalo poměrně velkou konstrukční změnu, protože šlapka musela být zcela přestavěna a celá konstrukce ergometru se musela dodatečně zpevnit. Po úpravách se stal pohyb na ergometru velmi plynulý a pohodlný.



Obr. č. 19. Další vyvinuté technické vybavení.

A) fotografie optické signalizace, B) fotografie konstrukce na upevnění končetiny, C) fotografie dynamometru domácí konstrukce (digitální měřič a tenzometrické čidlo jsou komerční produkty).

Vyjma konstrukce ergometru bylo zlepšeno i trigrování zátěže, kde se využil systém, který byl pracovníky IKEM vyvíjen pro interakci s pacienty během fMRI studií. V případě zátěžové ^{31}P MRS systém automaticky signalizuje (bliknutí 4 diod, viz Obr. č. 19A) k sešlápnutí pedálu podle běhu sekvence a nastaveného schématu cvičení. Optická signalizace usnadnila vyšetření zejména starších pacientů, kteří disponují špatným sluchem (dříve zahajovali pacienti sešlapování na ústní pokyn a frekvenci sešlapování udržovali podle zvuku jednotlivých akvizic).

Posledním vylepšením zařízení pro zátěžovou ^{31}P MRS byla konstrukce dynamometru (Obr. č. 19C) na určení maximální síly, kterou jsou pacienti schopni vyvinout. Siloměr není MR kompatibilní a používá se v jiné místnosti než je MR tomograf.

5.1.4 Vyvinutý software

Důležitou součástí dizertační práce byl vývoj softwaru pro zpracování MR dat získaných ze svalové tkáně během a po svalové zátěži.

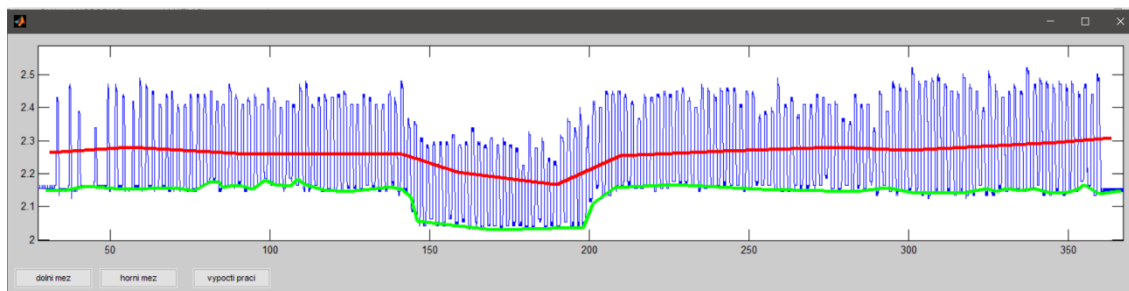
5.1.4.1 Software pro zpracování ^{31}P MRS

Pro vyhodnocení zátěžové ^{31}P MRS byl vyvinut program na zpracování integrálních hodnot z programu jMRUI, který slouží k výpočtu důležitých klinických parametrů týkajících se zejména oxidativního metabolismu svalu. Dva další menší programy, které vznikly již v rámci řešení diplomové práce autora dizertační práce, byly vylepšeny a přeprogramovány ze skriptovacího jazyka PHP (Hypertext PreProcessor) do jazyka softwaru Matlab. Poslední program vyvinutý k zátěžové ^{31}P MRS se týkal Monte Carlo simulací PCr regenerační křivky a slouží k odhadnutí teoretické přesnosti, jaké lze dosáhnout s danými parametry protokolu.

První přeprogramovaný program umožňuje automatické konzistentní přejmenování souboru v adresáři tak, aby program jMRUI načtl jednotlivá spektra v pořadí podle časové posloupnosti měření. Program byl vylepšen oproti verzi v PHP o čtení času akvizice, který se nenačítá z názvu souboru, ale přímo z DICOM tagu jednotlivých IMA souborů, což je mírně pomalejší postup, ale je zcela nezávislý na původním pojmenování souborů, které se může měnit mezi verzemi softwaru tomografu nebo dalšího přejmenováním souborů v databázi instituce.

Druhý přeprogramovaný program umožňuje určit celkovou práci, kterou subjekty vykonaly během zátěžové ^{31}P MRS, což je důležitá informace pro hodnocení poklesu PCr a pH mezi jednotlivými pacienty. V řadě případů uvádějí autoři vědeckých publikací pouze odpor pedálu, ale v případě ergometru v IKEM je tato informace nedostatečná, protože pacienti si vždy do jisté míry přizpůsobí velikost sešlápnutí svým fyzickým možnostem a celkové pohyblivosti nohy v kotníku. Přeprogramovaný program zpracovává textový soubor, ve kterém je uložen záznam napětí z potenciometru, jež odpovídá poloze závaží. Oproti původní verzi program v Matlabu dokáže automaticky zpracovat celou složku s mnoha záznamy zátěže a výsledek uložit do TXT souboru. Navíc byla vylepšena i poloautomatická rutina. V původní verzi se v poloautomatické rutině přes html formulář zadávaly dvě přímky. První přímka sloužila jako základní čára a druhá přímka jako startovací mez pro hledání maxima píku, respektive nejvyšší polohy závaží. Tento postup byl v Matlabu nahrazen

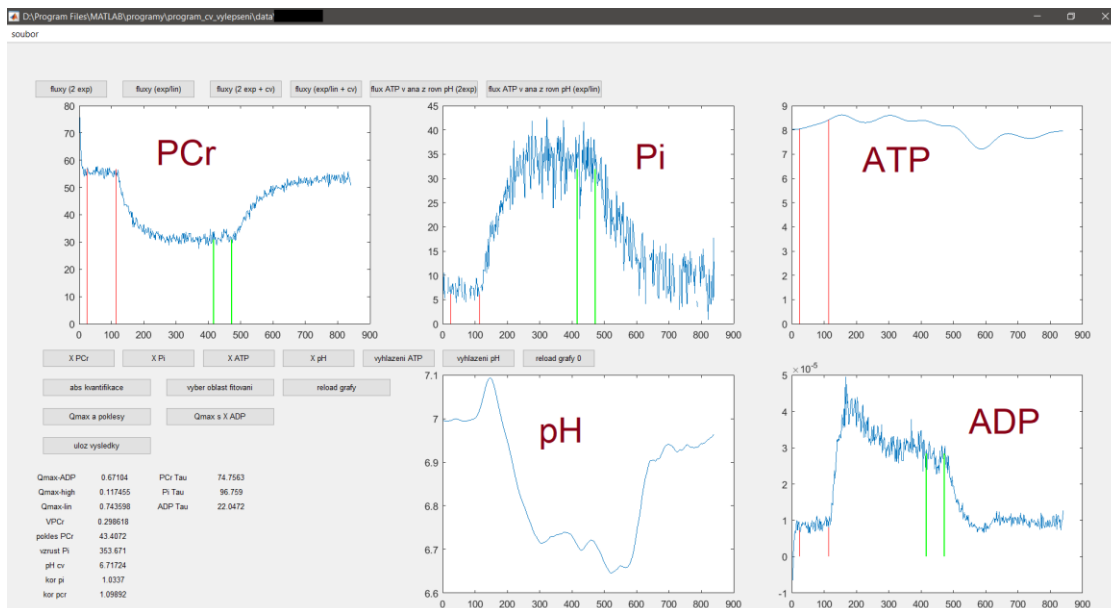
programem s GUI rozhraním, kde je možnost definování několikanásobné lomené čáry pomocí pohodlného klikání myši do zobrazovaného grafu dat (viz Obr. č. 20).



Obr. č. 20. Ukázka okna programu pro zpracování signálu z potenciometru pro výpočet vykonané práce.

Zcela novým vyvinutým programem s GUI rozhraním je program pro zpracování integrálních hodnot fosforových signálů získaných programem jMRUI (pojmenován SEIP1). Program SEIP1 umožňuje načtení TXT souboru získaného z modulu AMARES (jMRUI) pomocí tlačítkového výběru z konkrétní složky. Načítají se integrální hodnoty fosforových signálů z klidového ^{31}P MR spektra pro určení korekčních faktorů saturace pro zátěžové měření a integrální hodnoty fosforových metabolitů a jejich chemické posuny ze zátěžové části vyšetření. Programu je nutné kromě TXT souborů zadat pouze repetiční čas měření.

Program SEIP1 provede pseudokvantifikaci jednotlivých signálů podle signálu βATP , zobrazí grafy PCr, Pi, pH, ATP, ADP (Obr. č. 21). pH se vypočítá z chemického posunu mezi signálem PCr a Pi, při štěpení signálu Pi nabídne program časovou osu pro výběr časového úseku, kdy se má uvažovat druhý „kyselejší“ signál Pi.



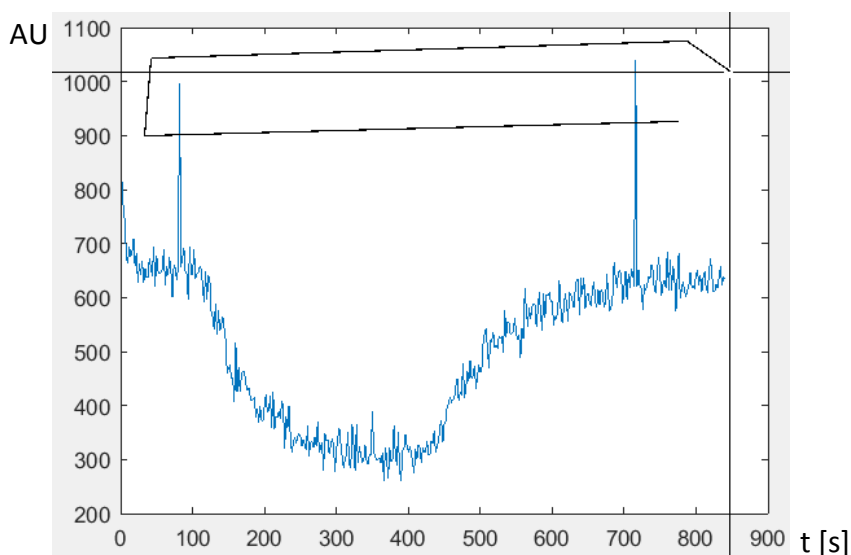
Obr. č. 21. Ukázka GUI rozhraní programu SEIP1 pro zpracování zátěžové ^{31}P MRS. Jednotlivé grafy ukazují průběhy absolutních koncentrací vybraných metabolitů v mM/l a pH na čase (grafy po normalizaci). Signál ATP a pH byl v programu už vyhlazen. Vyhodnocení jednoho pacienta s kvalitním záznamem ^{31}P MRS lze v programu provést do jedné minuty, program však zejména velmi zrychluje zpracování subjektů s horší kvalitou dat.

V programu SEIP1 lze provést inspekci dat, pokud některé hodnoty jsou evidentně nesmyslné (např. řádový rozdíl integrální hodnoty z důvodu špatně fitovaného spektra v jMRUI). Hodnota se odstraní buď automaticky, nebo manuálně klikáním do příslušného grafu, viz Obr. č. 22. Hodnoty pH a ATP lze dle potřeby vyhladit. Po inspekci dat se definují meze (opět klikáním do grafu), odkud budou počítány poklesy PCr, pH a vzrůst Pi, ADP (nutné provést manuálně, protože někteří pacienti začnou omylem cvičit dříve nebo nezvládnou cvičit celou dobu).

Předposledním krokem je provedení fitování PCr, Pi a ADP, kdy se musí v grafu PCr vyznačit meze, v kterých se má PCr, Pi a ADP fitovat exponenciální funkcí. Po vyznačení mezí se provede automatický fit a zobrazí se okno s rezidui fitování. Pokud je fit věrohodný, zmáčkne operátor programu poslední tlačítko, které slouží k výpočtu mitochondriální kapacity. Tím je hotové základní zpracování ^{31}P MRS vyšetření, ve kterém byly určeny následující parametry: průměrné hodnoty PCr, Pi, ATP, ADP, AMP, pH a G_{ATP} před a na konci zátěže, hodnoty recovery konstant τ_{PCr} , τ_{Pi} , τ_{ADP} , V_{PCr} a Q_{max} (podle lineárního modelu, podle modelu kinetiky prvního a druhého řádu a podle modelu s fosfátovým potenciálem, viz rovnice (43), (44), (45) a (48)).

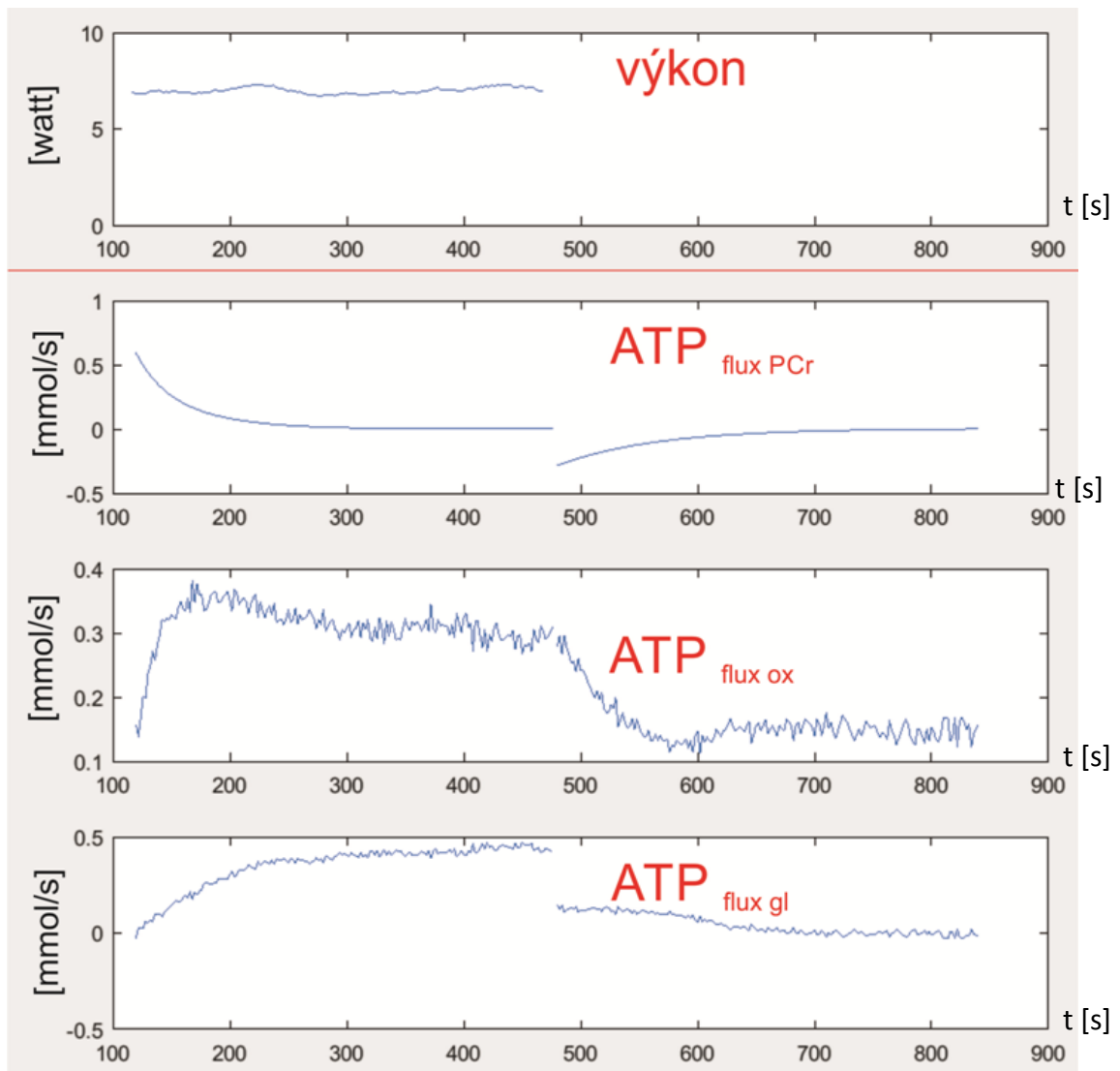
Všechny vypočítané parametry je možné uložit do TXT souboru opět přes tlačítkový výběr.

Jestliže naměřená ^{31}P MRS data mají dobrou kvalitu (zejména dostatečný pokles PCr s exponenciálním průběhem poklesu a návratu hodnot během a po fyzické zátěži), lze v programu pokračovat ve vyhodnocení, které umožňuje vypočítat jednotlivé příspěvky tvorby ATP skrze kreatin-kinázovou reakci, oxidativní fosforylaci a anaerobní glykolýzu. Pro výpočet obrátu ATP v kreatin-kinázové reakci (viz rovnice (22)) program proloží závislost PCr během zátěže biexponenciální či jednodušší monoexponenciální křivkou s lineárním členem. $ATP_{flux\ ox}$ je vypočítán pomocí vztahu (26). $ATP_{flux\ gl}$ je buď dopočítán na základě zákona zachování ATP nebo H^+ (viz oddíl 3.2.4.1). Při výpočtu na základě zákona zachování tvorby a spotřeby ATP program využívá i záznam zátěže pro odhad aktuální spotřeby ATP dané okamžitým cvičebním výkonem. Aktuální výkon je porovnáván s výkonem a spotřebou ATP na počátku zátěže. Pro výpočet $ATP_{flux\ gl}$ z rovnováhy H^+ program propočítává i pufrovací konstantu svalové tkáně (z počátečního vzrůstu pH a poklesu PCr) a H_{efflux} ze svalu daný změnou jeho pH. Ukázka grafu výkonu, $ATP_{flux\ PCr}$, $ATP_{flux\ ox}$ a $ATP_{flux\ gl}$ vypočítaného ze zákona zachování ATP je na Obr. č. 23.



Obr. č. 22. Odstranění špatně nařazených hodnot PCr

Do grafu se pomocí počítačové myši nakliká mnohoúhelník, který ohraničuje nesmyslné hodnoty. Špatné hodnoty jsou pak odstraněny z dalšího zpracování a graf je znova překreslen bez nich. Postup lze vícekrát opakovat u každého grafu.



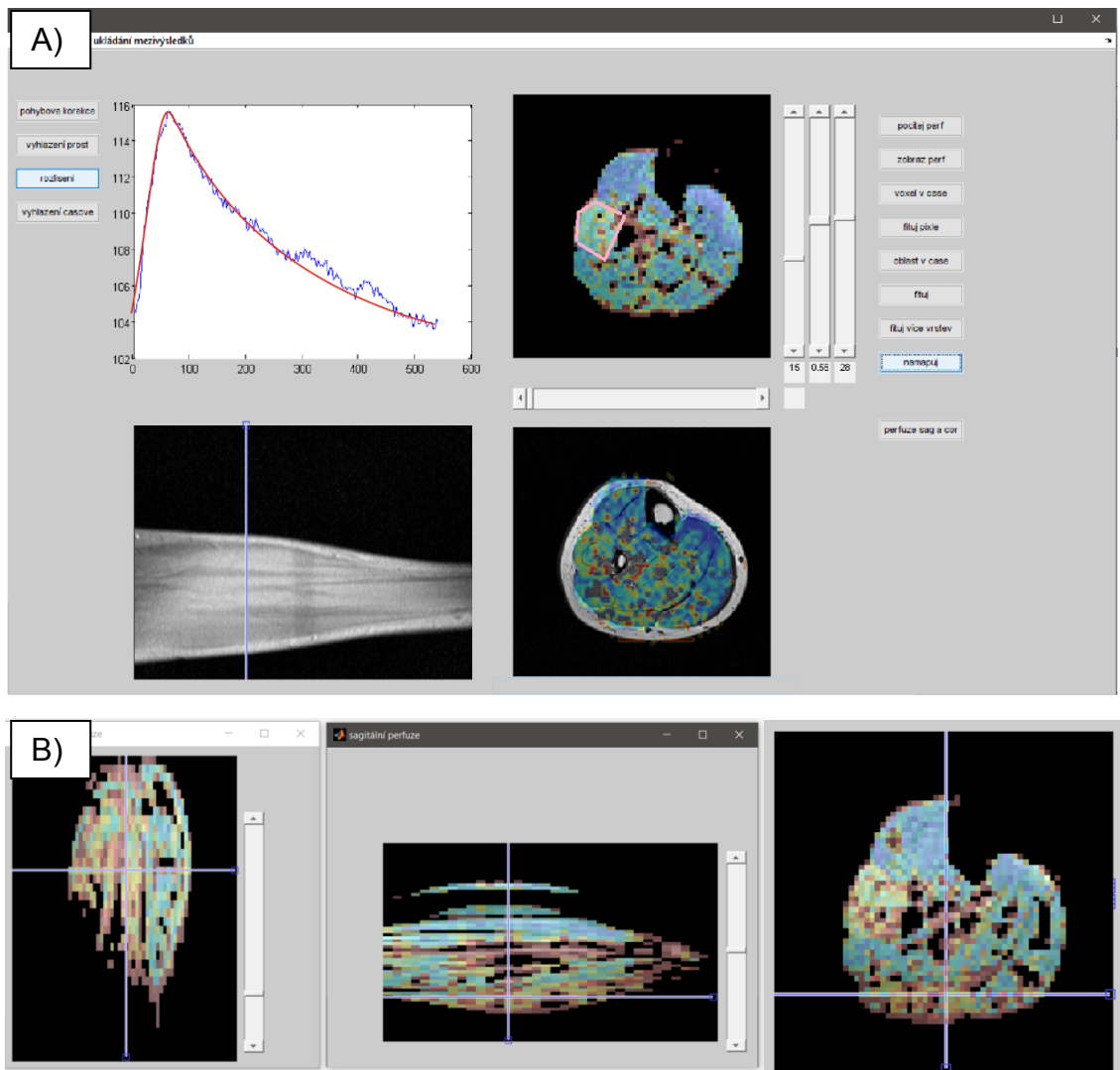
Obr. č. 23. Ukázka GUI okna z programu SEIP1 s vygenerovaným grafem okamžitého výkonu a grafy $ATP_{flux\ PCr}$, $ATP_{flux\ ox}$ a $ATP_{flux\ gl}$ vypočteného ze zákona zachování ATP. Všechny čtyři grafy jsou pokračováním vyhodnocení subjektu z Obr. č. 14. Záporná hodnota $ATP_{flux\ PCr}$ znamená resyntézu PCr z ATP po skončení zátěže. $ATP_{flux\ gl}$ po skončení okamžitě výrazně poklesne k nule, což odpovídá tvrzení, že v regenerační periodě anaerobní glykolýza nepřispívá k tvorbě ATP. Zcela správně by se měla obdržet úplná nulová závislost, ale $ATP_{flux\ gl}$ je vypočítán na některých pouze přibližných předpokladech (stejná bazální spotřeba ATP svalem před, během a po zátěži a stejná účinnost svalové kontrakce pro různé intenzity šlapání) a závisí i na správnosti $ATP_{flux\ ox}$, která se odvíjí od dříve vypočítané hodnoty Q_{max} . Přes tyto zmíněné nedostatky je mnohem spolehlivější výpočet $ATP_{flux\ gl}$ z rovnováhy ATP než z rovnováhy pH.

5.1.4.2 Program na zpracování ^1H MR obrazu po vykonané zátěži

Program slouží k vyhodnocení změn intenzity obrazu ze sekvence EPI, která je měřena po skončení delší fyzické zátěže. Program má GUI rozhraní, v kterém se načte transverzální EPI sekvence. Výběrově lze načíst i další sagitální, koronální a transverzální řezy s vyšším rozlišením pro koregistraci obrazu s EPI sekvencí.

Po načtení sekvence EPI je možné provést pohybové korekce (pro dva směry), průměrování voxelu nebo jiné časové či prostorové vyhlazení EPI dat (na výběr je několik typů filtrů). Po zmíněných operacích lze data s úpravami uložit a později zase načíst nebo pokračovat ve vyhodnocování výpočtem map, jež zobrazují barevnou škálu oblasti, kde došlo k největším změnám signálu. Hodnotí se celková maximální změna intenzity signálu v daném voxelu obrazu. Mapy se překrývají s EPI obrazy, lze zde měnit průsvit překryvu a také maximální hodnotu barevné škály, která odpovídá určité změně intenzity obrazu. Změna maximální hodnoty barevné škály slouží na odfiltrování velkých změn intenzit obrazu způsobených artefakty nebo cévami. Barevné mapy je možno zobrazit i v sagitálních a koronálních řezech nebo je přímo přeložit na transverzální MR obrazy s větším rozlišením (viz Obr. č. 24). Mimo kvalitativní hodnocení lze data vyhodnocovat i kvantitativně.

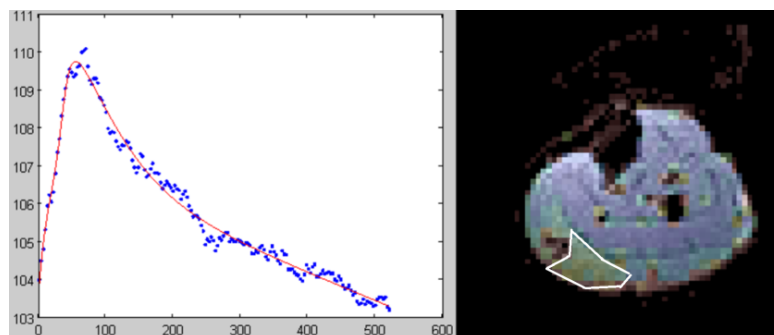
Kvantitativní hodnocení se skládá z manuálního segmentování oblasti, ve které barevná mapa udává velkou změnu intenzity signálu, nebo se vybere konkrétní sval, u kterého je předpokládán podíl na zátěži. Po manuálním označení oblasti se zobrazí křivka vývoje intenzity obrazu ve vybrané oblasti. Fitování křivky (vztahem (54)) se automaticky provede v dalších čtyřech nejbližších vrstvách. Výsledné parametry fitování lze pak uložit do textového souboru.



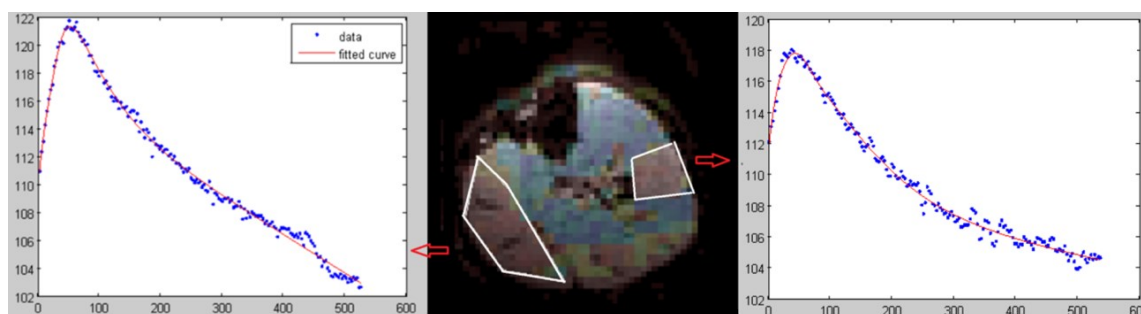
Obr. č. 24. Ukázka GUI rozhraní programu pro zpracování zátěžové ^{31}P MRS. A) graf změny intenzity obrazu z vybraného místa (m. peroneus longus, z vyznačené oblasti na transverzálním snímku). B) – koronální, sagitální a transverzální řez svalu z EPI sekvence s barevnou maskou vyjadřující místa, kde došlo k největším změnám signálu. Červené a žluté oblasti značí největší změnu signálu po proběhlé zátěži.

5.1.5 Zapojení svalů z ^1H MRI

Na základě vyhodnocení změn kontrastu svalové tkáně po proběhlé zátěži u dvou dobrovolníků, u kterých byla použita EPI sekvence optimalizována, bylo zjištěno, že největší podíl na sešlapování pedálu má sval m. gastrocnemius medialis (viz Obr. č. 25). Druhým svalem, který se podílí svou kontrakcí na sešlapování pedálu, je m. gastrocnemius lateralis (větší změna EPI signálu nalézána v jeho proximální části). Po přestavbě MR ergometru a pořízení fixace lýtka a kolene bylo během zátěže registrováno i zapojení m. peroneus longus s relativně podobným průběhem změny kontrastu svalové tkáně po zátěži jako v m. gastrocnemius medialis (viz Obr. č. 26).



Obr. č. 25. Zapojení m. gastrocnemius do flexe kotníku před přestavbou ergometru. Na transverzálním MR obrazu je bílou čarou ohraničena oblast z m. gastrocnemius (vybrána homogenní část bez cévy), z které je v grafu vynesena a nafitována časová závislost EPI signálu po provedené zátěži (fitování provedeno pomocí vztahu (54)). Zelené, žluté a červené odstíny značí místa, kde po proběhlé zátěži došlo ke změně kontrastu tkáně.



Obr. č. 26. Zapojení m. gastrocnemius a m. peroneus do flexe kotníku po přestavbě ergometru. Grafy odpovídají změně EPI signálu z dotyčných oblastí označených bílou křivkou na transverzálním MR obrazu lýtkového svalu.

5.2 *Klinické ³¹P MRS studie*

5.2.1 ³¹P MRS u pacientů s diabetem mellitus - vliv nefropatie a pohlaví

Pro hodnocení vlivu nefropatie a pohlaví na svalový metabolismus u DM1 byla vyšetřena skupina diabetických pacientů (19M/14Ž bez komplikací a 13M/5Ž s nefropatií) a zdravých kontrol (14M/12Ž). DM1 pacienti měli signifikantně zvýšený HbA1c oproti kontrolám, sérová hladina kreatinu byla zvýšena oproti kontrolám pouze u nefropatických DM1 pacientů. Podrobnější charakteristika pacientů je uvedena v publikaci (Sedivy P. et al., 2018).

DM1 pacienti a kontroly byli vyšetřeni klidovou a zátěžovou ³¹P MRS klinickým protokolem uvedeným v oddílu 4.3.1.1. Pomocí klidové ³¹P MRS byl zjištěn zejména pokles $\beta\text{ATP}/P_{\text{tot}}$ a nárůst Pi/P_{tot} a PDE/P_{tot} u nefropatických pacientů. Signifikantní rozdíl v klidových metabolických parametrech v závislosti na pohlaví byl zjištěn pouze u pH mezi zdravými kontrolami (zdravé ženy měly nižší klidové pH oproti zdravým mužům).

V zátěžové ³¹P MRS se rychlost resyntézy PCr se snižovala v pořadí skupin: kontroly > DM1 bez komplikací > nefropatických DM1. U pacientů byl nalezen také signifikantně větší pokles pH během zátěže než u kontrol. Po rozdělení osob podle pohlaví, trend v růstu τ_{PCr} zůstal dle závažnosti onemocnění, avšak jediné signifikantní změny byly nalezeny mezi koncovými hodnotami pH. Zdravé ženy měly menší hodnotu pH než zdraví muži, navíc i DM1 muži měli signifikantně menší pH než zmiňovaní zdraví muži.

Podrobnější přehled jednotlivých výsledných metabolických parametrů je uveden v publikaci (Sedivy P. et al., 2018), která je součástí příloh dizertační práce.

5.2.2 ³¹P MRS u pacientů s ischemií dolních končetin

5.2.2.1 Charakterizace závažnosti ischemie podle ³¹P MRS

Ve studii hodnocení efektu ischemie na svalový metabolismus podle ³¹P MRS bylo vyšetřeno 19 zdravých kontrol a 59 pacientů rozdělených podle závažnosti ischemie. Do metabolického porovnání ischemie byli zahrnuti pouze pacienti, kteří zvládli obě části vyšetření (20 pacientů s kritickou ischemií bylo vyřazeno z důvodu částečné amputace chodidla, omezené hybnosti v kotníku, velké klidové bolesti chodidla atd.).

Rozdělení vyšetřených subjektů:

- a) **CG skupina:** 19 zdravých kontrol, středně fyzicky aktivních, bez diabetu a přítomnosti symptomů ICHDK
- b) **PA skupina:** 16 pacientů bez diabetu s mírnou až střední ischemií bez klidové bolesti a defektů
- c) **DPA skupina:** 23 pacientů s diabetem a kritickou ischemií

Podrobnější charakterizace pacientů je uvedena v Tab. č. 8. a v (Sedivy P. et al., v tisku).

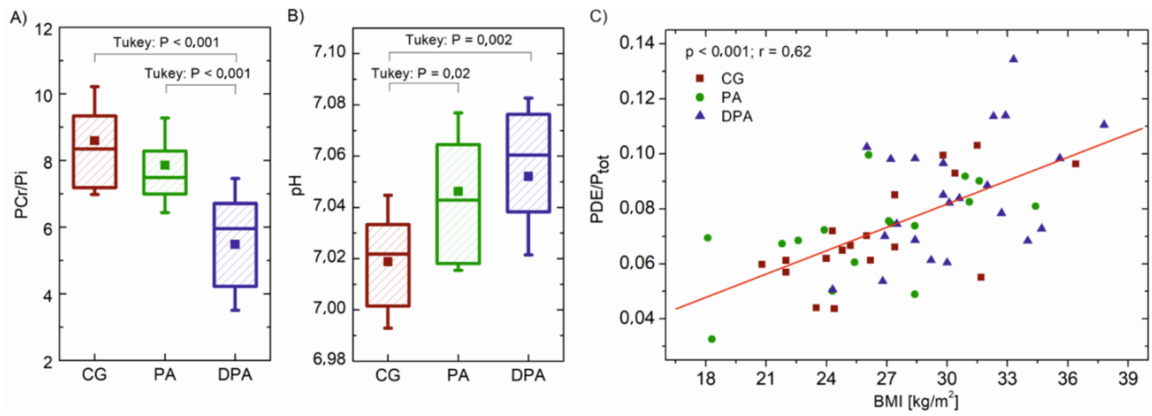
Tab. č. 8. Klinická charakterizace zdravých subjektů (CG), pacientů s mírnou až středně závažnou ischemií (PA) a pacientů s kritickou ischemií (DPA).

parametr	CG	PA	DPA
počet subjektů	19	16	23
věk	65±9	71±7	68±8
BMI [kg/m ²]	26.5±3.9	26.2±4.6	30.4±3.3
muži/ženy	11/8	10/6	21/2
Fontainova klasifikace	max I	IIa, IIb	IV
délka chůze na pásu [m]	∞	400±310	-
kotníkový index	-	0.58±0.17	-
TcpO ₂ [mmHg]	-	-	26±10
délka diabetu [roky]	0	0	19±14
DM1/DM2*	0/0	0/0	4/19

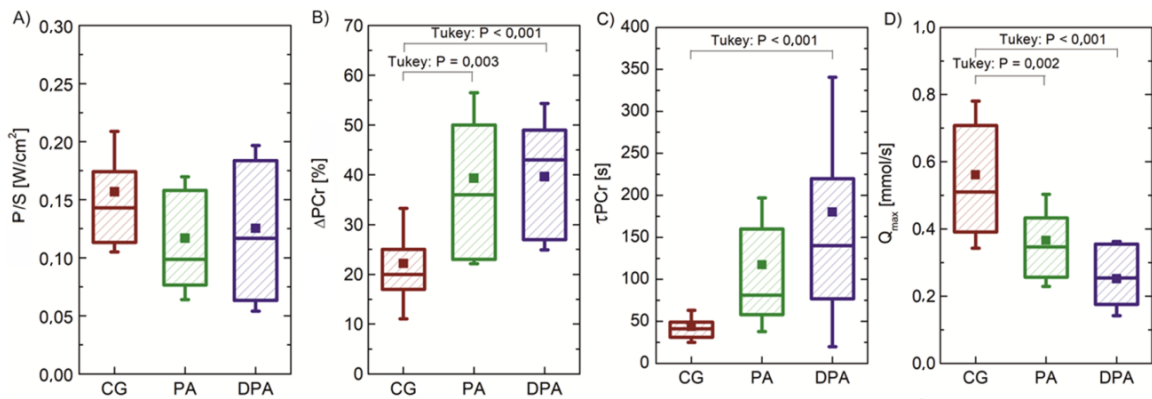
*DM1 a DM2 pacienti byly zařazeni do jedné skupiny DPA na základě statistických analýzy, která neprokázala odlišnost těchto pacientů z hlediska ³¹P MRS.

Pacienti a dobrovolníci byli vyšetřeni klidovou a zátěžovou ³¹P MRS klinickým protokolem uvedeným v oddílu 4.3.1.1.

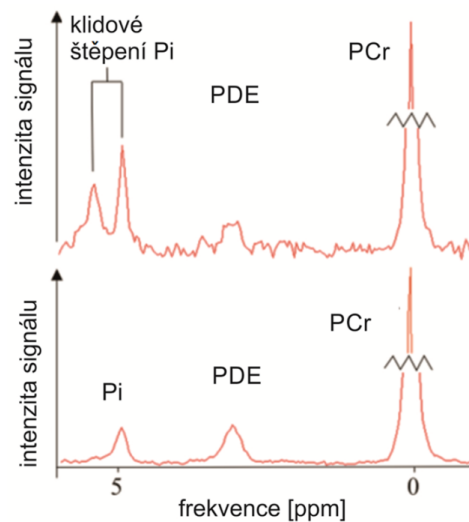
Obdržené hodnoty z klidové ³¹P MRS jsou uvedeny v Tab. č. 9, ze zátěžové ³¹P MRS jsou hodnoty zaznamenány v Tab. č. 10. Výsledky z klidové a zátěžové ³¹P MRS jsou také graficky znázorněny pomocí krabicových grafů na Obr. č. 27 a Obr. č. 28. Na grafu Obr. č. 27 je také znázorněna signifikantní korelace mezi PDE/P_{tot} a BMI. ANOVA analýza prokázala signifikantní skupinové rozdíly v jednotlivých sledovaných parametrech jak v klidu, tak při zátěži. V případě klidového metabolismu byly pomocí Tukey testu nalezeny rozdíly v poměru fosforových sloučenin mezi skupinami CG a DPA a mezi PA a DPA. Skupina DPA měla velmi výrazně snížený poměr PCr/P_i, zvýšené klidové pH a vyšší zastoupení signálu PDE/P_{tot}. Navíc u 6 pacientů v DPA skupině bylo pozorováno velmi netypické klidové štěpení signálu P_i, viz Obr. č. 29. PA skupina měla oproti kontrolní skupině CG pouze zvýšené pH.



Obr. č. 27. Krabicové grafy klidové ³¹P MRS. A) PCr/Pi a B) pH skupin PA a DPA pacientů a kontrolní skupiny CG (klidová ³¹P MRS); C) obrázek korelace mezi BMI a PDE/P_{tot} (Pearsonův korelační koeficient r = 0.62, p < 0,001).



Obr. č. 28. Krabicové grafy zátěžové ³¹P MRS. A) normalizovaný výkon (P) na průřez svalu (S); B) ΔPCr C) τPCr a D) Q_{max} u CG, PA a DPA skupiny.



Obr. č. 29. Ukázka klidového štěpení anorganického fosfátu.

Tab. č. 9. Klidové pH a hodnoty poměrů fosforových metabolitů vůči sumě signálů všech fosforových signálů (P_{tot}). Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami (Tukey test, $p < 0,05$) jsou vyznačeny pomocí svorek.

skupina	PCr/Pi	PCr/ P_{tot}	Pi/ P_{tot}	β ATP/ P_{tot}	PDE/ P_{tot}	pH
CG	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	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	5.5±2.0	0.45±0.06	0.093±0.037	0.077±0.013	0.085±0.021	7.052±0.031

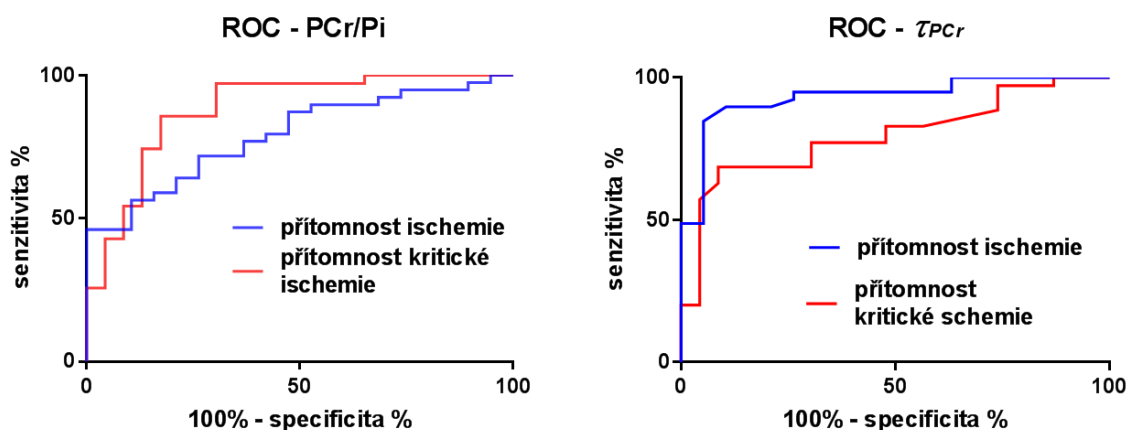
Tab. č. 10. Výsledky zátěžové ^{31}P MRS (normalizovaný výkon – průměrný výkon na průřez m. gastrocnemius). Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami (Tukey test, $p < 0,05$) jsou vyznačeny pomocí svorek.

skupina	MVF [N]	normal. výkon [Watt/cm ²]	Δ PCr [%]	τ PCr [s]	V_{PCr} [mM/s]	Q_{max} [mM/s]	pH _{cv}
CG	450±140	0.16±0.05	22±11	44±19	0.27±0.17	0.57±0.24	7.034±0.036
PA	380±170	0.12±0.05	39±17	117±80	0.19±0.07	0.37±0.14	6.873±0.187
DPA	*n.a.	0.13±0.07	41±14	198±173	0.13±0.09	0.25±0.11	6.835±0.238

V zátěžové ^{31}P MRS byly už u PA skupiny nalezeny signifikantní rozdíly oproti CG skupině v Q_{max} i v pH_{cv} či v Δ PCr, naproti tomu signifikantní rozdíly mezi PA a DPA skupinou nebyly již zjištěny v rámci zátěžové ^{31}P MRS.

U pacientů byla také zkoumána korelace s klinickými parametry. Zmíněná velmi silná korelace byla nalezena mezi BMI a PDE/ P_{tot} ($r = 0,62$; $p = 0,001$). V PA skupině koreloval poměr β ATP/ P_{tot} s hodnotou ABI ($r = 0,70$; $p = 0,003$). V DPA skupině nebyla nalezena žádná korelace s TcpO₂, pouze mitochondriální kapacita korelovala s délkou diabetu ($r = -0,51$; $p = 0,03$).

Největší specifitu a senzitivitu detekci kritické ischemie měl parametr PCr/Pi (pro hodnotu PCr/Pi = 6,8 byla senzitivita 85 % a specifita 83 %) a naopak pro diagnostiku ischemie se ukázal být nejvíce senzitivní a specifický parametr τ_{PCr} (pro $\tau_{PCr} = 58$ byla senzitivita i specifita vyšetření 90 %), viz ROC na Obr. č. 30.



Obr. č. 30. ROC křivky PCr/Pi a τ_{PCr} pro diagnostiku přítomnosti ischemie, respektive kritické ischemie.

5.2.2.2 Efekt léčby

U části pacientů s kritickou ischemií dolní končetiny byl klidovou a zátěžovou ^{31}P MRS posuzován efekt léčby perkutánní transluminální angioplastikou (PTA), nebo implantací mezenchymálních kmenových buněk do cévního řečiště lýtku. Pacienti, kteří byli léčeni kmenovými buňkami, byli vyšetřeni těsně před a v odstupu 3 měsíců od chirurgické implantace. Pacienti, u nichž byla zvolena klasická léčba pomocí PTA, byli vyšetřeni den před zákrokem a někteří z nich, pokud neobdrželi stent, den po PTA. Někteří pacienti nebyli vyšetřeni z provozních důvodů nebo zdravotních komplikací po zákroku. Po třech měsících po PTA část pacientů nemohla být vyšetřena z důvodu amputace nohy pod kolenem, úmrtí nebo odmítnutí pokračovat ve studii. Z uvedených důvodů jen velmi málo osob po PTA absolvovalo všechna tři vyšetření, a proto nemůže být zkoumán postupný vývoj metabolismu u jednotlivých osob po zákroku.

Hodnoty, které srovnávají efekt léčby kmenovými buňkami a PTA po 3 měsících jsou uvedeny v Tab. č. 11. Výsledky ^{31}P MRS porovnávající efekt po PTA po jednom dnu jsou v Tab. č. 12. Jediné signifikantní změny v metabolismu svalu dané léčbou byly nalezeny ve vyšetření den po PTA v parametru τ_{PCr} a pH. Graf jednotlivých hodnot τ_{PCr} od všech osob den před a den po PTA je na Obr. č. 31. U některých osob bylo zjištěno markantní zlepšení jak metabolismu při zátěži, tak i v klidu, viz Obr. č. 32.

Tab. č. 11. Porovnání hodnot klidové a zátěžové ^{31}P MRS před a tři měsíce po léčbě PTA, nebo po transplantaci mezenchymálních kmenových buněk (TxB) pomocí párového t-testu.

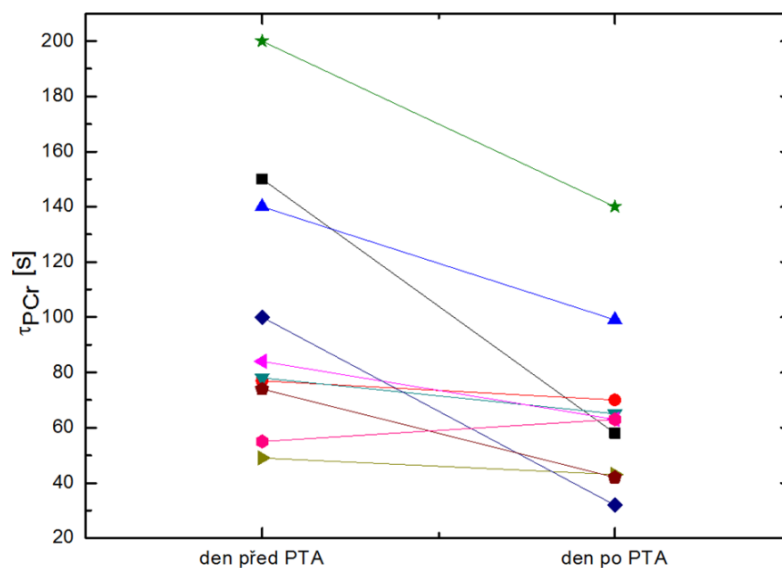
	před TxB	po TxB	p	před PTA	po PTA	p
klid	N = 13			N = 7		
TcpO ₂ [mmHg]	22 ± 11	32 ± 13	0,01	42 ± 31	48 ± 29	0,45
PCr/Pi	5,3 ± 2,3	5,3 ± 2,3	0,82	6,4 ± 2,6	6,4 ± 2,6	0,79
PCr/P _{tot}	0,40 ± 0,08	0,42 ± 0,06	0,78	0,47 ± 0,07	0,48 ± 0,03	0,75
Pi/P _{tot}	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,84	0,09 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,44
βATP/P _{tot}	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,09	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,64
PDE/P _{tot}	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,98	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,20
pH	7,07 ± 0,03	7,06 ± 0,03	0,23	7,07 ± 0,01	7,06 ± 0,01	0,17
zátěž	N = 5			N = 4		
TcpO ₂ [mmHg]*	22 ± 7	33 ± 11	0,08	16 ± 10	32 ± 21	0,71
ΔPCr [%]	31 ± 17	35 ± 23	0,76	47 ± 23	50 ± 31	0,87
τ _{PCr} [s]	170 ± 190	100 ± 70	0,32	140 ± 60	150 ± 70	0,92
V _{PCr} [mM/s]	0,11 ± 0,04	0,17 ± 0,10	0,18	0,17 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,92
Q _{max} [mM/s]	0,27 ± 0,12	0,34 ± 0,21	0,48	0,30 ± 0,07	0,30 ± 0,08	0,99
pH _{cv}	6,82 ± 0,25	6,89 ± 0,16	0,32	6,80 ± 0,21	6,77 ± 0,27	0,82

* klidová hodnota TcpO₂ vázající se k pacientům s prodělanou zátěží

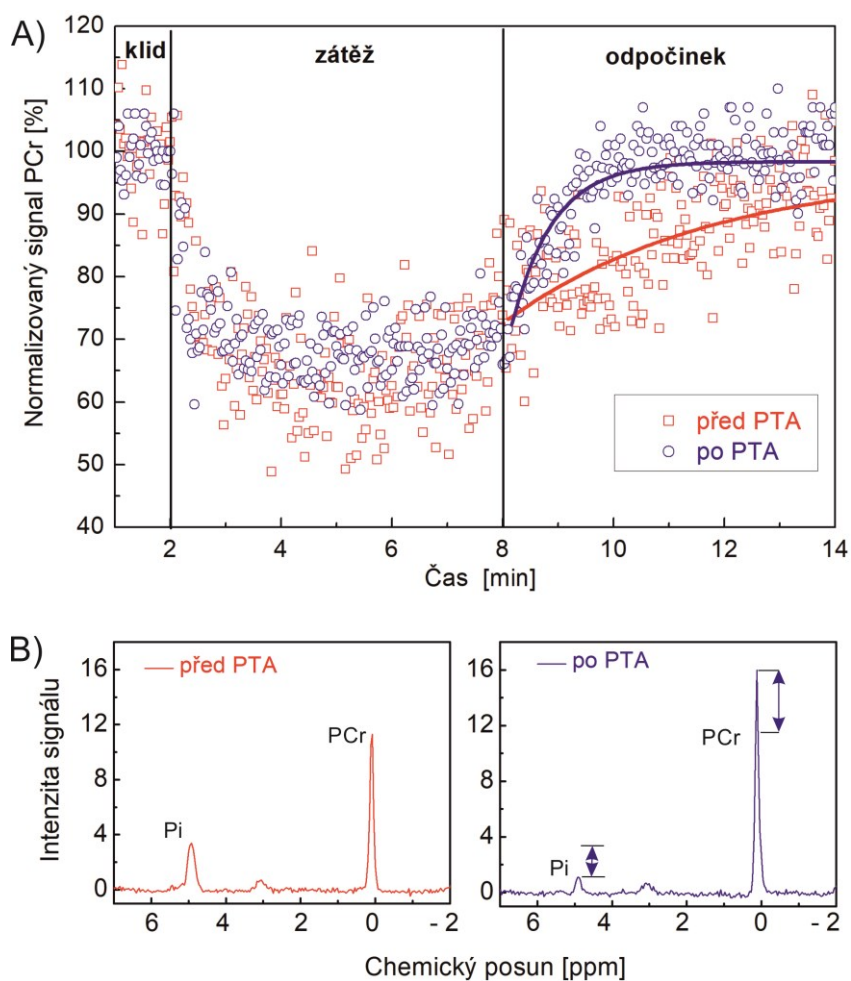
Tab. č. 12. Porovnání hodnot z klidové a zátěžové ^{31}P MRS pomocí párového t-testu provedenou u pacientů den před a den po PTA

	den před PTA	den po PTA	p
klid	N = 13		
TcpO ₂ [mmHg]	33 ± 31	n/a	
PCr/Pi	5,4 ± 2,2	5,4 ± 2,2	0,98
PCr/P _{tot}	0,40 ± 0,07	0,40 ± 0,08	0,53
Pi/P _{tot}	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,35
βATP/P _{tot}	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,26
PDE/P _{tot}	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,45
pH	7,06 ± 0,03	7,05 ± 0,03	0,09
zátěž	N = 10		
TcpO ₂ [mmHg]	36 ± 26	n/a	
ΔPCr [%]	44 ± 14	37 ± 18	0,08
τ _{PCr} [s]	100 ± 50	70 ± 30	0,01
V _{PCr} [mM/s]	0,24 ± 0,09	0,3 ± 0,12	0,21
Q _{max} [mM/s]	0,42 ± 0,13	0,52 ± 0,17	0,11
pH _{cv}	6,90 ± 0,17	6,96 ± 0,13	0,05

n/a – neměřeno



Obr. č. 31. Graf τ_{PCr} jeden den před a jeden den po PTA (jednotlivá vyšetření u stejných pacientů jsou spojena přímkou)



Obr. č. 32. Ukázka individuálního zlepšení konkrétního pacienta den po PTA. A) graf hodnot PCr z vyšetření stejného pacienta ze zátěžové části ^{31}P MRS (po PTA, zrychlení regenerace PCr); B) klidové fosforové MR spektrum (po PTA dochází ke znatelnému nárůstu signálu PCr a poklesu signálu Pi).

5.2.2.3 Saturační transfer

Měření ^{31}P MR saturačního transferu bylo provedeno na 17 pacientech s kritickou ischemií a 6 zdravých dobrovolnicích protokolem uvedeným v oddílu 4.3.1.2. U dobrovolníků byl navíc měřen i $T1_{PCr}^{app}$ pomocí IR sekvence. Výsledné hodnoty z měření saturačního transferu jsou uvedeny v Tab. č. 13. Pacienti měli signifikantně menší $\frac{I_{PCr}}{I_{PCr}^{sat}}$, avšak hodnota $V_{PCr \rightarrow ATP}$ byla srovnatelná. Pro výpočet $V_{PCr \rightarrow ATP}$ byl u pacientů použit $T1_{PCr}^{app}$ zdravých dobrovolníků. Pacienti se také lišili v BMI, věku a $\beta\text{ATP}/P_{tot}$.

Tab. č. 13. Hodnoty relativního poklesu signálu PCr při saturaci ($1 - \frac{I_{PCr}^{sat}}{I_{PCr}}$), T_1 aparentního relaxačního času PCr ($T1_{PCr}^{app}$), rychlostní konstanty kreatin-kinázové reakce ($k_{PCr \rightarrow ATP}$), toku PCr kreatin-kinázovou reakcí ($F_{PCr \rightarrow ATP}$) u diabetických pacientů s ICHDK a zdravých kontrol.

	pacienti N = 17	kontroly N = 6	p
věk [rok]	67,2 ± 5,8	25,5 ± 2,8	<0,001
BMI [kg/m ²]	28,7 ± 3,5	22,1 ± 3,2	<0,001
průřez svalu [cm ²]	19,0 ± 5,5	23,7 ± 5,3	0,07
TcpO ₂ [mmHg]	32 ± 14		
$1 - \frac{I_{PCr}^{sat}}{I_{PCr}}$	0,42 ± 0,11	0,53 ± 0,04	0,03
$T1_{PCr}^{app}$ [ms]	-	1580 ± 110	
$k_{PCr \rightarrow ATP}$ [1/s]	0,26 ± 0,06	0,34 ± 0,02	0,006
$F_{PCr \rightarrow ATP}$ [mM/s]	9,1 ± 3,4	10,8 ± 1,4	0,4
PCr/ βATP	6,2 ± 1,4	5,6 ± 0,6	0,3
[PCr] _{klid} [mM]	51 ± 11	46 ± 5	0,3
$\beta\text{ATP}/P_{tot}$	0,073 ± 0,017	0,091 ± 0,009	0,02

5.2.3 Svalový metabolismus u srdečního selhání a sideropenie

Ve studii se srdečním selháním bylo vyšetřeno 25 kontrol (CG, věk = 49 ± 15 let, BMI = 28 ± 4 kg/m²), 12 pacientů se srdečním selháním bez sideropenie (HF non-S, věk = 56 ± 13 let, BMI = 29 ± 8 kg/m², EF = 29 ± 11 , NYHA = $2,8 \pm 1,0$) a 32 pacientů se srdečním selháním a sideropenií (HF S, věk = 55 ± 17 let, BMI = 27 ± 5 kg/m², EF = $26 \pm 9,1$, NYHA = $2,6 \pm 0,7$). Většina srdečních selhání byla neischemické etiologie (zejména dilatovaná kardiomyopatie).

Kontroly i pacienti prodělali vyšetření klidovou a zátěžovou ³¹P MRS protokolem uvedeným v oddílu 4.3.1.1. Výsledné hodnoty kontrol a pacientů jsou uvedeny v Tab. č. 14. U části pacientů se sideropenií byl zkoumán efekt léčby intravenózním přípravkem s obsahem železa (2 x 500 mg karboxymaltóza železa ve 2 dávkách po 14 dnech). Druhé kontrolní MR vyšetření následovalo 1 měsíc po zahájení léčby. 13 vyšetřených osob prošlo druhým kontrolním MR vyšetřením. V Tab. č. 15 je uveden souhrn klinických, biochemických a ³¹P MRS parametrů u pacientů se sideropenií před a po podání karboxymaltózy železa.

Pacienti vůči kontrolám měli menší objem svalů (při srovnatelném BMI), pacienti se sideropenií měli navíc i výrazně sníženou maximální vynutitelnou sílu vůči zbylým pacientům a to i při normalizaci na průřez m. gastrocnemius ($18 \pm 7,0$ vs. $22 \pm 5,5$ N/cm²; p = 0,05). Klidovou ³¹P MRS bylo u pacientů zjištěno zejména snížené zastoupení ATP a zvýšený obsah anorganického fosfátu, jak vyplývá z poměru vůči celkovému signálu fosforových metabolitů.

Při zátěži měli zejména sideropeničtí pacienti větší pokles PCr a pH při menší zátěži, ačkoliv signifikantní rozdíly v Q_{max} se neobjevily (pouze trend v nárůstu τ_{PCr}). Efekt léčby na svalovou tkáň byl nalezen pouze v nárůstu MVF. Ve skupině se srdečním selháním Q_{max} silně korelovala s věkem (r = 0,57; p = 0,0003). Také byla zjištěna korelace MVF s koncentrací hemoglobinu a feritinu (obě hodnoty korelace r = 0,5; p = 0,002). U pacientů se sideropenií zlepšila léčba pouze biochemické parametry zastoupení železa v organismu a NYHA skóre.

Tab. č. 14. Výsledná charakteristika metabolismu lýtkového svalu u kontrol (CG) a pacientů se srdečním selháním (HF) s dělením na pacienty bez sideropenie (non-S) a se sideropenií (S).

	CG N = 25	HF N = 44	p	HF non-S N = 12	HF S N = 32	p
sval						
plocha gastr. [cm ²]	24 ± 5,1	19 ± 4,9	0,0002	21 ± 5,7	19 ± 4,5	0,4
MVF [N]	453 ± 151	356 ± 143	0,02	439 ± 125	325 ± 139	0,03
klidový metabolismus						
PCr/P _{tot}	0,51 ± 0,02	0,50 ± 0,04	0,09	0,51 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,7
Pi/P _{tot}	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,005	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,09
ATP/P _{tot}	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	<0,001	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,7
PCr/Pi	8,2 ± 1,5	7,1 ± 1,8	0,01	8,1 ± 2,3	6,8 ± 1,4	0,09
ATP/Pi	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,001	1,4 ± 0,5	1,1 ± 0,3	0,1
pH _{klid}	7,02 ± 0,03	7,04 ± 0,03	0,2	7,04 ± 0,03	7,03 ± 0,02	0,6
zátěž						
výkon [W]	3,8 ± 1,2	2,9 ± 1,8	0,02	2,9 ± 1,5	3,0 ± 1,9	0,9
ΔPCr [%]	24 ± 13	28 ± 16	0,2	19 ± 8	31 ± 17	0,01
ΔPCr /výkon [%/W]	6,4 ± 3,1	12,8 ± 11	0,003	9,4 ± 8,2	13,8 ± 12	0,3
pH _{cv}	7,02 ± 0,03	6,97 ± 0,15	0,05	7,04 ± 0,06	6,95 ± 0,17	0,03
[ADP] _{cv} [μM/L]	27 ± 8,8	30 ± 9,1	0,2	24 ± 6,6	31,9 ± 9,1	0,01
regenerační perioda						
τ_{PCr} [s]	43 ± 17	66 ± 48	0,01	50 ± 15	71 ± 54	0,06
V_{PCr} [mM/s]	0,27 ± 0,18	0,24 ± 0,12	0,4	0,20 ± 0,04	0,26 ± 0,13	0,04
Q_{max} [mM/s]	0,55 ± 0,23	0,49 ± 0,21	0,3	0,44 ± 0,05	0,50 ± 0,2	0,3

Tab. č. 15. Efekt podání železa (Fe) u pacientů se sideropenií a srdečním selháním (BNP – natriuretický peptid typu B, LV EF – ejekční frakce levé komory, Hgb – koncentrace hemoglobinu, MCV – objem erytrocytu).

N = 13	před Fe	po Fe	p
NYHA skóre	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,6	0,04
obtíže při chůzi	2,5 ± 1,6	1,5 ± 1,3	0,002
obtíže při práci	2,0 ± 1,9	1,3 ± 1,4	0,005
dušnost	2,6 ± 1,6	1,7 ± 1,6	0,004
MLHFQ skóre	26 ± 14	22 ± 15	0,08
LV EF [%]	28 ± 11	29 ± 13	0,7
BNP	1134 ± 1028	1156 ± 831	0,2
Fe metabolismus			
Hgb [g/L]	125 ± 13	133 ± 15	0,01
MCV [fl]	87 ± 5,5	90 ± 3,7	0,004
ferritin [µg/L]	83 ± 61	403 ± 309	0,003
transferin [g/L]	3,1 ± 0,5	2,7 ± 0,4	<0,001
transferin sat. [%]	12 ± 6	18 ± 12	0,004
sérová hladina Fe [mol/L]	11 ± 6,7	15 ± 7,4	0,01
klidový metabolismus			
PCr/P _{tot}	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,02	0,6
Pi/P _{tot}	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,6
ATP/P _{tot}	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,7
ATP/Pi	1,03 ± 0,24	1,00 ± 0,27	0,5
pH klid	7,03 ± 0,02	7,03 ± 0,03	0,8
zátěž & sval			
MVF [N]	360 ± 115	406 ± 127	0,03
výkon [W]	2,6 ± 1,1	2,7 ± 1,4	0,7
ΔPCr [%]	37 ± 22	35 ± 17	0,6
pH _{cv}	6,90 ± 0,20	6,93 ± 0,17	0,4
[ADP] _{cv} [µM/L]	34 ± 11	34 ± 12	0,8
regenerační perioda			
τ _{PCr} [s]	81 ± 72	76 ± 45	0,6
V _{PCr} [mM/s]	0,28 ± 0,16	0,28 ± 0,17	0,9
Q _{max} [mM/s]	0,53 ± 0,27	0,52 ± 0,28	0,7

6 Diskuze

6.1 Metodické výsledky ^{31}P MRS

6.1.1 Hlavní faktory ovlivňující klidovou a zátěžovou ^{31}P MRS a omezení metody

Z uvedeného přehledu parametrů zátěžové ^{31}P MR v kapitole 3.2.4 je patrné, že zátěžová ^{31}P MRS umožňuje mnohem detailnější zkoumání svalového metabolismu než jen klidová ^{31}P MRS. Naproti tomu má zátěžová ^{31}P MRS řadu technických omezení, které je nutno vzít v úvahu. Přesto její výsledky dobře korelují s *in vitro* studiemi (Lanza I. R. et al., 2011; Layec G. et al., 2016; Praet S. F. E. et al., 2007), potvrzují očekávané změny metabolismu při různých onemocněních a dokumentují efekt léčby.

Prvním problémem je existence několika variant zmíněných výpočtů s řadou vystupujících konstant a členů. Obecně platí, že jednotlivé varianty výpočtů nepřinášejí stejné hodnoty (Layec G. et al., 2010). Je nutné zvážit, který použitý výpočet je vhodný pro daný případ a poskytuje věrohodnou a klinicky užitečnou informaci. Častou snahou je předem nastavit protokol zátěže tak, aby některé členy v rovnicích pro výpočet metabolických toků mohly být zanedbány (např. cvičení o malé intenzitě (Kemp G. J. & Radda G. K., 1994) – zanedbatelná anaerobní glykolýza; cvičení při stažení lýtka škrtidlem (Kemp G. J., 1997) – zanedbatelná oxidativní fosforylace a eliminace H^+ krevním řečištěm; krátké cvičení – bez významného poklesu pH atd.).

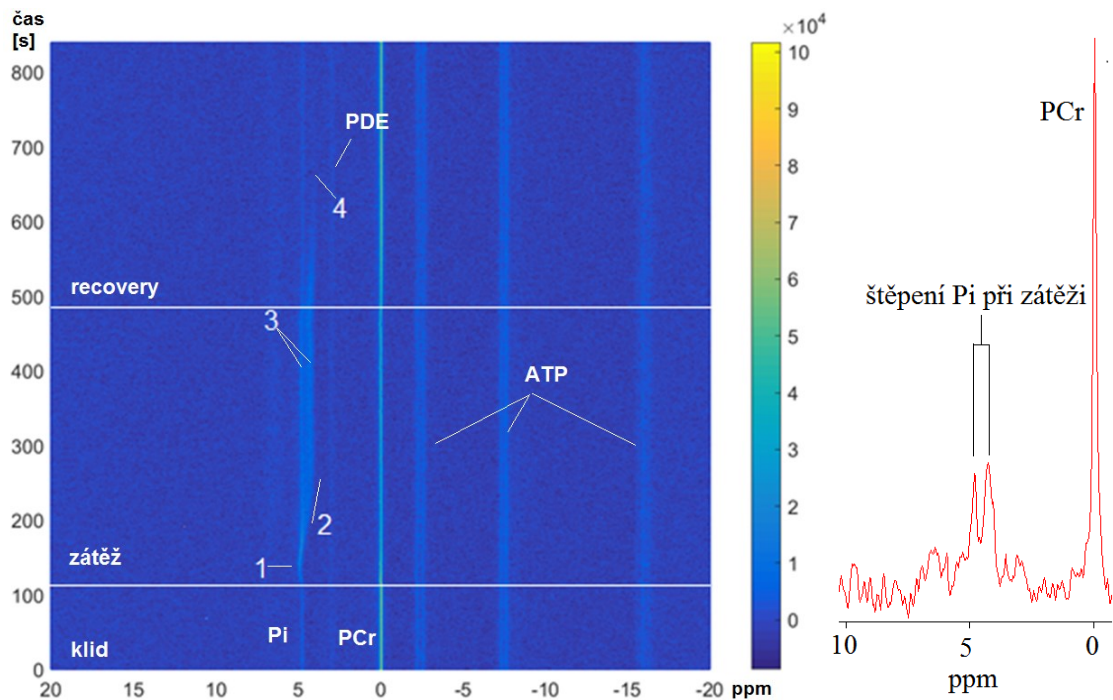
Jako první příklad může sloužit výpočet mitochondriální kapacity. V metodické části je uvedeno 5 možných variant výpočtu a každý model má své popsané výhody a nevýhody. Numericky obvykle platí (Layec G. et al., 2016), že $Q_{\max\text{-ADP}}$ a $Q_{\max\text{-sec}}$ dávají znatelně menší hodnoty než $Q_{\max\text{-lin}}$ a $Q_{\max\text{-pot}}$. Tři modely vycházejí z Michaelise–Mentenové kinetiky. Konkrétně pro konečný výpočet $Q_{\max\text{-sec}}$ je nutné použít dokonce 3 různé konstanty: tabelovaná hodnota bazálního toku, Michaelise–Mentenové konstanta a Hillův exponent, který vystihuje vliv enzymů. Je otázkou, do jaké míry se jedná opravdu o konstanty, které lze arbitrárně používat pro všechny subjekty. Vědecké práce uvádějí hodnotu K_m od 22 μM (Jeneson J. A. L. et al., 2009) do 44 μM (Jeneson J. A. et al., 1996). Layec (Layec G. et al., 2013a) dokonce ukázal, že hodnota Hillova exponentu, respektive tvar kinetiky PCr v závislosti na ADP se signifikantně mění u jednotlivých osob už po týdenním fyzickém tréninku. Vyjma

použití těchto konstant je potřeba určit pro výpočet Q_{max} i absolutní koncentrace ADP a PCr a zde se většinou spoléhá na semi-kvantifikační výpočet přes poměry k signálu β ATP, což u pacientů může být značně chybný předpoklad.

Druhým experimentálním problémem je kvalita naměřených dat. Pro přesné vyhodnocení V_{PCr} a τ_{PCr} je potřeba mít přijatelné časové rozlišení náběru dat (podrobněji oddíl 5.1.2 a 6.1.4), zvláště na začátku a na konci cvičení, a velký poměr SNR. To jsou dva protichůdné požadavky, protože dobré časové rozlišení vylučuje použití sumace jednotlivých akvizic, která se jinak v MRS běžně používá pro navýšení SNR. Příliš zkracovat repetiční čas také nelze, protože poté dochází k poklesu signálu vlivem nedostatečné T_1 relaxace fosforových signálů.

Třetím úskalím je správné určení pH svalu a vliv jeho poklesu na výsledné metabolické parametry. Signál Pi se často rozšiřuje, nebo dokonce štěpí (viz Obr. č. 33), takže získané pH vyjadřuje pouze určitou průměrnou hodnotu (Rossiter H. B. et al., 2002; Rzanny R. et al., 2016; Yoshida T. et al., 1996). Štěpení signálu anorganického fosfátu je jevem, který některé vědecké práce (Rzanny R. et al., 2016; Yoshida T. et al., 1996) vysvětlují příspěvkem signálu ze dvou typů svalových vláken – rychlých („bílá vlákna“), která se více acidifikují vlivem anaerobní glykolýzy, a pomalých („červená vlákna“), která příliš nemění pH, poněvadž získávají energii zejména oxidativní fosforylací. Druhým a spíše převládajícím vysvětlením na základě lokalizované spektroskopie (Valkovič L. et al., 2014) je, že štěpení je důsledkem příspěvků signálu z několika svalů, které mají odlišný podíl svalové práce na vykonávaném pohybu.

Při štěpení signálu je také otázkou jaký signál použít pro určení pH. Jako nejsprávnější postup by se mohlo jevit použití váženého průměru (podle jednotlivých velikostí intenzit signálů štěpeného Pi), avšak v tomto případě se obdrží pH, které nevystihuje ani jeden kompartment. Větší pokles pH je nepříznivý, protože se podílí na pocitu vyčerpání (Allen D. G. et al., 2008) a navíc přímo inhibuje oxidativní fosforylací a způsobuje pokles ADP daný rovnováhou kreatin–kinázové reakce (Jubrias S. A. et al., 2003; Kemp G. J. et al., 2015). Relativně nižší ADP pak méně stimuluje oxidativní fosforylací, a tím je návrat PCr na klidové hodnoty pomalejší, než by odpovídalo poklesu PCr bez změny pH (van den Broek N. M. A. et al., 2007; Jubrias S. A. et al., 2003). Řešením situace je předcházení významné acidóze speciálně uzpůsobeným protokolem, tj. buď krátká doba zátěže, nebo malá (aerobní) velikost zátěže.



Obr. č. 33. Štěpení signálu Pi při fyzické zátěži.

Levý graf zobrazuje vývoj velikostí signálu Pi, PDE, PCr, γ ATP, α ATP a β ATP v závislosti na čase v průběhu vyšetření zátěžovou ^{31}P MRS. Signál anorganického fosfátu (Pi) nejprve vzrůstá (změna barvy) a posouvá se doleva (1) tím, jak kreatinkinázová reakce způsobuje nárůst koncentrace Pi a pH. Poté se signál Pi začne rozšiřovat a posouvat směrem doprava (2), jak pH svalu klesá v důsledku anaerobní glykolýzy. V průběhu zátěže se dokonce signál Pi rozštěpí na dvě komponenty (3) - pravá komponenta odpovídá více kyselému pH. Po zátěži dochází k rychlému obnovení počáteční koncentrace Pi, zejména se rychle ztrácí „kyselější“ signál Pi (4). Na grafu vpravo je výsek ^{31}P MRS spektra s rozštěpeným signálem Pi během zátěže.

Čtvrtou často diskutovanou záležitostí je problém správného vyhodnocení návratu PCr ke klidovým hodnotám v regenerační době (Kemp G. J. et al., 2015). Tento problém má dvě části - samotnou přesnost fitu a matematický tvar křivky, kterým se hodnoty PCr prokládají. Věrohodnost fitování a parametry, které ji ovlivňují, jsou podrobněji rozebrány v oddílu 6.1.4.

Co se týče matematického tvaru křivky, některé práce přinášejí poznatky (Arnold D. L. et al., 1984; Forbes S. C. et al., 2009; Harris R. C. et al., 1976; Rossiter H. B. et al., 2002; Walter G. et al., 1997), že závislost PCr v regenerační periodě není zcela monoexponenciální a pro její vyhodnocení se lépe hodí biexponenciální (Harris R. C. et al., 1976), CRUR model (Arsac L. M. et al., 2004) či ještě složitější modely (Iotti S. et al., 2010). Je samozřejmé, že proložení bodů křivkou o více stupních volnosti přinese vždy lepší výsledky (ve smyslu poklesu velikosti reziduí, porovnávat lze pouze hodnotu adjustovaného R, která bere v úvahu i počet volností prokládané křivky). Ve většině

případů ale PCr křivka velmi dobře splňuje jednoduchou exponenciální závislost a zavádění složitějších modelů by bylo nadbytečné, vnášelo by potenciální zdroj chyb do vyhodnocení a ztěžovalo by interpretaci výsledků. Přesto v některých výjimečných případech stojí za uvažování, zda nepoužít složitější model, pokud jednotlivé hodnoty PCr během regenerační periody mají evidentně složitější závislost, než je monoexponenciála.

Komplexní návrat PCr přes složitější závislost může být dán třemi faktory. Prvním faktorem je zmíněný vliv pH. Druhým faktorem, který vyžaduje samostatnou diskuzi, je potenciální příspěvek anaerobní glykolýzy i v prvních sekundách regenerační periody po intenzivní zátěži (Crowther G. J. et al., 2002; Forbes S. C. et al., 2009). Takový příspěvek je velmi nežádoucí, protože vztahy pro výpočet mitochondriální kapacity z regenerační periody byly odvozeny za předpokladu, že onen příspěvek neexistuje. Na druhou stranu tento příspěvek vylučuje několik vědeckých prací na základě experimentů se zaškrcením lýtky v regenerační periodě (Lanza I. R. et al., 2006; Quistorff B. et al., 1993).

Třetí faktor, který může vysvětlit komplikovanější PCr křivku v regenerační periodě, je superpozice signálu. Samotný signál PCr odpovídá sumě signálů z několika různých svalů, které mohou mít různou rychlost návratu PCr v důsledku rozdílného poklesu PCr a odlišného poměru rychlých a pomalých svalových vláken (Parasoglou P. et al., 2012; Yoshida T. et al., 2013).

Složitější kinetika je zejména pozorována, pokud je pokles PCr značný (Forbes S. C. et al., 2009) a dochází i k velkému poklesu pH. Za této situace mohou všechny zmíněné jevy přispívat k nežádoucí modulaci tvaru křivky PCr. Proto velký pokles PCr, který je spojen s velkým poklesem pH, není výhodný pro nezkrácené vyhodnocení naměřených dat.

Pátým problémem, který má vliv na konečné výsledky, je místo odečtu počáteční a konečné koncentrace PCr pro výpočet relativního nebo absolutního poklesu PCr během zátěže. Konečná koncentrace by se měla odečítat těsně před skončením zátěže, kdy už většinou nastává dynamická rovnováha mezi spotřebou a resyntézou PCr. S počáteční klidovou koncentrací PCr je situace komplikovanější. Zde lze uvažovat o odečítání buď před začátkem zátěže, nebo naopak na konci regenerační periody. Odečítání PCr před začátkem zátěže má výhodu, že počáteční hodnota PCr je vždy k dispozici. Při odečítání na konci zátěže nemusí být, zvláště u pacientů, koncentrace PCr ještě plně obnovena (závisí na rychlosti regenerace, proto je výhodnější spíše delší

regenerační doba náběru dat). Na druhou stranu odečítání PCr před začátkem zátěže může zkreslovat pokles PCr tím, že se během vykonávání zátěže sval pohne a změní se jeho poloha vůči cívce a lokalizaci spektra. Situaci s odečítáním PCr komplikuje ještě jeden, ne zcela jednoznačně vysvětlený efekt, a to, že u některých zdravých osob PCr překoná na konci regenerační periody počáteční klidové hodnoty PCr (Zoladz J. A. et al., 2010).

Z hlediska definice, jak se vnímá parametr ΔPCr , by se jevilo správnější odečítat PCr před zátěží, ale pro výpočet V_{PCr} a Q_{max} z ΔPCr se předpokládá naopak udání celkové změny PCr, ke které dochází v regenerační periodě včetně efektu přestřelení počáteční koncentrace PCr.

Posledním problémem je výběr věrohodných parametrů. Některé parametry jako změna PCr, pH nebo metabolické toky jsou velmi závislé na intenzitě zátěže vzhledem k fyzické dispozici jedince, jenž jsou vyjádřeny např. objemem svalové tkáně nebo maximální vynutitelnou silou. Řešením problému je používat pro srovnání parametry, jako je mitochondriální kapacita, které by měly být ze své definice nezávislé na relativní intenzitě zátěže. Bohužel i u mitochondriální kapacity lze vysledovat určité trendy ve vztahu k použité zátěži (při použití vyšší zátěže se vypočítávaná hodnota Q_{max} mírně zvětšuje, jak ukazují výsledky této dizertační práce, tak publikované výsledky Layecem (Layec G. et al., 2009; Šedivý P. et al., 2015)).

Druhou možností, která pokrývá porovnání všech metabolických parametrů, je přiřazení kontrol a pacientů podle jejich maximální vynutitelné síly (MVF) a objemu svalové hmoty nebo porovnávání pouze skupin, kde jsou tyto parametry v průměru stejné.

Třetím řešením, týkajícím se zejména parametrů, které jsou hodně závislé na intenzitě zátěže, je jejich normalizace například na objem svalů, MVF, vykonanou práci nebo na složitější kombinaci těchto parametrů (Mattei J.-P. et al., 2002).

Poslední možné řešení je individualizace zátěže podle MVF (Fowler M. D. et al., 1997; Šedivý P. et al., 2015). Je to je nejspíše nejběžnější postup, ale hodnota MVF je do jisté míry u pacientů zkreslena onemocněním, takže nastavená relativně malá zátěž (ve srovnání s jinak odpovídajícími kontrolami) nemusí zviditelnit patologické procesy.

S fyzickými dispozicemi souvisí vliv věku, pohlaví, fyzické trénovanosti a BMI. V ideálním případě by porovnávané kohorty osob měly být co nejhomogennější a nejvíce si podobné vyjma sledovaného faktoru. U BMI je zmiňovaná závislost fosfodiesterů s narůstajícím BMI (Valkovič L. et al., 2016). Vliv věku na metabolické

parametry byl zkoumán v řadě vědeckých publikací. V závislosti na použité metodice, věkovém rozdílu, fyzické trénovanosti a druhu vypočítávaných parametrů přinesly publikace protichůdné výsledky (bez změny (Chilibeck P. D. et al., 1998b; Hart C. R. et al., 2015; Kutsuzawa T. et al., 2001; Wray D. W. et al., 2009), s negativní změnou (Chilibeck P. D. et al., 1998a; Conley K. E. et al., 2000; Forbes S. C. et al., 2008; Schunk K. et al., 1999)). Vlivu pohlaví na parametry ^{31}P MRS se podrobně věnuje publikace (Sedivy P. et al., 2018).

6.1.2 Nastavení protokolu ^{31}P MRS a výběr použitých parametrů s ohledem na možnosti měření v IKEM

a) Výběr typu vyšetření

Většina vyšetření byla provedena v kombinaci klidové a zátěžové ^{31}P MRS. V některých případech u pacientů s kritickou končetinovou ischemií, kde nebylo možné provést zátěžovou ^{31}P MRS (amputace chodidla, bolestivé ulcerace na plosce chodidla), byla použita technika saturačního transferu. Bohužel se jedná o techniku, která poskytuje malý SNR (při odečtení jednotlivých spekter). U ischemických pacientů v kombinaci s malým objemem atrofovaného svalu, horší homogenitou magnetického pole (pacienti měli často různé stenty, edém) a neschopností udržet nohu zcela v klidu se tak tato technika ukázala jako nepoužitelná pro kalkulaci $V_{Pi \rightarrow ATP}$.

b) Použité magnetické pole

Magnetické pole bylo určeno 3 T MR tomografem, který je v IKEM pořízen a má multinukleární kanál ve své výbavě. Hodnocení vlivu velikosti magnetického pole na výsledky zátěžové ^{31}P MRS bylo provedeno ve srovnání se 7 T MR tomografem v CEMR a je probírán v oddílu 6.1.3.2. a v (Šedivý P. et al., 2015).

c) Výběr sekvence

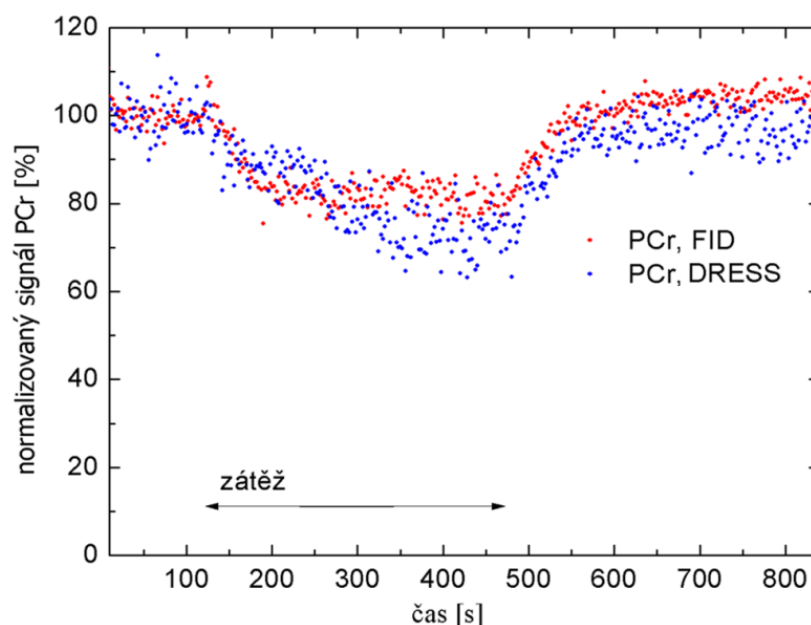
Z počátku řešení dizertační práce nebyly některé sekvence na MR tomografu v IKEM k dispozici (DRESS byl získán ve spolupráci s CEMR). Ani počáteční technické řešení ergometru v IKEM nebylo odpovídající k použití

lokalizované MR spektroskopie. Lýtkový sval nebyl dostatečně pevně fixován a pohyb na ergometru si částečně vynucoval pohyb celé končetiny.

Na základě těchto skutečností byl pro měření zátěžové ^{31}P MRS zvolen náběr signálu volné precese. Z hlediska metodiky se nejedná o nejmodernější přístup. Na druhou stranu je lokalizace v IKEM velkou měrou řešena použitím povrchové cívky (dostup maximálně cca 5 cm) a použití FID umožňuje dosažení dobrého časového rozlišení metabolických dat. Používaný repetiční čas 2 s je určitě dostatečný co do ohledu dobrého časového rozlišení (viz 5.1.2 a 6.1.4) a je i ideální co do provedení sešlapování, kdy osoby zvládnou vykonat sešlap a mít chodidlo cca 0,5 sekundy v klidu pro náběr dat. Klidové ^{31}P MR spektrum je měřeno stejně nelokalizovaně jako při zátěži, aby si jednotlivé signály z obou dvou sekvencí navzájem odpovídaly.

Po získání sekvence DRESS byla zkoušena i lokalizovaná MRS, ale protože nepřinášela zásadní vylepšení (dosahovalo se podobných poklesů PCr během zátěže jako při použití FID jen s menším SNR, viz Obr. č. 34) a jednotlivé skupiny pacientů byly už rozměřeny, nebyla ve větší míře využita.

Lokalizovaná klidová ^{31}P MR spektroskopie (sekvence ISIS, CSI) se používá zatím pouze pro vyšetření jater.

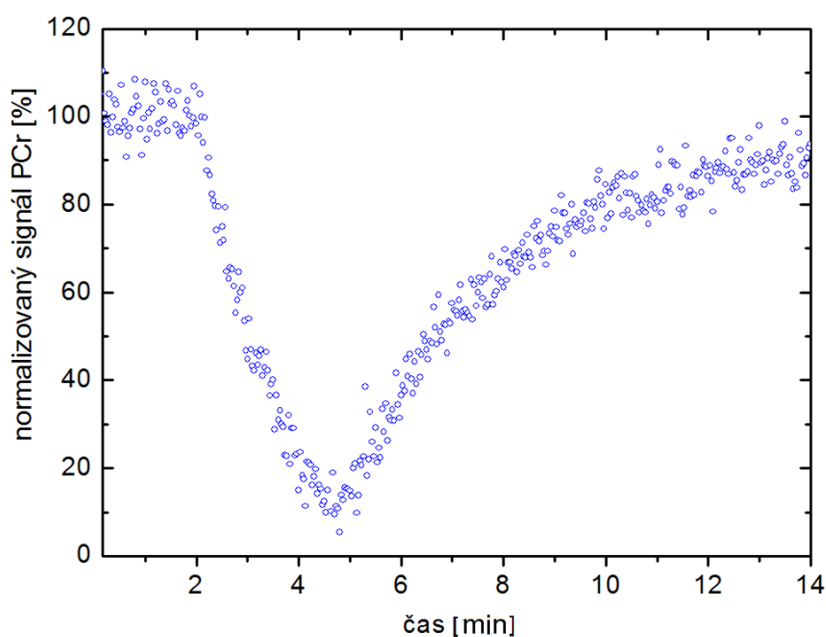


Obr. č. 34. Srovnání závislosti PCr změřeného pomocí DRESS a FID při stejné zátěži u stejné osoby.

d) Délka zátěže

Námi zvolený čas cvičení 6 minut odpovídá spíše delšímu času. V publikovaných studiích je délka zátěže velmi variabilní parametr a pohybuje se od několika desítek sekund izometrické zátěže (Willcocks R. J. et al., 2014) až k protokolům, kde vyšetřované osoby cvičí řadu minut, dokud jsou schopny (Pesta D. et al., 2013). Čím je protokol kratší, tím má sval menší možnost se dostat do acidózy, a tím zkreslit hodnotu τ_{PCr} a Q_{max} . Na druhou stranu delší protokoly umožňují dosáhnout stabilní hodnoty PCr (během 2-3 minut v závislosti na intenzitě kontrakcí) a dostatečného prokrvení, tak aby τ_{PCr} a Q_{max} byly co nejméně limitovány zásobením kyslíku (u zdravých netrénovaných osob se udává, že Q_{max} je právě limitována zásobením kyslíku (Layec G. et al., 2013b)).

Během zvoleného 6 minutového protokolu ve většině případů docházelo k dosažení dynamické rovnováhy PCr dříve než za 6 minut. Na druhou stranu delší čas umožňuje v případě nepochopení procedury subjekty lépe instruovat během samotné zátěže (po pořízení světelné signalizace těchto nedorozumění ubylo). Pro některé ischemické pacienty se protokol zátěže musel ojedinele zkrátit, protože PCr klesal rychle k nule bez vytvoření dynamické rovnováhy (viz Obr. č. 35), nebo se někteří pacienti cítili už příliš unaveni a přestali sami vykonávat zátěž.



Obr. č. 35. Ukázka závislosti PCr u pacienta s kritickou ischemií, kde musel být protokol zátěže zkrácen z 6 minut na 3 minuty. Regenerační perioda je poté prodloužena o čas zkrácení zátěže.

e) Velikost zátěže

Všem vyšetřovaným subjektům byla nastavována stejná uniformní zátěž. Dnes v publikovaných člancích převládá nastavování proměnné zátěže podle MVF. Konstantní zátěž byla v IKEM zvolena ze dvou důvodů. Prvním důvodem je, že až během řešení dizertační práce byl zkonstruován dynamometr na měření maximální vynutitelné síly. Druhým důvodem je, že velikost odporu pedálu v IKEM neurčuje celkovou fyzickou náročnost vyšetření, ale vyšetřovaný subjekt si do značné míry volí náročnost cvičení podle sebe tím, jakou měrou sešlapuje pedál. V našich možnostech bylo pouze monitorovat vykonanou práci a v případě potřeby, kdy nárůst P_i a pokles PCr se zdál být nedostatečný, pacienty nebo dobrovolníky slovně motivovat k většímu sešlapování pedálu.

Z metodického porovnání (Šedivý P. et al., 2015) mezi 7 kg a 10,5 kg závaží (dobrovolníci sešlapovali pedál stejnou měrou a navýšení zátěže přineslo odpovídající navýšení vykonané práce) vyplynulo, že je lepší zvolit vyšší zátěž, protože přináší větší reprodukovatelnost Q_{max} a její hodnoty jsou lépe porovnatelné i mezi jednotlivými vyšetřeními na jiných ergometrech v jiných institucích. Používaná zátěž však nebyla navýšena vzhledem k již probíhajícím studiím s pacienty se zátěží 7 kg.

f) Schéma zátěže

Obecně existují tři možnosti schématu cvičení: kontinuální vykonávání pohybu, pohyb s krátkým přerušením na náběr akvizice, pohyb s delšími přestávkami. Delší přestávky mezi jednotlivými kontrakcemi slouží k upraveným verzím vyhodnocení Q_{max} (Slade J. M. et al., 2006). Nejvíce kontrolovanou formou kontrakcí je elektrická stimulace, ale tato metoda potřebuje dodatečné experimentální vybavení pro excitaci, elektrody mohou způsobovat artefakty (Akbari A. et al., 2016) a elektrická kontrakce může způsobovat větší zapojení rychlých svalových vláken než kontrakce řízená vůlí (Vanderthommen M. et al., 2003). Pro potřeby vyšetření v IKEM bylo zvoleno kontinuální vykonávání pohybu. Nejdříve byly používány dvě sešlápnutí během 2 s. Tento protokol ale způsoboval pohybové artefakty, protože vyšetřované osoby často nestíhaly provést dvě rychlá sešlápnutí a mít nohu v klidu během okamžiku akvizice. S ohledem na plánované vyšetřování osob s větším postižením svalů a úpravami ergometru, které měly pohodlněji dovolovat větší rozsah sešlápnutí, bylo

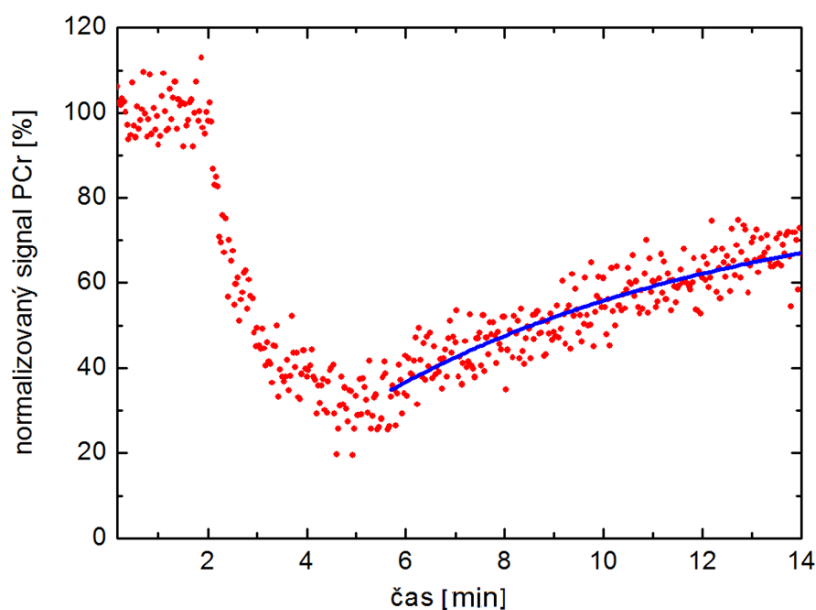
rozhodnuto změnit protokol v nově zahájených studiích (ischemičtí pacienti a pacienti se srdečním selháním).

g) Vybrané parametry

Vzhledem k omezeným možnostem regulace výkonu pacientů byl hlavní důraz kladen na určení parametrů spojených s oxidativní fosforylací (Q_{max}) a parametrů, jež se vyhodnocují z regenerační periody (V_{PCr} , τ_{PCr}). Hodnoty Q_{max} , které jsou v dizertační práci uváděny, jsou vypočteny podle vztahů odvozených z Michaelise-Mentenové kinetiky prvního řádu. Model kinetiky prvního řádu je ve vědeckých publikacích nejčastěji používán k určení mitochondriální kapacity, ačkoliv má nedostatky zmíněné v oddíle 3.2.4.2. Parametry, které se vážou přímo k prováděné zátěži (ΔPCr , pH_{cv}), jsou uváděny spolu s průměrným výkonem a dalšími parametry (průřez m. gastrocnemius, MVF) tak, aby šlo lépe srovnat jejich změnu.

Pro fitování PCr v regenerační periodě byla používána monoexponenciální funkce a téměř všechna naměřená data splňovala tuto závislost. Celková změna PCr při zátěži je počítána jako rozdíl signálu PCr na konci zátěže a na konci regenerační periody. V případech, kdy se PCr v regenerační periodě nestačil navrátit, byla použita hodnota signálu PCr před zahájením zátěže (viz Obr. č. 36).

Při štěpení anorganického fosfátu je v práci uvedeno pH svalu od signálu, který měl na konci cvičení větší intenzitu.



Obr. č. 36. Ukázka závislosti PCr u pacienta s kritickou ischemií, kde se PCr po provedené zátěži nestačil vrátit na klidové hodnoty ani do konce regenerační periody.

6.1.3 Hodnocení reprodukovatelnosti zátěžové ³¹P MRS a posouzení vlivu magnetického pole a experimentálního vybavení na výsledné parametry zátěžové ³¹P MRS

6.1.3.1 Reprodukovatelnost měření

Jak koeficienty variace, tak i intra-class korelační koeficienty (viz Tab. č. 4) ukázaly vysokou reprodukovatelnost určení Q_{max} při obou testovaných protokolech (7 a 10,5 kg závaží). Zjištěná reprodukovatelnost Q_{max} byla obecně vyšší u vyšší zátěže a v IKEM v porovnání s Vidní. Vyšší reprodukovatelnost Q_{max} v IKEM souvisí pravděpodobně s relativně vyšším poklesem PCr docíleným v IKEM (viz Tab. č. 6). Růst reprodukovatelnosti s vyšší zátěží referoval i Layec (Layec G. et al., 2009).

6.1.3.2 Vliv magnetického pole

Použití vyššího magnetického pole (7 T vůči 3 T) ukázalo svoji prospěšnost v podobě nárůstu ³¹P MR poměru signálu vůči šumu (SNR), zvýšení přesnosti fitování jednotlivých metabolitů ve spektru a regenerační křivky PCr. Naproti tomu zjištěné reprodukovatelnosti parametrů pomocí Testu-Retestu jsou podobně vysoké při obou polích. Výsledné hodnoty mitochondriální kapacity také ukazují dobrou shodu mezi 3 T a 7 T, tudíž vyšetření nelokalizovanou zátěžovou ³¹P MRS na 3 T podává kvantitativně stejně platné výsledky jako na 7 T, ačkoliv parametry šumu a věrohodnosti fitování tomu na první pohled nenasvědčují. Mimo to vyšší magnetické pole přináší potíže s dostatečným frekvenčním rozsahem pulzů kvůli SAR limitu a zejména u některých patientských skupin je problém s MR kompatibilitou různých bioimplantátů, protože většina implantátů (stenty aj.) není testována pro použití v magnetickém poli větším než 3 T.

6.1.3.3 Vliv použité cívky a ergometru

Při porovnání výsledků dosažených v IKEM a v CEMR (viz Tab. č. 6) bylo zjištěno, že v IKEM je měřena vyšší klidová koncentrace PCr a že zátěž způsobuje větší pokles PCr. Uvedené rozdíly, zejména při nižší zátěži, způsobily dosažení vyššího V_{PCr} a Q_{max} v IKEM (viz Tab. č. 4). Při vyšší zátěži byla už shoda mitochondriální kapacity

z vyšetření provedených na obou pracovištích velmi dobrá (limity shody: -0,13 – 0,21 mM).

Rozdíl ve vypočítané koncentraci PCr je pravděpodobně způsoben odlišným detekčním profilem cívky v IKEM a v CEMR. Jak vyplývá z Tab. č. 7, povrchová cívka v IKEM lépe pokrývá svaly lýtky, respektive přijímá relativně více signálu ze svalu *m. gastrocnemius medialis*. U tohoto svalu byla referována větší koncentrace PCr (Valkovič L. et al., 2014) a větší podíl svalové práce na svalové kontrakci při obdobném pohybu (Meyerspeer M. et al., 2012) než u *m. gastrocnemius lateralis*. Větší podíl *m. gastrocnemius medialis* na svalové kontrakci by mohl vysvětlit i relativně větší pokles PCr v IKEM. Druhým vysvětlením pro větší pokles PCr je odlišná konstrukce pedálu ergometru v IKEM a v CEMR. Konstrukce ergometru před druhou přestavbou dovolovala větší rozsah pohybu chodidla. Ergometr v IKEM má po první i druhé přestavbě menší úhlové omezení pohybu než v CEMR, což na něm dovoluje při stejném odporu dosáhnout většího výkonu, a tím většího poklesu PCr. Kromě rozsahu pedálu také odlišná pozice osy rotace pedálu mohla způsobovat odlišný příspěvek jednotlivých svalů lýtky do cvičení, jak dokládá ¹H MR EPI zobrazení po provedené zátěži mezi dvěma verzemi ergometru. Mimo odlišného průměru cívky a konstrukce šlapadla je možným zdrojem rozdílných hodnot PCr i umístování cívek, které nemohlo být zcela přesně reprodukováno vzhledem k jejich odlišným rozměrům (cívky se umísťovaly vždy pod nejširší část lýtkového svalu).

Provedené srovnání v IKEM a v CEMR ukazuje i vliv velikosti zátěže na hodnotu Q_{max} , která na obou ergometrech roste s použitou zátěží, z čehož vyplývá důležitý závěr, že vypočítanou hodnotu Q_{max} nelze zcela jednoznačně brát jako nezávislý a jedinečný parametr, který charakterizuje dotyčného pacienta. Na druhou stranu při zvyšování zátěže se postupně snižuje rozdíl ve vypočítané Q_{max} , což by mohlo znamenat, že vyšší zátěž pomáhá lépe určit skutečnou Q_{max} . Jinými slovy, s narůstající hodnotou zátěže se vypočítaná hodnota Q_{max} čím dál víc limitně blíží skutečné hodnotě Q_{max} . Toto tvrzení ale platí pouze za podmínky, že zátěž nezpůsobuje významnou acidózu, která by naopak mohla inhibovat resyntézu PCr a snižovat vypočítanou hodnotu Q_{max} , viz rozbor v oddílu 6.1.1.

6.1.4 Simulace vlivu parametrů vyšetření na přesnost určení τ_{PCr}

Na přesnost kvantifikace τ_{PCr} má vliv řada faktorů. Některé faktory lze ovlivnit nastavením protokolu, některé další souvisí se samotným fitováním regenerační křivky. Faktory, které lze ovlivnit nastavením protokolu, jsou velikost poklesu PCr a frekvence vzorkování měření. Důležitým faktorem je i velikost šumu, kterou lze snížit během vyšetření ručním doladěním homogenity magnetického pole, použitím decouplingu nebo sčítáním akvizic (velikost šumu a vzorkovací frekvence jsou do jisté míry spojené parametry). K parametrům souvisejícím s fitováním patří použitá fitovací funkce, matematická metoda hledání koeficientů této funkce, nastavení počátečních iteračních hodnot, počet iterací, určení váhy jednotlivých bodů PCr atd.

Monte Carlo simulace mohou předem podat informaci, v jakém rozptylu hodnot při daném poklesu PCr se bude pohybovat τ_{PCr} vlivem pouhého šumu (vyjadřuje individuální spolehlivost, respektive průměrnou míru opakovatelnosti měření) a zda použitá metoda fitování je opravdu spolehlivá a nedává hodnoty, které neodpovídají skutečnému τ_{PCr} . V kapitole Výsledky (oddíl 5.1.2) je na grafech na Obr. č. 16 ukázán vliv šumu a vliv skutečné velikosti τ_{PCr} a velikosti poklesu PCr během zátěže na relativní rozptyl a skutečnou chybu hodnot τ_{PCr} . Z grafů je patrné, že na relativní rozptyl hodnot má spíše vliv velikost šumu a velikost poklesu PCr než samotná velikost τ_{PCr} . Pro větší hodnoty šumu rozptyl τ_{PCr} s nižším poklesem PCr roste nad přijatelné hodnoty. Ještě důležitější je graf relativní chyby τ_{PCr} , který ukazuje, že pro vyšší šum a malé poklesy PCr začíná fitování poskytovat i průměrné nepravdivé hodnoty.

Na grafech na Obr. č. 17 je ukázán vliv poklesu PCr a frekvence vzorkování na rozptyl a samotnou vypočtenou hodnotu τ_{PCr} . Frekvence vzorkování nemá překvapivě tak velký negativní vliv na rozptyl hodnot τ_{PCr} a téměř žádný na výslednou hodnotu τ_{PCr} . Z grafu 17B lze také názorně vidět, jak se jednotlivé hodnoty τ_{PCr} s klesajícím poklesem PCr odchyľují od skutečné hodnoty $\tau_{PCr} = 50$ s a blíží se k hodnotě $\tau_{PCr} = 40$ s, což byl startovací parametr pro fitovací proceduru.

6.1.5 ¹H EPI MR zobrazení svalu po zátěži

6.1.5.1 Zapojení svalu z pohledu ¹H MRI

Nalezené největší zapojení m. gastrocnemius medialis je ve shodě s dříve publikovanou studií (Meyerspeer M. et al., 2012) využívající lokalizovanou ³¹P MR spektroskopii (práce ukazuje větší příspěvek z m. gastrocnemius medialis na obdobném typu ergometru) a vysvětluje také pozorovaný větší pokles PCr u vyšetření prováděných v IKEM vůči vyšetřením prováděným v CEMR (s přihlédnutím k detekčnímu objemu cívk v IKEM, která detekuje více signálu m. gastrocnemius medialis než cívka v CEMR).

Po přestavbě ergometru je překvapujícím zjištěním nalezené zapojení m. peroneus longus do flexe, protože přestavba ergometru měla sloužit k omezení nežádoucích pohybů dolní končetiny tak, aby se zapojoval jen m. gastrocnemius. Na druhou stranu zapojení m. peroneus longus může být důsledkem toho, že na ergometru je po přestavbě pohodlné vykonávat pohyb v kotníku ve větším rozsahu bez nutnosti zapojení pohybu celé končetiny, čímž je na svaly lýtky kladena větší zátěž a do svalové činnosti se musí zapojit všechny flexory chodidla.

6.2 *Klinické výsledky*

Na základě klinických výsledků dizertační práce vzniklo několik publikací a řada konferenčních příspěvků na evropských i světových radiologických kongresech. Diabetu typu 1 se věnuje zejména publikace (Sedivy P. et al., 2018). Problémem tkáňové ischemie u diabetických pacientů v efektu léčby kmenovými buňkami a PTA se věnuje publikace (Němcová A. et al., 2017) a několik příspěvků z českých (Angiologické dny), z evropských (ESMRMB) a ze světových (ISMIRM) konferencí (viz přílohy dizertační práce). Menší případové studie ischemických pacientů jsou uvedeny v (Hájek M. et al., 2017) a v (Šedivý P. et al., 2017). Tyto publikace podávají i přehled klinického využití ^{31}P MRS a jsou určeny pro širokou lékařskou veřejnost. Srovnání projevu středně závažné a kritické ischemie na svalový metabolismus je shrnuto v (Sedivy P. et al., v tisku).

Téma dizertační práce také pokrývá publikovaný článek (Hejlová I. et al., 2016) věnující se metabolickým změnám svalového metabolismu u pacientů po transplantaci jater v závislosti na stupni jaterní steatózy.

6.2.1 ^{31}P MRS u pacientů s diabetem mellitus - vliv nefropatie

Porovnání zdravých kontrol a nekomplikovaných DM1 pacientů a DM1 pacientů s nefropatií prokázalo negativní vliv nefropatie na svalový metabolismus. Nekomplikovaní DM1 pacienti neměli žádné signifikantní rozdíly v klidovém ^{31}P metabolismu vůči kontrolám, pouze při zátěži byl nalezen trend k pomalejší pozátěžové regeneraci PCr. Nenalezení signifikantních klidových změn u nekomplikovaných DM1 pacientů je nejspíše důsledkem velmi dobré kompenzace diabetu. Zmíněný trend k větším hodnotám τ_{PCr} je ve shodě s horším oxidativním metabolismem u publikovaných nekomplikovaných DM1 pacientů (Crowther G. J. et al., 2003; Kacerovsky M. et al., 2011).

Podrobná diskuze k pohlavně specifickým změnám je uvedena v publikovaném článku (Sedivy P. et al., 2018).

6.2.2 ³¹P MRS u pacientů s ischemií dolních končetin v kombinaci s diabetem mellitus

Diagnostika končetinové ischemie je u pacientů s diabetem obtížná, protože standardní metody pro hodnocení ischemie, jako je index kotníkových tlaků nebo i CT angiografické vyšetření, mohou být zkresleny mediokalcinózou. Navíc CT angiografie představuje radiační zátěž a podání kontrastní látky zatěžuje ledviny, které jsou u diabetiků často poškozeny. Podobně může být neuropatií zkresleno i zátěžové vyšetření na chodícím páse. Nejstandardnější používanou metodou je u diabetických pacientů měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂), avšak tato metoda hodnotí prokrvení jen v úzké povrchové vrstvě. Cílem provedené studie uvedené v dizertační práci bylo určit přínos a limity ³¹P MRS pro vyšetření pacientů v různém stupni ischemie a zároveň v daných skupinách charakterizovat metabolické postižení tkáně. Druhým cílem bylo hodnotit efekt léčby PTA nebo transplantace mezenchymálních kmenových buněk u osob, kde léčba PTA už nepřichází v úvahu kvůli technicky neřešitelnému cévnímu postižení nebo vysokému operačnímu riziku.

6.2.2.1 Dosažené výsledky v klidu a při zátěži u ischemických pacientů

Dosažené výsledky dokazují, že lze pomocí klidové a zátěžové ³¹P MRS rozčlenit pacienty podle závažnosti ischemie. Při mírné až střední ischemii dochází k ovlivnění metabolismu pouze při zátěži, při závažnějším poškození (kritické ischemii) dochází i k výraznému ovlivnění klidového svalového metabolismu.

Za klidového stavu nalezený vzrůst Pi a pokles PCr a ATP demonstrují, jak je v souvislosti s kritickou ischemií snížena aktuální klidová zásoba makroergních fosforových sloučenin. Zjištěné poškození klidového svalového metabolismu je podobné změnám, které se vyskytují při dalších svalových onemocněních (viz oddíl 3.2.6) nebo které již dříve popsal Zatina (Zatina M. A. et al., 1986) u pacientů s ischemií dolních končetin. Druhým jevem, který není tak úplně očekávaný ve srovnání se stavem při zátěži, je výrazný posun klidového pH do zásaditých hodnot u některých pacientů dokonce s pozorovaným klidovým štěpením signálu Pi. Ačkoliv je klidová změna pH relativně malá ve srovnání se změnami, k nimž dochází při zátěži, je tato změna signifikantní a lze ji pozorovat i u pacientů s méně závažnou ischemií. Změna je uváděna i v jiných publikovaných člancích (Suzuki E. et al., 2000; Wahl D. G. et al., 1994). Posun pH lze vysvětlit několika způsoby. Může se jednat o posun pH v důsledku

posunu klidové rovnováhy kreatin-kinázové reakce (pacienti mají více Pi a méně PCr a kreatin-kinázová reakce spotřebovává H^+) (Wahl D. G. et al., 1994). Jiným vysvětlením může být, že buňka nestačí udržovat svoji homeostázu vůči extracelulárnímu prostředí, které je více zásadité. Klidové štěpení anorganického fosfátu souvisí nejspíše se vznikem dvou kompartmentů, jeden s fyziologickým pH a druhý s výrazně posunutým pH do zásaditějších hodnot. Zásaditější signál Pi a jeho velikost je v některých vědeckých studiích provedených na 7 T MR tomografech ztotožňována s obsahem mitochondriálního Pi (van Oorschot J. W. M. et al., 2013; Valkovič L. et al., 2016), přičemž platí, že jeho vyšší hodnoty jsou spojeny s výkonnějším oxidativním metabolismem. V naší provedené studii bylo štěpení pozorováno u pacientů s kritickou ischemií, kdy pacienti již měli i edém lýtky a mnohočetné ulcerace, proto druhý signál Pi s nejvyšší pravděpodobností nepochází z mitochondrií, ale jedná se o signál pocházející z velmi poškozených buněk (dva kompartmenty – méně a více poškozené buňky) nebo jde o signál Pi z extracelulárního prostředí, které je zvětšeno zmíněným edémem.

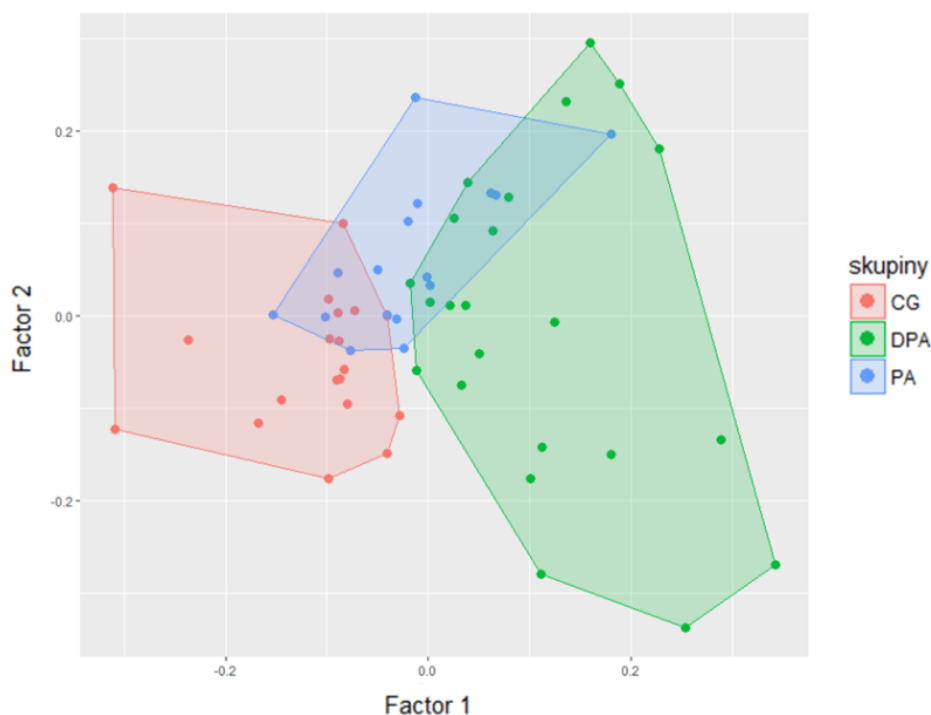
Pacienti s mírnou až střední ischemií měli v klidu pouze zvýšené pH a korelovanou hodnotu poměru $\beta ATP/P_{tot}$ s ABI indexem, což svědčí o tom, že jejich klidový metabolismus není velkou měrou limitován daným onemocněním.

Oproti klidovým výsledkům ^{31}P MRS byly výrazné změny nalezeny v metabolismu při zátěži už u pacientů s méně závažnou ischemií. Při zátěži byl pozorován trend k horším hodnotám τ_{PCr} , Q_{max} od zdravých kontrol přes subjekty se středně závažnou ischemií až k pacientům s kritickou končetinovou ischemií. U pacientů byl také detekován větší pokles PCr a pH během zátěže při menším normalizovaném výkonu (na průřez svalu) než u zdravých kontrol (Obr. č. 28 a Tab. č. 10), což ukazuje na menší toleranci k zátěži a odůvodňuje klaudikace a restrikcí vzdálenosti, které jsou schopni urazit chůzí.

U pacientů se jevil nejmarkantnějším znakem ischemie τ_{PCr} , který se u některých pacientů zvětšil více než desetinásobně oproti průměrné hodnotě τ_{PCr} zdravých kontrol. Na druhou stranu ani tento a ani žádný jiný parametr zátěžové ^{31}P MRS nekoreloval s parametry standardních klinických metod. To může být dáno tím, že ABI má větší vztah ke klidovému metabolismu (zde byla naopak nalezena signifikantní korelace) než k metabolismu při zátěži, délka chůze na páse je ovlivněna subjektivními pocity osob a $TcpO_2$ je úměrné prokrvení pouze v úzkém pásu při povrchu těla na rozdíl od ^{31}P MRS, jež detekuje metabolické změny z celého objemu svalů. Čtvrtým důležitým

faktorem pro nalezení korelací je pozice ischemie, která v případě pacientů s kritickou ischemií progredovala do nejhoršího stavu až na chodidle (z této oblasti také pochází hodnota $TcpO_2$).

Pro lepší rozčlenění pacientů pomocí klidové a zátěžové ^{31}P MRS do jednotlivých skupin lze využít analýzu hlavních komponent (PCA) nebo lineární diskriminační analýzu, která spojí jednotlivé klidové a zátěžové parametry do nových proměnných lépe vystihujících variabilitu dat nebo rozdělení subjektů podle stupně onemocnění. Na Obr. č. 37 je ukázáno úspěšné rozčlenění kontrol a pacientů s kritickou končetinovou ischemií s použitím PCA analýzy.



Obr. č. 37. Grafické znázornění jednotlivých pacientů (CG – zdravé kontroly, PA – pacienti s mírnou až střední ischemií, DPA – pacienti s kritickou ischemií) v nových proměnných metodou PCA (značeny faktor 1 a 2).

6.2.2.2 Efekt léčby ischemie na svalový metabolismus

V dizertační práci byl zkoumán efekt dvou typů léčby na svalový metabolismus u pacientů s kritickou končetinovou ischemií. První typ léčby byla PTA v případné kombinaci s implantací stentu. Léčba představuje klasický způsob léčby kritické končetinové ischemie. Její efekt na svalový metabolismus byl i v minulosti zkoumán pomocí ^{31}P MRS (Brotzakis P., 1995; Hands L. J. et al., 1986; Schunk K. et al., 1998; West A. M. et al., 2012; Zatina M. A. et al., 1986). V uvedených publikacích se dospělo k závěru, že PTA má pozitivní efekt, ale že zcela nenavrací metabolismus do normálu.

Druhý typ léčby se řadí k experimentální léčbě pomocí implantace mezenchymálních buněk, které by měly zvýšit angiogenezi, a tím zlepšit i perfúzi dolní končetiny. Tento typ léčby nebyl nikdy zkoumán pomocí ^{31}P MRS. Cílem provedené studie nebylo určit, která ze dvou metod je účinnější v léčbě kritické končetinové ischemie, nýbrž pouze zjistit, zda i u diabetických pacientů s kritickou ischemií dochází k detekovatelné úpravě fosforového metabolismu alespoň po jedné z těchto intervencí v odstupu 3 měsíců. Po třech měsících od PTA a ani po léčbě kmenovými buňkami však nebylo pozorováno žádné signifikantní zlepšení svalového metabolismu. Porovnání je ovlivněno malým počtem subjektů, kdy při zátěži po třech měsících léčby kmenovými buňkami bylo k dispozici pouze 5 osob a po PTA dokonce pouze 4 osoby. V malých skupinách by musel být efekt léčby velmi výrazný, aby prokázal statistickou významnost, ale i bez přihlídnutí k hodnotám statistické významnosti je patrné, že hodnoty po léčbě zejména u PTA se výrazně nezměnily.

V případě klidového porovnání je k dispozici více naměřených subjektů, u transplantace buněk celkem 13 osob. V této podskupině pacientů došlo k signifikantnímu zlepšení hodnoty transkutánní tenze, avšak pouze poměr $\beta\text{ATP}/\text{P}_{\text{tot}}$ má trend k vyšším, respektive lepším (kontrolním) hodnotám. Po PTA jsou změny v metabolismu svalu ještě menší než u léčby kmenovými buňkami. Nenalezení signifikantního zlepšení klidového svalového metabolismu ale bylo očekávané, protože v publikovaných studiích se referuje zejména o změnách při zátěži po revaskularizaci. Zatina například ve své studii (Zatina M. A. et al., 1986) uvádí, že u mnoha pacientů nedošlo ke zlepšení klidového metabolismu po PTA ani po dlouhé době po zákroku. Klidové zlepšení uvádí pouze Brotzakis, ale ten vyšetřoval pacienty po PTA pro akutně vzniklou ischemii, což je značně rozdílný stav od chronické ischemie při syndromu diabetické nohy.

Pro hodnocení, zda revaskularizace u pacientů s diabetem má alespoň okamžitý efekt na svalový metabolismus, bylo vyšetření klidovou a zátěžovou ^{31}P MRS provedeno i den po PTA. Porovnání metabolismu ihned po revaskularizaci má výhodu v tom, že není riziko zhoršení ischemie novými uzávěry. Po třech měsících sledování efektu revaskularizace může dojít k vytvoření nových uzávěrů, případně i zlepšené prokrvení může být stále nedostatečné a místo regenerace svalových buněk se může stav končetiny v průběhu 3 měsíců naopak zhoršovat.

V případě provedeného porovnání nebyly k dispozici hodnoty transkutánní tenze ihned po zákroku, ale všechny PTA byly angiograficky hodnoceny jako alespoň

částečně úspěšné (alespoň s jedním zvětšením průtoku v jedné arterii). V případě zátěže byla zjištěna u pacientů signifikantně rychlejší obnova PCr (zkrácen τ_{PCr}), vyšší byly i hodnoty Q_{max} a pH_{cv} . V klidovém metabolismu nebyly nalezeny žádné signifikantní změny, což je ale konzistentní s dříve diskutovaným stavem po 3 měsících. Jednotlivá zlepšení metabolismu jsou však hodně variabilní. U některých pacientů nebyla při zátěži nalezena žádná změna, u některých poměrně velká (viz graf na Obr. č. 31), což může souviset s místem a s úspěšností rozšíření tepny vůči pozici, z které je měřena ^{31}P MRS. Druhým důležitým faktorem pro posouzení velikosti zlepšení metabolických funkcí svalu je, do jaké míry byl příčinou uzávěr tepny, protože defekt svalového metabolismu může částečně pocházet i z poškozené mikrocirkulace a ze svalových buněk, které nepříznivě reagují na dlouhodobou ischemii, jak bylo zmíněno v oddílu 3.2.6.1.

Při velmi úspěšné PTA, kdy je ischemie nejspíše dána zejména uzávěry, lze individuálně pozorovat výrazné změny i na klidovém metabolismu diabetiků po PTA, jak dokládá Obr. č. 32.

6.2.2.3 ^{31}P saturační transfer u ischemických pacientů a zdravých kontrol

Provedené měření ^{31}P saturačního transferu prokazuje negativní působení ischemie i na průběh kreatin-kinázové reakce v klidovém stavu. Pacienti s kritickou ischemií měli signifikantně nižší hodnotu $1 - \frac{I_{PCr}^{sat}}{I_{PCr}}$, respektive velikost aparentní rychlostní konstanty kreatin-kinázové reakce. Samotná hodnota $F_{PCr \rightarrow ATP}$ nebyla signifikantně nižší, což je ale způsobeno nárůstem poměru PCr/ β ATP, respektive koncentrace PCr (viz Tab. č. 13). Vyšší poměr PCr/ β ATP je pravděpodobně způsoben poklesem koncentrace ATP než vyšším zastoupením PCr ve svalu ischemických pacientů, jak dokládá snížený poměr β ATP/ P_{tot} . Druhou nedokonalostí provedeného srovnání pacientů a kontrol je odlišný věk skupin. Kontroly ale byly zvoleny tak, aby vydržely celý protokol i s IR částí. Hodnoty jsou pak i s větší věrohodností srovnatelné s dříve publikovanými hodnotami Valkoviče (Valkovič L. et al., 2013, 2013).

Třetí nedostatek představuje hodnota $T1_{PCr}^{app}$, která byla použita stejná pro všechny pacienty podle průměrné kontrolní hodnoty. $T1_{PCr}^{app}$ má u zdravých dobrovolníků v IKEM malý relativní rozptyl (7 %) stejně jako hodnoty uváděné v publikované práci Valkoviče (Valkovič L. et al., 2013) (8 %), ale jedná se o zdravé mladé osoby. U pacientů mohou být rozptyl i samotná hodnota $T1_{PCr}^{app}$ výrazně jiné.

Vyjma experimentálních obtíží v patientské skupině vykazují hodnoty zdravých dobrovolníků $T1_{PCr}^{app}$ i $k_{PCr \rightarrow ATP}$ dobrou shodu (rozdíl pouze 10 %) s publikovanými hodnotami $T1_{PCr}^{app} = 1,7 \pm 0,1$ s a $k_{PCr \rightarrow ATP} = 0,31 \pm 0,04$ s⁻¹ (Valkovič L. et al., 2013), takže použitý protokol a způsob vyhodnocení naměřených dat lze považovat za správný a lze ho využívat i v budoucnu.

Mimo určení $F_{PCr \rightarrow ATP}$ technika saturačního transferu umožňuje určit i $F_{Pi \rightarrow ATP}$. Bohužel však uvedený vyšetřovací protokol a experimentální vybavení v IKEM neposkytlo dostatečný SNR pro věrohodné určení změny $\frac{I_{Pi}^{sat}}{I_{Pi}}$ u ischemických pacientů. Navíc pro výpočet $k_{Pi \rightarrow ATP}$ je potřeba $T1_{Pi}^{app}$ a u něj je popsán (Valkovič L. et al., 2013) výrazně větší rozptyl (cca 20 %) i mezi zdravými osobami, tudíž celý protokol i s IR částí by museli podstupovat i pacienti.

6.2.3 Srdeční selhání

Provedená studie vlivu srdečního selhání na svalový metabolismus potvrzuje jeho negativní efekt (viz oddíl 3.2.6.2). Signifikantní rozdíly byly nalezeny jak v klidovém metabolismu, a to snížené zastoupení makroergních fosfátových sloučenin (zejména ATP), tak i při zátěži, v jejímž průběhu byl pozorován větší pokles PCr (i po normalizaci na výkon). Navíc po zátěži byla nalezena pomalejší obnova PCr. Zjištěná mitochondriální kapacita nebyla sice signifikantně snižena, ale její hodnoty byly mírně menší a navíc menší koncentrace ATP v poměru PCr/ATP mohly nadhodnotit výpočet absolutní velikosti poklesu PCr, respektive Q_{max} .

Chronické selhání srdce je často spojeno se sideropenií v důsledku sníženého příjmu železa, krevních ztrát či malabsorpce Fe (Jankowska E. A. et al., 2013). Celkový snížený obsah železa zhoršuje toleranci k zátěži a zvyšuje mortalitu pacientů se srdečním selháním (Cleland J. G. F. et al., 2016; Okonko D. O. et al., 2011) nezávisle na souběžné anemii. To je nejspíše dáno faktem, že samotné železo je potřebnou součástí myoglobinu a komplexu dýchacího řetězce mitochondrií v kosterním a srdečním svalu (Blayney L. et al., 1976; Finch C. A. et al., 1976).

Sideropenie u pacientů se srdečním selháním vyšetřených v IKEM opravdu prohlubovala zjištěné negativní změny v metabolismu kosterního svalu. Při zátěži měli sideropeničtí pacienti větší relativní pokles PCr, který byl spojen s poklesem pH. Navíc byla u nich zjištěna nižší maximální síla při obdobném průřezu svalu m. gastrocnemius

než u nesideropenických pacientů. Zjištěný negativní efekt sideropenie na svalový metabolismus pomocí ^{31}P MRS potvrzuje nejen tato provedená studie, ale i studie Thompsona (Thomson C. H. et al., 1993) na potkanech i na lidech (Thomson C. H. et al., 1993). Thompson ve studii provedené na pacientech (pouze ženy bez srdečního selhání se sideropenií z chronických krevních ztrát) také našel, že dochází při zátěži k signifikantně většímu poklesu PCr a vzrůstu Pi. Po zátěži měly jeho pacientky signifikantně snížené pouze V_{PCr} na rozdíl od mitochondriální kapacity, která byla stejná či jen mírně zmenšená. Při srovnání s Tab. č. 14 je patrné, že se jedná o velmi analogické změny, které lze pozorovat u pacientů, kteří mají navíc srdeční selhání. Jediný podstatný rozdíl je v chování τ_{PCr} . V Thompsonově studii byl τ_{PCr} u sideropenických patientek překvapivě spíše kratší na rozdíl od sideropenických pacientů v IKEM, kde τ_{PCr} má trend být spíše delší (s $p = 0,06$). Delší τ_{PCr} u sideropenických pacientů v IKEM je pravděpodobně dán kombinací druhého onemocnění, které více zdůrazňuje negativní efekt sideropenie na svalový metabolismus.

V provedené studii v IKEM se zkoumal i vliv podaného léčebného přípravku karboxymaltózy železa na zdravotní stav u 13 osob se sideropenií a srdečním selháním. Relativně malý počet vyšetřených osob po léčbě karboxymaltózou železa byl dán situací, kdy část pacientů zemřela nebo u nich bylo přikročeno i k jiné léčbě, zejména k implantaci kardiostimulátoru. U pacientů došlo k úpravě sideropenie i k zlepšení subjektivních příznaků srdečního selhání po jednom měsíci léčby. ^{31}P MRS ale neukázala žádné objektivní zlepšení svalového metabolismu (pouze byl zjištěn nárůst maximální vynutitelné síly). Provedené porovnání má slabinu v počtu léčených osob, v délce sledování pacientů, a že se nejedná o zaslepenou studii s placebem.

Nepřítomnost zlepšení svalového metabolismu léčbou Fe přípravku může být dáno faktem, že se efekt vyrovnání hladiny železa v organismu projeví po delší době, než je pouhý jeden měsíc, zejména pokud nedostatek železa poškodil samotné mitochondrie ve svalu. Ve velké a zaslepené studii s placebem (300 osob) publikované v roce 2015 (Ponikowski P. et al., 2015) její autoři pozorovali signifikantní zlepšení u pacientů se srdečním selháním a sideropenií až po více než třech měsících léčby Fe přípravkem. Nepříznivým faktorem pro porovnání výsledků svalového metabolismu u jednotlivých pacientů může být i samotná progresse srdečního selhání.

7 Závěr

V rámci řešení dizertační práce byly získány důležité metodické a klinické poznatky týkající se zejména ^{31}P MRS prováděné během fyzické zátěže. Z metodických výsledků se jedná o navržené a následně provedené změny na experimentálním vybavení pro zátěžové vyšetření ^{31}P MRS na 3 T tomografu IKEM: a) změna konstrukce osy rotace pedálu; b) synchronizace MR měření s cvičením; c) upevnění končetiny v ergometru. Pro vyhodnocování dat ze zátěžové ^{31}P MRS i z MR zobrazení vázající se na provedenou zátěž byly naprogramovány GUI aplikace v Matlabu, které výrazně urychlují zpracování vyšetření.

Klinické výsledky dizertační práce zahrnují poznatky týkající se svalového metabolismu u pacientů s ischemií dolních končetin (Hájek M. et al., 2017; Němcová A. et al., 2017; Šedivý P. et al., 2017, Sedivý P. et al., v tisku), diabetu (Sedivý P. et al., 2018) a pacienty se srdečním selháním. Ukázalo se, že kombinace klidové a zátěžové ^{31}P MR spektroskopie umožňuje na základě objektivních dat ze spektroskopického vyšetřování rozdělit pacienty podle klinického obrazu. U kritické ischemie lze sledovat efekt léčby PTA nebo experimentální léčby kmenovými buňkami na svalový metabolismus. Signifikantní změny ve zrychlení návratu PCr do klidových hodnot ihned po revaskularizaci PTA umožňují hodnotit výsledky léčby. Podobně jde použít i MR spektroskopii pro sledování změn při podávání léčiv, jak bylo ukázáno na skupině pacientů se sideropenií.

Získané výsledky jsou v souladu se zadáním dizertační práce a byly prezentovány v několika publikacích a řadě přednášek na domácích a zahraničních akcích.

8 Literatura

- ADAMOPOULOS, S.; COATS, A.J.; BRUNOTTE, F.; ARNOLDA, L.; MEYER, T.; THOMPSON, C.H.; DUNN, J.F.; STRATTON, J.; KEMP, G.J.; RADDA, G.K. Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1993, 21(5), 1101–1106. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8459063>
- AKBARI, A.; ROCKEL, C.P.; KUMBHARE, D.A.; NOSEWORTHY, M.D. Safe MRI-Compatible electrical muscle stimulation (EMS) system. *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI*. 2016, 44(6), 1530–1538. Dostupné z: DOI:10.1002/jmri.25316
- ALLEN, D.G.; LAMB, G.D.; WESTERBLAD, H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiological Reviews*. 2008, 88(1), 287–332. Dostupné z: DOI:10.1152/physrev.00015.2007
- ALTMAN, D.G.; BLAND, J.M. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician*. 1983, 32, 307–317. Dostupné z: <http://people.stat.sfu.ca/~raltman/stat300/AltmanBland.pdf>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 9. Microvascular Complications and Foot Care. *Diabetes Care*. 2015, 38(Supplement_1), S58–S66. Dostupné z: DOI:10.2337/dc15-S012
- ANDERSON, J.D.; EPSTEIN, F.H.; MEYER, C.H.; HAGSPIEL, K.D.; WANG, H.; BERR, S.S.; HARTHUN, N.L.; WELTMAN, A.; DIMARIA, J.M.; WEST, A.M.; KRAMER, C.M. Multifactorial Determinants of Functional Capacity in Peripheral Arterial Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009, 54(7), 628–635. Dostupné z: DOI:10.1016/j.jacc.2009.01.080
- ARGOV, Z.; BANK, W.J.; MARCHIS, J.; LEIGH, J.S.; CHANCE, B. Muscle energy metabolism in human phosphofructokinase deficiency as recorded by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Annals of Neurology*. 1987, 22(1), 46–51. Dostupné z: DOI:10.1002/ana.410220112
- ARGOV, Z.; BANK, W.J.; MARIS, J.; PETERSON, P.; CHANCE, B. Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies: phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Neurology*. 1987, 37(2), 257–262. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3808305>
- ARGOV, Z.; DE STEFANO, N.; ARNOLD, D.L. ADP recovery after a brief ischemic exercise in normal and diseased human muscle--a ³¹P MRS study. *NMR in Biomedicine*. 1996, 9(4), 165–172. Dostupné z: DOI:10.1002/(SICI)1099-1492(199606)9:4
- ARGOV, Z.; LÖFBERG, M.; ARNOLD, D.L. Insights into muscle diseases gained by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Muscle Nerve*. 2000, 23(9), 1316–1334. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951434>
- ARNOLD, D.L.; MATTHEWS, P.M.; RADDA, G.K. Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of ³¹P NMR. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1984, 1(3), 307–315. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6571561>
- ARNOLD, D.L.; TAYLOR, D.J.; RADDA, G.K. Investigation of human mitochondrial myopathies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Annals of Neurology*. 1985, 18(2), 189–196. Dostupné z: DOI:10.1002/ana.410180205

- ARSAC, L.M.; THIAUDIÈRE, E.; DIOLEZ, P.; GERVILLE-RÉACHE, L. Parameter estimation in modeling phosphocreatine recovery in human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*. 2004, 91(4), 419–424. Dostupné z: DOI:10.1007/s00421-003-1001-5
- BACK, M.R.; KLUSS, H.A.; HUBER, T.S.; STOPKA, C.B.; SCOTT, K.N.; BALLINGER, J.R.; WELSCH, M.A.; BRUNER, A.P.; LYLES, T.; HARWARD, T.R.S.; SEEGER, J.M. Evaluation of skeletal muscle metabolic responses following exercise training in patients with intermittent claudication. *Vascular Surgery*. 2000, 34(4), 345–359. Dostupné z: DOI:10.1177/153857440003400411
- BARRETT, K.E.; GANONG, W.F. *Ganong's review of medical physiology*. New York: McGraw-Hill Medical, 2012. ISBN 9780071780032.
- BLAYNEY, L.; BAILEY-WOOD, R.; JACOBS, A.; HENDERSON, A.; MUIR, J. The effects of iron deficiency on the respiratory function and cytochrome content of rat heart mitochondria. *Circulation Research*. 1976, 39(5), 744–748. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/184977>
- BOCK, J.L.; WENZ, B.; GUPTA, R.K. Changes in intracellular Mg adenosine triphosphate and ionized Mg²⁺ during blood storage: detection by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood*. 1985, 65(6), 1526–1530. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3922457>
- BOER, V.O.; KLONP, D.W.J.; LATERRA, J.; BARKER, P.B. Parallel reconstruction in accelerated multivoxel MR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2015, 74(3), 599–606. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.25718
- BOGNER, W.; CHMELIK, M.; ANDRONESI, O.C.; SORENSEN, A.G.; TRATTNIG, S.; GRUBER, S. In vivo ³¹P spectroscopy by fully adiabatic extended image selected in vivo spectroscopy: A comparison between 3 T and 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2011, 66(4), 923–930. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.22897
- BOSKA, M. ATP production rates as a function of force level in the human gastrocnemius/soleus using ³¹P MRS. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1994, 32(1), 1–10. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8084222>
- BOTTOMLEY, P.A. Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987, 508, 333–348. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3326459>
- BROTZAKIS, P. ³¹P Nuclear magnetic resonance spectroscopy of acutely ischaemic limbs: the extent of changes and progress after reconstructive surgery. *Cardiovascular Surgery*. 1995, 3(3), 271–276. Dostupné z: DOI:10.1016/0967-2109(95)93875-P
- BROWN, R.W.; CHENG, Y.-C.N.; HAACKE, E.M.; THOMPSON, M.R.; VENKATESAN, R. *Magnetic resonance imaging : physical properties and sequence design*. 2014. Wiley.
- BUEHLER, T.; KREIS, R.; BOESCH, C. Comparison of ³¹P saturation and inversion magnetization transfer in human liver and skeletal muscle using a clinical MR system and surface coils. *NMR in Biomedicine*. 2015, 28(2), 188–199. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3242
- CANNON, D.T.; BIMSON, W.E.; HAMPSON, S.A.; BOWEN, T.S.; MURGATROYD, S.R.; MARWOOD, S.; KEMP, G.J.; ROSSITER, H.B. Skeletal muscle ATP turnover by ³¹P magnetic resonance spectroscopy during moderate and heavy bilateral knee extension. *The Journal of Physiology*. 2014, 592(23), 5287–5300. Dostupné z: DOI:10.1113/jphysiol.2014.279174

- CATERINI, J.E.; ELZIBAK, A.H.; ST MICHEL, E.J.; MCCRINDLE, B.W.; REDINGTON, A.N.; THOMPSON, S.; NOSEWORTHY, M.D.; WELLS, G.D. Characterizing blood oxygen level-dependent (BOLD) response following in-magnet quadriceps exercise. *Magma*. 2015, 28(3), 271–278. Dostupné z: DOI:10.1007/s10334-014-0461-4
- CEA, G.; BENDAHAN, D.; MANNERS, D.; HILTON-JONES, D.; LODI, R.; STYLES, P.; TAYLOR, D.J. Reduced oxidative phosphorylation and proton efflux suggest reduced capillary blood supply in skeletal muscle of patients with dermatomyositis and polymyositis: a quantitative ³¹P-magnetic resonance spectroscopy and MRI study. *Brain : A Journal of Neurology*. 2002, 125(7), 1635–1645. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077012>
- CLELAND, J.G.F.; ZHANG, J.; PELLICORI, P.; DICKEN, B.; DIERCKX, R.; SHOAB, A.; WONG, K.; RIGBY, A.; GOODE, K.; CLARK, A.L. Prevalence and Outcomes of Anemia and Hematinic Deficiencies in Patients With Chronic Heart Failure. *JAMA Cardiology*. 2016, 1(5), 539–547. Dostupné z: DOI:10.1001/jamacardio.2016.1161
- CLINE, G.W.; MAGNUSSON, I.; ROTHMAN, D.L.; PETERSEN, K.F.; LAURENT, D.; SHULMAN, G.I. Mechanism of impaired insulin-stimulated muscle glucose metabolism in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997, 99(9), 2219–2224. Dostupné z: DOI:10.1172/JCI119395
- COHEN-SOLAL, A.; LAPERCHE, T.; MORVAN, D.; GENEVES, M.; CAVIEZEL, B.; GOURGON, R. Prolonged kinetics of recovery of oxygen consumption after maximal graded exercise in patients with chronic heart failure. Analysis with gas exchange measurements and NMR spectroscopy. *Circulation*. 1995, 91(12), 2924–2932. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796502>
- CONLEY, K.E.; JUBRIAS, S.A.; ESSELMAN, P.C. Oxidative capacity and ageing in human muscle. *The Journal of Physiology*. 2000, 526 Pt 1, 203–210. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878112>
- CONLEY, K.E.; KUSHMERICK, M.J.; JUBRIAS, S.A. Glycolysis is independent of oxygenation state in stimulated human skeletal muscle in vivo. *The Journal of Physiology*. 1998, 935–945. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714871>
- CREE-GREEN, M.; NEWCOMER, B.R.; BROWN, M.S.; BAUMGARTNER, A.D.; BERGMAN, B.; DREW, B.; REGENSTEINER, J.G.; PYLE, L.; REUSCH, J.E.B.; NADEAU, K.J. 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:10.2337/db14-0765
- CROWTHER, G.J.; KEMPER, W.F.; CAREY, M.F.; CONLEY, K.E. Control of glycolysis in contracting skeletal muscle. II. Turning it off. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2002, 282(1), E74–9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739086>
- CROWTHER, G.J.; MILSTEIN, J.M.; JUBRIAS, S.A.; KUSHMERICK, M.J.; GRONKA, R.K.; CONLEY, K.E. Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin-dependent (type 1) diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2003, 284(4), E655–62. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpendo.00343.2002
- DAMON, B.M.; WADINGTON, M.C.; HORNBERGER, J.L.; LANSDOWN, D.A. Absolute and relative contributions of BOLD effects to the muscle functional MRI signal intensity time course: effect of exercise intensity. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2007, 58(2), 335–345. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.21319

- DE GRAAF, R.A. *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques: 2nd Edition. In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques: 2nd Edition.* Chichester, UK: John Wiley Sons, 2007. Dostupné z: DOI:10.1002/9780470512968
- DE SOUSA, P.L.; VIGNAUD, A.; FLEURY, S.; CARLIER, P.G. Fast monitoring of T1, T2, and relative proton density (M0) changes in skeletal muscles using an IR-TrueFISP sequence. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2011, 33(4), 921–930. Dostupné z: DOI:10.1002/jmri.22511
- DEVRIES, D.A.; MARSH, G.D.; RODGER, N.W.; THOMPSON, R.T. Metabolic response of forearm muscle to graded exercise in type II diabetes mellitus: effect of endurance training. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquée.* 1996, 21(2), 120–133. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8727475>
- DEZORTOVA, M.; TAIMR, P.; SKOCH, A.; SPICAK, J.; HAJEK, M. Etiology and functional status of liver cirrhosis by 31P MR spectroscopy. *World Journal of Gastroenterology.* 2005, 11(44), 6926–6931. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437594>
- DI MARZO, L.; MICCHELI, A.; SAPIENZA, P.; TEDESCO, M.; MINGOLI, A.; CAPUANI, G.; AURELI, T.; GIULIANI, A.; CONTI, F.; CAVALLARO, A. 31Phosphorus magnetic resonance spectroscopy to evaluate medical therapy efficacy in peripheral arterial disease. A pilot study. *Panminerva Medica.* 1999, 41(4), 283–290. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10705707>
- DOI, J.; SHIRAIISHI, K.; HAIDA, M.; MATSUZAKI, S. Abnormality of energy metabolism in the skeletal muscle of patients with liver cirrhosis and changes under administration of glucose and branched-chain amino acids. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2004, 29(4), 191–198. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717491>
- DOLGIN, M.; NEW YORK HEART ASSOCIATION. CRITERIA COMMITTEE. *Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels.* 1994. Little, Brown.
- DOLIBA, N.M.; BABSKY, A.M.; DOLIBA, N.M.; WEHRLI, S.L.; OSBAKKEN, M.D. AMP promotes oxygen consumption and ATP synthesis in heart mitochondria through the adenylate kinase reaction: an NMR spectroscopy and polarography study. *Cell Biochemistry and Function.* 2015, 33(2), 67–72. Dostupné z: DOI:10.1002/cbf.3089
- DREXLER, H.; RIEDE, U.; MÜNZEL, T.; KÖNIG, H.; FUNKE, E.; JUST, H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation.* 1992, 85(5), 1751–1759. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315220>
- DUBOC, D.; JEHENSON, P.; TRAN DINH, S.; MARSAC, C.; SYROTA, A.; FARDEAU, M. Phosphorus NMR spectroscopy study of muscular enzyme deficiencies involving glycogenolysis and glycolysis. *Neurology.* 1987, 37(4), 663–671. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2951614>
- ERKINTALO, M.; BENDAHAN, D.; MATTÉI, J.P.; FABREGUETTES, C.; VAGUE, P.; COZZONE, P.J. Reduced metabolic efficiency of skeletal muscle energetics in hyperthyroid patients evidenced quantitatively by in vivo phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 1998, 47(7), 769–776. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9667219>
- FINCH, C.A.; MILLER, L.R.; INAMDAR, A.R.; PERSON, R.; SEILER, K.; MACKLER, B. Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation.* 1976, 58(2), 447–453. Dostupné z: DOI:10.1172/JCI108489

- FINNI, T.; HODGSON, J.A.; LAI, A.M.; EDGERTON, V.R.; SINHA, S. Mapping of movement in the isometrically contracting human soleus muscle reveals details of its structural and functional complexity. *Journal of Applied Physiology*. 2003, 95(5), 2128–2133. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.00596.2003
- FLANNICK, J.; JOHANSSON, S.; NJ?LSTAD, P.R. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016, 12(7), 394–406. Dostupné z: DOI:10.1038/nrendo.2016.50
- FORBES, S.C.; PAGANINI, A.T.; SLADE, J.M.; TOWSE, T.F.; MEYER, R.A. Phosphocreatine recovery kinetics following low- and high-intensity exercise in human triceps surae and rat posterior hindlimb muscles. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2009, 296(1), R161–70. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpregu.90704.2008
- FORBES, S.C.; SLADE, J.M.; MEYER, R.A. Short-term high-intensity interval training improves phosphocreatine recovery kinetics following moderate-intensity exercise in humans. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*. 2008, 33(6), 1124–1131. Dostupné z: DOI:10.1139/H08-099
- FOWLER, M.D.; RYSCHON, T.W.; WYSONG, R.E.; COMBS, C.A.; BALABAN, R.S. Normalized metabolic stress for 31P-MR spectroscopy studies of human skeletal muscle: MVC vs. muscle volume. *Journal of Applied*. 1997, 83(3), 875–883. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292476>
- GERDLE, B.; FORSGREN, M.F.; BENGTSSON, A.; LEINHARD, O.D.; SÖREN, B.; KARLSSON, A.; BRANDEJSKY, V.; LUND, E.; LUNDBERG, P. Decreased muscle concentrations of ATP and PCR in the quadriceps muscle of fibromyalgia patients--a 31P-MRS study. *European Journal of Pain*. 2013, 17(8), 1205–1215. Dostupné z: DOI:10.1002/j.1532-2149.2013.00284.x
- GREENMAN, R.L.; PANASYUK, S.; WANG, X.; LYONS, T.E.; DINH, T.; LONGORIA, L.; GIURINI, J.M.; FREEMAN, J.; KHAODHIAR, L.; VEVES, A. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. *The Lancet*. 2005, 366(9498), 1711–1717. Dostupné z: DOI:10.1016/S0140-6736(05)67696-9
- GREINER, A.; ESTERHAMMER, R.; BAMMER, D.; MESSNER, H.; KREMSER, C.; JASCHKE, W.R.; FRAEDRICH, G.; SCHOCKE, M.F.H. High-energy phosphate metabolism in the calf muscle of healthy humans during incremental calf exercise with and without moderate cuff stenosis. *European Journal of Applied Physiology*. 2007, 99(5), 519–531. Dostupné z: DOI:10.1007/s00421-006-0379-2
- GREINER, A.; ESTERHAMMER, R.; PILAV, S.; ARNOLD, W.; SANTNER, W.; NEUHAUSER, B.; FRAEDRICH, G.; JASCHKE, W.R.; SCHOCKE, M.F.H. 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. *Journal of Vascular Surgery*. 2005, 42(2), 259–267. Dostupné z: DOI:10.1016/j.jvs.2005.04.042
- HÁJEK, M.; ADAMOVICOVÁ, M.; HERYNEK, V.; SKOCH, A.; JÍRŮ, F.; KREPELOVÁ, A.; DEZORTOVÁ, M. MR relaxometry and 1H MR spectroscopy for the determination of iron and metabolite concentrations in PKAN patients. *European Radiology*. 2005, 15(5), 1060–1068. Dostupné z: DOI:10.1007/s00330-004-2553-4
- HÁJEK, M.; GROSMANOVÁ, A.; HORSKÁ, A.; URBAN, P.; SUCHÁNEK, M.; JIRÁSEK, A. Initial clinical experience with the use of 31P MR spectroscopy in the examination of children with neuromuscular diseases. *Ceskoslovenska Neurologie a Neurochirurgie*. 1991, 54(3), 149–156. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1751972>

- HÁJEK, M.; PALYZOVÁ, D.; KORÍNEK, M.; KURKOVÁ, D. Concentrations of free mg^{2+} , pH and 31P MR metabolite ratios in calf muscles of healthy controls and patients with primary juvenile hypertension. *Physiological Research*. 2002, 51(2), 159–167. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12108926>
- HÁJEK, M.; ŠEDIVÝ, P.; KOVÁŘ, J.; DEZORTOVA, M. DYNAMICKÁ IN VIVO 31P MR SPEKTROSKOPIE ČLOVĚKA. *Chemické Listy*. 2017, 111, 516–523.
- HANADA, A.; OKITA, K.; YONEZAWA, K.; OHTSUBO, M.; KOHYA, T.; MURAKAMI, T.; NISHIJIMA, H.; TAMURA, M.; KITABATAKE, A. Dissociation between muscle metabolism and oxygen kinetics during recovery from exercise in patients with chronic heart failure. *Heart*. 2000, 83(2), 161–166. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648488>
- HANDS, L.J.; BORE, P.J.; GALLOWAY, G.; MORRIS, P.J.; RADDA, G.K. Muscle metabolism in patients with peripheral vascular disease investigated by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Science*. 1986, 71(3), 283–290. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3757432>
- HARRIS, R.C.; EDWARDS, R.H.; HULTMAN, E.; NORDESJÖ, L.O.; NYLIND, B.; SAHLIN, K. The time course of phosphorylcreatine resynthesis during recovery of the quadriceps muscle in man. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*. 1976, 367(2), 137–142. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1034909>
- HART, C.R.; LAYEC, G.; TRINITY, J.D.; LIU, X.; KIM, S.-E.; GROOT, H.J.; LE FUR, Y.; SORENSEN, J.R.; JEONG, E.-K.; RICHARDSON, R.S. Evidence of Preserved Oxidative Capacity and Oxygen Delivery in the Plantar Flexor Muscles With Age. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2015, 70(9), 1067–1076. Dostupné z: DOI:10.1093/gerona/glu139
- HAYKOWSKY, M.J.; KOUBA, E.J.; BRUBAKER, P.H.; NICKLAS, B.J.; EGGEBEEN, J.; KITZMAN, D.W. Skeletal Muscle Composition and Its Relation to Exercise Intolerance in Older Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *The American Journal of Cardiology*. 2014, 113(7), 1211–1216. Dostupné z: DOI:10.1016/j.amjcard.2013.12.031
- HEEMSKERK, A.M.; STRIJKERS, G.J.; VILANOVA, A.; DROST, M.R.; NICOLAY, K. Determination of mouse skeletal muscle architecture using three-dimensional diffusion tensor imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2005, 53(6), 1333–1340. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.20476
- HEJLOVÁ, I.; DEZORTOVÁ, M.; ŠEDIVÝ, P.; DROBNÝ, M.; HÁJEK, M.; CAHOVÁ, M.; DAŇKOVÁ, H.; STICOVÁ, E.; LÁNSKÁ, V.; TRUNEČKA, P. Metabolic profile of liver transplant recipient with respect to the development of NAFLD – results of a pilot study. *Gastroenterologie a Hepatologie*. 2016, 70(4), 325–330. Dostupné z: DOI:10.14735/amgh2016325
- HUEGLI, R.W.; SCHULTE, A.-C.; ASCHWANDEN, M.; THALHAMMER, C.; KOS, S.; JACOB, A.L.; BILECEN, D. Effects of percutaneous transluminal angioplasty on muscle BOLD-MRI in patients with peripheral arterial occlusive disease: preliminary results. *European Radiology*. 2009, 19(2), 509–515. Dostupné z: DOI:10.1007/s00330-008-1168-6
- HUG, F.; MARQUESTE, T.; LE FUR, Y.; COZZONE, P.J.; GRÉLOT, L.; BENDAHAN, D. Selective training-induced thigh muscles hypertrophy in professional road cyclists. *European Journal of Applied Physiology*. 2006, 97(5), 591–597. Dostupné z: DOI:10.1007/s00421-006-0218-5

- CHANCE, B.; ELEFF, S.; BANK, W.; LEIGH, J.S.; WARNELL, R. ³¹P NMR studies of control of mitochondrial function in phosphofructokinase-deficient human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982, 79(24), 7714–7718. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6218501>
- CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2016, 20(4), 546–551. Dostupné z: DOI:10.4103/2230-8210.183480
- CHILIBECK, P.D.; MCCREARY, C.R.; MARSH, G.D.; PATERSON, D.H.; NOBLE, E.G.; TAYLOR, A.W.; THOMPSON, R.T. Evaluation of muscle oxidative potential by ³¹P-MRS during incremental exercise in old and young humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1998, 78(5), 460–465. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809848>
- CHILIBECK, P.D.; PATERSON, D.H.; MCCREARY, C.R.; MARSH, G.D.; CUNNINGHAM, D.A.; THOMPSON, R.T. The effects of age on kinetics of oxygen uptake and phosphocreatine in humans during exercise. *Experimental Physiology*. 1998, 83(1), 107–117. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9483424>
- CHRISTIE, A.D.; TONSON, A.; LARSEN, R.G.; DEBLOIS, J.P.; KENT, J.A. Human skeletal muscle metabolic economy in vivo: effects of contraction intensity, age, and mobility impairment. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014, 307(9), R1124-35. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpregu.00083.2014
- IOTTI, S.; BORSARI, M.; BENDAHAN, D. Oscillations in energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1797(8), 1353–1361. Dostupné z: DOI:10.1016/j.bbabi.2010.02.019
- ISBELL, D.C.; BERR, S.S.; TOLEDANO, A.Y.; EPSTEIN, F.H.; MEYER, C.H.; ROGERS, W.J.; HARTHUN, N.L.; HAGSPIEL, K.D.; WELTMAN, A.; KRAMER, C.M. Delayed calf muscle phosphocreatine recovery after exercise identifies peripheral arterial disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006, 47(11), 2289–2295. Dostupné z: DOI:10.1016/j.jacc.2005.12.069
- 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. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011, 301(1), R60-6. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpregu.00747.2010
- JAMMES, Y.; STEINBERG, J.G.; MAMBRINI, O.; BRÉGEON, F.; DELLIAUX, S. Chronic fatigue syndrome: assessment of increased oxidative stress and altered muscle excitability in response to incremental exercise. *Journal of Internal Medicine*. 2005, 257(3), 299–310. Dostupné z: DOI:10.1111/j.1365-2796.2005.01452.x
- JANKOWSKA, E.A.; VON HAEHLING, S.; ANKER, S.D.; MACDOUGALL, I.C.; PONIKOWSKI, P. Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives. *European Heart Journal*. 2013, 34(11), 816–829. Dostupné z: DOI:10.1093/eurheartj/ehs224
- JENESON, J.A.; WISEMAN, R.W.; WESTERHOFF, H.V.; KUSHMERICK, M.J. The signal transduction function for oxidative phosphorylation is at least second order in ADP. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271(45), 27995–27998. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910406>

- JENESON, J.A.L.; SCHMITZ, J.P.J.; VAN DEN BROEK, N.M.A.; VAN RIEL, N.A.W.; HILBERS, P.A.J.; NICOLAY, K.; PROMPERS, J.J. Magnitude and control of mitochondrial sensitivity to ADP. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 2009, 297(3), E774–E784. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpendo.00370.2009
- JEPPESEN, T.D.; QUISTORFF, B.; WIBRAND, F.; VISSING, J. 31P-MRS of skeletal muscle is not a sensitive diagnostic test for mitochondrial myopathy. *Journal of Neurology*. 2007, 254(1), 29–37. Dostupné z: DOI:10.1007/s00415-006-0229-5
- JUBRIAS, S.A.; BENNETT, R.M.; KLUG, G.A. Increased incidence of a resonance in the phosphodiester region of 31P nuclear magnetic resonance spectra in the skeletal muscle of fibromyalgia patients. *Arthritis and Rheumatism*. 1994, 37(6), 801–807. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8003051>
- JUBRIAS, S.A.; CROWTHER, G.J.; SHANKLAND, E.G.; GRONKA, R.K.; CONLEY, K.E. Acidosis inhibits oxidative phosphorylation in contracting human skeletal muscle in vivo. *The Journal of Physiology*. 2003, 553(Pt 2), 589–599. Dostupné z: DOI:10.1113/jphysiol.2003.045872
- KACEROVSKY, M.; BREHM, A.; CHMELIK, M.; SCHMID, A.I.; SZENDROEDI, J.; KACEROVSKY-BIELESZ, G.; NOWOTNY, P.; LETTNER, A.; WOLZT, M.; JONES, J.G.; RODEN, M. Impaired insulin stimulation of muscular ATP production in patients with type 1 diabetes. *Journal of Internal Medicine*. 2011, 269(2), 189–199. Dostupné z: DOI:10.1111/j.1365-2796.2010.02298.x
- KEMP, G.J. Physiological constraints on changes in pH and phosphorus metabolite concentrations in ischaemically exercising muscle: implications for metabolic control and for the interpretation of 31P-magnetic resonance spectroscopic studies. *Magma (New York, N.Y.)*. 1997, 5(3), 231–241. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351027>
- KEMP, G.J.; AHMAD, R.E.; NICOLAY, K.; PROMPERS, J.J. Quantification of skeletal muscle mitochondrial function by 31 P magnetic resonance spectroscopy techniques: a quantitative review. *Acta Physiologica*. 2015, 213(1), 107–144. Dostupné z: DOI:10.1111/apha.12307
- KEMP, G.J.; BRINDLE, K.M. What do magnetic resonance-based measurements of Pi→ATP flux tell us about skeletal muscle metabolism? *Diabetes*. 2012, 61(8), 1927–1934. Dostupné z: DOI:10.2337/db11-1725
- KEMP, G.J.; HANDS, L.J.; RAMASWAMI, G.; TAYLOR, D.J.; NICOLAIDES, A.; AMATO, A.; RADDA, G.K. Calf muscle mitochondrial and glycogenolytic ATP synthesis in patients with claudication due to peripheral vascular disease analysed using 31P magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Science (London, England : 1979)*. 1995, 89(6), 581–590. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8549076>
- KEMP, G.J.; MANNERS, D.N.; CLARK, J.F.; BASTIN, M.E.; RADDA, G.K. Theoretical modelling of some spatial and temporal aspects of the mitochondrion/creatine kinase/myofibril system in muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998, 184(1–2), 249–289. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746325>
- KEMP, G.J.; MEYERSPEER, M.; MOSER, E. Absolute quantification of phosphorus metabolite concentrations in human muscle in vivo by 31P MRS: a quantitative review. *NMR in Biomedicine*. 2007, 20(6), 555–565. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.1192
- KEMP, G.J.; RADDA, G.K. Quantitative interpretation of bioenergetic data from 31P and 1H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magnetic Resonance Quarterly*. 1994, 10(1), 43–63. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161485>

- KEMP, G.J.; ROBERTS, N.; BIMSON, W.E.; BAKRAN, A.; HARRIS, P.L.; GILLING-SMITH, G.L.; BRENNAN, J.; RANKIN, A.; FROSTICK, S.P. 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. *Journal of Vascular Surgery*. 2001, 34(6), 1103–1110. Dostupné z: DOI:10.1067/mva.2001.117152
- KEMP, G.J.; ROUSSEL, M.; BENDAHAN, D.; LE FUR, Y.; COZZONE, P.J. Interrelations of ATP synthesis and proton handling in ischaemically exercising human forearm muscle studied by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Physiology*. 2001, 535(Pt 3), 901–928. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559784>
- KEMP, G.J.; TAYLOR, D.J.; DUNN, J.F.; FROSTICK, S.P.; RADDA, G.K. Cellular energetics of dystrophic muscle. *Journal of the Neurological Sciences*. 1993, 116(2), 201–206. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393092>
- KEMP, G.J.; TAYLOR, D.J.; RADDA, G.K. Control of phosphocreatine resynthesis during recovery from exercise in human skeletal muscle. *NMR in Biomedicine*. 1993, 6(1), 66–72. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.1940060111
- KEMP, G.J.; TAYLOR, D.J.; STYLES, P.; RADDA, G.K. The production, buffering and efflux of protons in human skeletal muscle during exercise and recovery. *NMR in Biomedicine*. 1993, 6(1), 73–83. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.1940060112
- KEMPS, H.M.C.; PROMPERS, J.J.; WESSELS, B.; DE VRIES, W.R.; ZONDERLAND, M.L.; THIJSSSEN, E.J.M.; NICOLAY, K.; SCHEP, G.; DOEVENDANS, P.A.F.M. Skeletal muscle metabolic recovery following submaximal exercise in chronic heart failure is limited more by O₂ delivery than O₂ utilization. *Clinical Science (London, England : 1979)*. 2009, 118(3), 203–210. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20310084>
- KHUSHU, S.; RANA, P.; SEKHRI, T.; SRIPATHY, G.; TRIPATHI, R.P. Bio-energetic impairment in human calf muscle in thyroid disorders: a ³¹P MRS study. *Magnetic Resonance Imaging*. 2010, 28(5), 683–689. Dostupné z: DOI:10.1016/j.mri.2010.01.006
- KIRICUTA, I.C.; EL-GAMMAL, S.; ALTMAYER, P.; BEYER, H.K. Altered muscle metabolism in pustular psoriasis (Zumbusch type): demonstration by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 1993, 186(3), 170–175. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8453141>
- KLOSE, U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *European Journal of Radiology*. 2008, 67(2), 194–201. Dostupné z: DOI:10.1016/j.ejrad.2008.03.023
- KO, S.F.; HUANG, C.C.; HSIEH, M.J.; NG, S.H.; LEE, C.C.; LEE, C.C.; LIN, T.K.; CHEN, M.C.; LEE, L. ³¹P MR spectroscopic assessment of muscle in patients with myasthenia gravis before and after thymectomy: initial experience. *Radiology*. 2008, 247(1), 162–169. Dostupné z: DOI:10.1148/radiol.2471070591
- KRSSAK, M.; FALK PETERSEN, K.; DRESNER, A.; DIPIETRO, L.; VOGEL, S.M.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I.; RODEN, M. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999, 42(1), 113–116. Dostupné z: DOI:10.1007/s001250051123
- KUTSUZAWA, T.; SHIOYA, S.; KURITA, D.; HAIDA, M.; YAMABAYASHI, H. Effects of age on muscle energy metabolism and oxygenation in the forearm muscles. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2001, 33(6), 901–906. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404654>

- LAGEMAAT, M.W.; MAAS, M.C.; VOS, E.K.; BITZ, A.K.; ORZADA, S.; WEILAND, E.; VAN UDEN, M.J.; KOBUS, T.; HEERSCHAP, A.; SCHEENEN, T.W.J. (31) P MR spectroscopic imaging of the human prostate at 7 T: T1 relaxation times, Nuclear Overhauser Effect, and spectral characterization. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2015, 73(3), 909–920. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.25209
- LANE, R.J.; BARRETT, M.C.; TAYLOR, D.J.; KEMP, G.J.; LODI, R. Heterogeneity in chronic fatigue syndrome: evidence from magnetic resonance spectroscopy of muscle. *Neuromuscular Disorders : NMD*. 1998, 8(3–4), 204–209. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631403>
- LANZA, I.R.; BEFROY, D.E.; KENT-BRAUN, J.A. Age-related changes in ATP-producing pathways in human skeletal muscle in vivo. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2005, 99(5), 1736–1744. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.00566.2005
- LANZA, I.R.; BHAGRA, S.; NAIR, K.S.; PORT, J.D. Measurement of human skeletal muscle oxidative capacity by 31P-MR spectroscopy: A cross-validation with in vitro measurements. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2011, 34(5), 1143–1150. Dostupné z: DOI:10.1002/jmri.22733
- LANZA, I.R.; WIGMORE, D.M.; BEFROY, D.E.; KENT-BRAUN, J.A. In vivo ATP production during free-flow and ischaemic muscle contractions in humans. *The Journal of Physiology*. 2006, 577(1), 353–367. Dostupné z: DOI:10.1113/jphysiol.2006.114249
- LAYEC, G.; BRINGARD, A.; LE FUR, Y.; VILMEN, C.; MICALLEF, J.-P.; PERREY, S.; COZZONE, P.J.; BENDAHAAN, D. Reproducibility assessment of metabolic variables characterizing muscle energetics in vivo: A 31P-MRS study. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2009, 62(4), 840–854. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.22085
- LAYEC, G.; BRINGARD, A.; LE FUR, Y.; VILMEN, C.; MICALLEF, J.-P.; PERREY, S.; COZZONE, P.J.; BENDAHAAN, D. Comparative determination of energy production rates and mitochondrial function using different 31P MRS quantitative methods in sedentary and trained subjects. *NMR in Biomedicine*. 2010, 24(4), n/a-n/a. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.1607
- LAYEC, G.; GIFFORD, J.R.; TRINITY, J.D.; HART, C.R.; GARTEN, R.S.; PARK, S.Y.; LE FUR, Y.; JEONG, E.-K.; RICHARDSON, R.S. Accuracy and precision of quantitative 31P-MRS measurements of human skeletal muscle mitochondrial function. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2016, 311(2), E358-66. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpendo.00028.2016
- LAYEC, G.; HASELER, L.J.; HOFF, J.; HART, C.R.; LIU, X.; LE FUR, Y.; JEONG, E.-K.; RICHARDSON, R.S. Short-term training alters the control of mitochondrial respiration rate before maximal oxidative ATP synthesis. *Acta Physiologica*. 2013, 208(4), 376–386. Dostupné z: DOI:10.1111/apha.12103
- LAYEC, G.; HASELER, L.J.; TRINITY, J.D.; HART, C.R.; LIU, X.; LE FUR, Y.; JEONG, E.-K.; RICHARDSON, R.S. Mitochondrial function and increased convective O2 transport: implications for the assessment of mitochondrial respiration in vivo. *Journal of Applied Physiology*. 2013, 115(6), 803–811. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.00257.2013
- LEDERMANN, H.-P.; SCHULTE, A.-C.; HEIDECKER, H.-G.; ASCHWANDEN, M.; JÄGER, K.A.; SCHEFFLER, K.; STEINBRICH, W.; BILECEN, D. Blood Oxygenation Level-Dependent Magnetic Resonance Imaging of the Skeletal Muscle in Patients With Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Circulation*. 2006, 113(25), 2929–2935. Dostupné z: DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.605717

- LEVITT, M.H. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. Hoboken, NJ: John Wiley: 2008. ISBN 0470511176.
- LIM, E.; HOLLINGSWORTH, K.; SMITH, F.; THELWALL, P.; TAYLOR, R. Inhibition of lipolysis in Type 2 diabetes normalizes glucose disposal without change in muscle glycogen synthesis rates. *Clinical Science*. 2011, 121(4), 169–177. Dostupné z: DOI:10.1042/CS20100611
- LIM, E.L.; HOLLINGSWORTH, K.G.; SMITH, F.E.; THELWALL, P.E.; TAYLOR, R. Effects of raising muscle glycogen synthesis rate on skeletal muscle ATP turnover rate in type 2 diabetes. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 2011, 301(6), E1155–E1162. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpendo.00278.2011
- LJUNGBERG, M.; STARCK, G.; VIKHOFF-BAAZ, B.; ALPSTEN, M.; EKHOLM, S.; FORSELL-ARONSSON, E. Extended ISIS sequences insensitive to T1 smearing. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2000, 44(4), 546–555. Dostupné z: DOI:10.1002/1522-2594(200010)44:4
- LJUNGBERG, M.; STARCK, G.; VIKHOFF-BAAZ, B.; ALPSTEN, M.; EKHOLM, S.; FORSELL-ARONSSON, E. The magnitude of signal errors introduced by ISIS in quantitative 31P MRS. *Magma*. 2002, 14(1), 30–38. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796250>
- LODI, R.; KEMP, G.J.; MUNTONI, F.; THOMPSON, C.H.; RAE, C.; TAYLOR, J.; STYLES, P.; TAYLOR, D.J. 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: A Journal of Neurology*. 1999, 121–130. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10050900>
- MAINTZ, D.; HEINDEL, W.; KUGEL, H.; JAEGER, R.; LACKNER, K.J. Phosphorus-31 MR spectroscopy of normal adult human brain and brain tumours. *NMR in Biomedicine*. 2002, 15(1), 18–27. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840549>
- MANCINI, D.M.; COYLE, E.; COGGAN, A.; BELTZ, J.; FERRARO, N.; MONTAIN, S.; WILSON, J.R. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to 31P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1989, 80(5), 1338–1346. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805270>
- MANCINI, D.M.; FERRARO, N.; TUCHLER, M.; CHANCE, B.; WILSON, J.R. Detection of abnormal calf muscle metabolism in patients with heart failure using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *The American Journal of Cardiology*. 1988, 62(17), 1234–1240. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3195484>
- MANCINI, D.M.; WILSON, J.R.; BOLINGER, L.; LI, H.; KENDRICK, K.; CHANCE, B.; LEIGH, J.S. In vivo magnetic resonance spectroscopy measurement of deoxy-myoglobin during exercise in patients with heart failure. Demonstration of abnormal muscle metabolism despite adequate oxygenation. *Circulation*. 1994, 90(1), 500–508. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026039>
- MASSIE, B.M.; CONWAY, M.; RAJAGOPALAN, B.; YONGE, R.; FROSTICK, S.; LEDINGHAM, J.; SLEIGHT, P.; RADDA, G. Skeletal muscle metabolism during exercise under ischemic conditions in congestive heart failure. Evidence for abnormalities unrelated to blood flow. *Circulation*. 1988, 78(2), 320–326. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3396168>

- MATTEI, J.-P.; KOZAK-RIBBENS, G.; ROUSSEL, M.; LE FUR, Y.; COZZONE, P.J.; BENDAHAN, D. New parameters reducing the interindividual variability of metabolic changes during muscle contraction in humans. A ^{31}P MRS study with physiological and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002, 1554(1–2), 129–136. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034478>
- MATTEI, J.P.; BENDAHAN, D.; COZZONE, P. P-31 Magnetic Resonance Spectroscopy. A tool for diagnostic purposes and pathophysiological insights in muscle diseases. *Reumatismo*. 2004. Dostupné z: DOI:10.1097/01.TP.0000039303.05792.FC
- MATTEI, J.P.; BENDAHAN, D.; ERKINTALO, M.; HARLE, J.R.; WEILLER, P.J.; ROUX, H.; COZZONE, P.J. P-31 magnetic resonance spectroscopy demonstrates unaltered muscle energy utilization in polymyalgia rheumatica. *Arthritis and Rheumatism*. 1997, 40(10), 1817–1822. Dostupné z: DOI:10.1002/1529-0131(199710)40:10lt;1817::AID-ART14gt;3.0.CO;2-3
- MERCHANT, T.E.; GLONEK, T. ^{31}P NMR of phospholipid glycerol phosphodiester residues. *Journal of Lipid Research*. 1990, 31(3), 479–486. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2341809>
- MEYER, R.A. A linear model of muscle respiration explains monoexponential phosphocreatine changes. *The American Journal of Physiology*. 1988, 254(4 Pt 1), C548–53. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3354652>
- MEYER, R.A.; TOWSE, T.F.; REID, R.W.; JAYARAMAN, R.C.; WISEMAN, R.W.; MCCULLY, K.K. BOLD MRI mapping of transient hyperemia in skeletal muscle after single contractions. *NMR in Biomedicine*. 2004, 17(6), 392–398. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.893
- MEYERSPEER, M.; KEMP, G.J.; MLYNÁRIK, V.; KRŠŠÁK, M.; SZENDROEDI, J.; NOWOTNY, P.; RODEN, M.; MOSER, E. Direct noninvasive quantification of lactate and high energy phosphates simultaneously in exercising human skeletal muscle by localized magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2007, 57(4), 654–660. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.21188
- MEYERSPEER, M.; KRŠŠÁK, M.; KEMP, G.J.; RODEN, M.; MOSER, E. Dynamic interleaved $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ STEAM MRS at 3 Tesla using a pneumatic force-controlled plantar flexion exercise rig. *Magma*. 2005, 18(5), 257–262. Dostupné z: DOI:10.1007/s10334-005-0014-y
- MEYERSPEER, M.; KRŠŠÁK, M.; MOSER, E. Relaxation times of ^{31}P -metabolites in human calf muscle at 3 T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003, 49(4), 620–625. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.10426
- MEYERSPEER, M.; ROBINSON, S.; NABUURS, C.I.; SCHEENEN, T.; SCHOISENGEIER, A.; UNGER, E.; KEMP, G.J.; MOSER, E. Comparing localized and nonlocalized dynamic ^{31}P magnetic resonance spectroscopy in exercising muscle at 7T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2012, 68(6), 1713–1723. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.24205
- MIURA, J.; UCHIGATA, Y. Latest overview of type 1 diabetes mellitus. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*. 2008, 66(7), 1397–1404. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616134>

- MONSIEURS, K.; HEYTENS, L.; KLOECK, C.; MARTIN, J.J.; WUYTS, F.; BOSSAERT, L. Slower recovery of muscle phosphocreatine in malignant hyperthermia-susceptible individuals assessed by ³¹P-MR spectroscopy. *Journal of Neurology*. 1997, 244(10), 651–656. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9402543>
- MOON, R.B.; RICHARDS, J.H. Determination of intracellular pH by ³¹P magnetic resonance. *The Journal of Biological Chemistry*. 1973, 248(20), 7276–7278. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4743524>
- 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. *Vnitřní Lekarství*. 2017, 63(4), 236–241. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28520446>
- NEWMAN, R.J.; BORE, P.J.; CHAN, L.; GADIAN, D.G.; STYLES, P.; TAYLOR, D.; RADDA, G.K. Nuclear magnetic resonance studies of forearm muscle in Duchenne dystrophy. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*. 1982, 284(6322), 1072–1074. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6802410>
- NISS, F.; FIEDLER, G.B.; SCHMID, A.I.; GOLUCH, S.; KRIEGL, R.; WOLZT, M.; MOSER, E.; MEYERSPEER, M. Interleaved multivoxel (³¹P) MR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2017, 77(3), 921–927. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.26172
- NISHIDA, A.; KUBO, K.; NIHEI, H. Impaired muscle energy metabolism in uremia as monitored by ³¹P-NMR. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1991, 33(1), 65–73. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2038134>
- OKONKO, D.O.; MANDAL, A.K.J.; MISSOURIS, C.G.; POOLE-WILSON, P.A. Disordered iron homeostasis in chronic heart failure: prevalence, predictors, and relation to anemia, exercise capacity, and survival. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011, 58(12), 1241–1251. Dostupné z: DOI:10.1016/j.jacc.2011.04.040
- PARASOGLU, P.; FENG, L.; XIA, D.; OTAZO, R.; REGATTE, R.R. Rapid 3D-imaging of phosphocreatine recovery kinetics in the human lower leg muscles with compressed sensing. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2012, 68(6), 1738–1746. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.24484
- PARK, J.H.; VANSANT, J.P.; KUMAR, N.G.; GIBBS, S.J.; CURVIN, M.S.; PRICE, R.R.; PARTAIN, C.L.; JAMES, A.E. Dermatomyositis: correlative MR imaging and P-³¹P MR spectroscopy for quantitative characterization of inflammatory disease. *Radiology*. 1990, 177(2), 473–479. Dostupné z: DOI:10.1148/radiology.177.2.2217788
- PAYEN, J.F.; BOSSON, J.L.; BOURDON, L.; JACQUOT, C.; LE BAS, J.F.; STIEGLITZ, P.; BENABID, A.L. Improved noninvasive diagnostic testing for malignant hyperthermia susceptibility from a combination of metabolites determined in vivo with ³¹P-magnetic resonance spectroscopy. *Anesthesiology*. 1993, 78(5), 848–855. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8489056>
- PESTA, D.; PASCHKE, V.; HOPPEL, F.; KOBEL, C.; KREMSER, C.; ESTERHAMMER, R.; BURTSCHER, M.; KEMP, G.J.; SCHOCKE, M. Different Metabolic Responses during Incremental Exercise Assessed by Localized ³¹P MRS in Sprint and Endurance Athletes and Untrained Individuals. *International Journal of Sports Medicine*. 2013, 34(8), 669–675. Dostupné z: DOI:10.1055/s-0032-1327648

- PETERSEN, K.F.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; GARCIA, R.; SHULMAN, G.I. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2004, 350(7), 664–671. Dostupné z: DOI:10.1056/NEJMoa031314
- PETERSEN, K.F.; HENDLER, R.; PRICE, T.; PERSEGHIN, G.; ROTHMAN, D.L.; HELD, N.; AMATRUDA, J.M.; SHULMAN, G.I. 13C/31P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes*. 1998, 47(3), 381–386. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519743>
- PETERSEN, K.F.; KRSSAK, M.; INZUCCHI, S.; CLINE, G.W.; DUFOUR, S.; SHULMAN, G.I. Mechanism of troglitazone action in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000, 49(5), 827–831. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905493>
- PFLEIDERER, B.; LANGE, J.; LOSKE, K.-D.; SUNDERKÖTTER, C. Metabolic disturbances during short exercises in dermatomyositis revealed by real-time functional 31P magnetic resonance spectroscopy. *Rheumatology*. 2004, 43(6), 696–703. Dostupné z: DOI:10.1093/rheumatology/keh182
- PIPINOS, I.I.; BOSKA, M.D.; SHEPARD, A.D.; ANAGNOSTOPOULOS, P. V.; KATSAMOURIS, A. Pentoxifylline reverses oxidative mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *The Journal of Surgical Research*. 2002, 102(2), 126–132. Dostupné z: DOI:10.1006/jsre.2001.6292
- PIPINOS, I.I.; SHAROV, V.G.; SHEPARD, A.D.; ANAGNOSTOPOULOS, P. V.; KATSAMOURIS, A.; TODOR, A.; FILIS, K.A.; SABBAH, H.N. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Surgery*. 2003, 38(4), 827–832. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560237>
- PIPINOS, I.I.; SHEPARD, A.D.; ANAGNOSTOPOULOS, P. V.; KATSAMOURIS, A.; BOSKA, M.D. Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery*. 2000, 31(5), 944–952. Dostupné z: DOI:10.1067/mva.2000.106421
- PONIKOWSKI, P.; VAN VELDHUISEN, D.J.; COMIN-COLET, J.; ERTL, G.; KOMAJDA, M.; MAREEV, V.; MCDONAGH, T.; PARKHOMENKO, A.; TAVAZZI, L.; LEVESQUE, V.; MORI, C.; ROUBERT, B.; FILIPPATOS, G.; RUSCHITZKA, F.; ANKER, S.D.; CONFIRM-HF INVESTIGATORS. Beneficial effects of long-term intravenous iron therapy with ferric carboxymaltose in patients with symptomatic heart failure and iron deficiency†. *European Heart Journal*. 2015, 36(11), 657–668. Dostupné z: DOI:10.1093/eurheartj/ehu385
- PRAET, S.F.E.; FEYTER, H.M.M. DE; JONKERS, R.A.M.; NICOLAY, K.; PUL, C. VAN; KUIPERS, H.; LOON, L.J.C. VAN; PROMPERS, J.J. 31P MR spectroscopy and in vitro markers of oxidative capacity in type 2 diabetes patients. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 2007, 19(6), 321–331. Dostupné z: DOI:10.1007/s10334-006-0060-0
- PROMPERS, J.J.; JENESON, J.A.L.; DROST, M.R.; OOMENS, C.C.W.; STRIJKERS, G.J.; NICOLAY, K. Dynamic MRS and MRI of skeletal muscle function and biomechanics. *NMR in Biomedicine*. 2006, 19(7), 927–953. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.1095
- PROMPERS, J.J.; WESSELS, B.; KEMP, G.J.; NICOLAY, K. MITOCHONDRIA: Investigation of in vivo muscle mitochondrial function by 31P magnetic resonance spectroscopy. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*. 2014, 50, 67–72. Dostupné z: DOI:10.1016/j.biocel.2014.02.014

- QUISTORFF, B.; JOHANSEN, L.; SAHLIN, K. Absence of phosphocreatine resynthesis in human calf muscle during ischaemic recovery. *The Biochemical Journal*. 1993, 681–686. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8489495>
- RECTOR, T.S.; COHN, J.N. Assessment of patient outcome with the Minnesota Living with Heart Failure questionnaire: reliability and validity during a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pimobendan. Pimobendan Multicenter Research Group. *American Heart Journal*. 1992, 124(4), 1017–1025. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1529875>
- RICHARDSON, R.S.; NEWCOMER, S.C.; NOYSZEWSKI, E.A. Skeletal muscle intracellular PO₂ assessed by myoglobin desaturation: response to graded exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2001, 91(6), 2679–2685. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717234>
- RODGERS, C.T.; CLARKE, W.T.; SNYDER, C.; VAUGHAN, J.T.; NEUBAUER, S.; ROBSON, M.D. Human cardiac 31P magnetic resonance spectroscopy at 7 Tesla. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2014, 72(2), 304–315. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.24922
- ROSSITER, H.B.; WARD, S.A.; HOWE, F.A.; KOWALCHUK, J.M.; GRIFFITHS, J.R.; WHIPP, B.J. Dynamics of intramuscular ³¹P-MRS P_i peak splitting and the slow components of PCr and O₂ uptake during exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2002, 93(6), 2059–2069. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.00446.2002
- RYAN, T.E.; ERICKSON, M.L.; VERMA, A.; CHAVEZ, J.; RIVNER, M.H.; MCCULLY, K.K. Skeletal muscle oxidative capacity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2014, 50(5), 767–774. Dostupné z: DOI:10.1002/mus.24223
- RZANNY, R.; STUTZIG, N.; HIEPE, P.; GUSSEW, A.; THORHAUER, H.-A.; REICHENBACH, J.R. The reproducibility of different metabolic markers for muscle fiber type distributions investigated by functional 31P-MRS during dynamic exercise. *Zeitschrift Für Medizinische Physik*. 2016, 26(4), 323–338. Dostupné z: DOI:10.1016/j.zemedi.2016.06.006
- SEDIVY, P.; DEZORTOVA, M.; DROBNY, M.; VLASAKOVA, Z.; HERYNEK, V.; HAJEK, M. Differences in muscle metabolism in patients with type I diabetes – influence of gender and nephropathy studied by 31P MR spectroscopy. *Physiological Research*. 2018, 67(3).
- SEDIVY, P.; DROBNY, M.; DEZORTOVA, M.; HERYNEK, V.; ROZTOČIL, K.; CERMAKOVA, H.; NĚMCOVÁ, A.; DUBSKÝ, M.; HAJEK, M. 31P MR spectroscopy of patients with mild and serious lower limb ischemia. *International Angiology*. V tisku.
- SEVASTIANOVA, K.; HAKKARAINEN, A.; KOTRONEN, A.; CORNÉR, A.; ARKKILA, P.; AROLA, J.; WESTERBACKA, J.; BERGHOLM, R.; LUNDBOM, J.; LUNDBOM, N.; YKI-JÄRVINEN, H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Detection of Elevated Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate with in Vivo 3.0-T ³¹P MR Spectroscopy with Proton Decoupling. *Radiology*. 2010, 256(2), 466–473. Dostupné z: DOI:10.1148/radiol.10091351
- SHROUT, P.E.; FLEISS, J.L. Intra-class correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*. 1979, 86(2), 420–428. Dostupné z: DOI:10.1037/0033-2909.86.2.420
- SCHEUERMANN-FREESTONE, M.; MADSEN, P.L.; MANNERS, D.; BLAMIRE, A.M.; BUCKINGHAM, R.E.; STYLES, P.; RADDA, G.K.; NEUBAUER, S.; CLARKE, K. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003, 107(24), 3040–3046. Dostupné z: DOI:10.1161/01.CIR.0000072789.89096.10

- SCHEWZOW, K.; ANDREAS, M.; MOSER, E.; WOLZT, M.; SCHMID, A.I. Automatic model-based analysis of skeletal muscle BOLD-MRI in reactive hyperemia. *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI*. 2013, 38(4), 963–969. Dostupné z: DOI:10.1002/jmri.23919
- SCHMID, A.I.; SCHEWZOW, K.; FIEDLER, G.B.; GOLUCH, S.; LAISTLER, E.; WOLZT, M.; MOSER, E.; MEYERSPEER, M. Exercising calf muscle T_2^* changes correlate with pH, PCr recovery and maximum oxidative phosphorylation. *NMR in Biomedicine*. 2014, 27(5), 553–560. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3092
- 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. *Investigative Radiology*. 1999, 34(2), 116–125. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951791>
- SCHUNK, K.; ROMANEEHSEN, B.; RIEKER, O.; DUBER, C.; KERSJES, W.; SCHADMAND-FISCHER, S.; SCHMIEDT, W.; THELEN, M. Dynamic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in arterial occlusive disease: effects of vascular therapy on spectroscopic results. *Invest Radiol*. 1998, 33(6), 329–335. Dostupné z: DOI:10.1097/00004424-199806000-00003
- SKOCH, A.; JIRU, F.; BUNKE, J. Spectroscopic imaging: basic principles. *European Journal of Radiology*. 2008, 67(2), 230–239. Dostupné z: DOI:10.1016/j.ejrad.2008.03.003
- SKOCH, A.; JÍRŮ, F.; DEZORTOVÁ, M.; KRUSINOVÁ, E.; KRATOCHVÍLOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T.; GRODD, W.; HÁJEK, M. Intramyocellular lipid quantification from 1H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCModel technique. *Journal of Magnetic Resonance Imaging : JMRI*. 2006, 23(5), 728–735. Dostupné z: DOI:10.1002/jmri.20574
- SLADE, J.M.; TOWSE, T.F.; DELANO, M.C.; WISEMAN, R.W.; MEYER, R.A. A gated 31P NMR method for the estimation of phosphocreatine recovery time and contractile ATP cost in human muscle. *NMR in Biomedicine*. 2006, 19(5), 573–580. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.1037
- SLATTERY, M.J.; BREDELLA, M.A.; THAKUR, H.; TORRIANI, M.; MISRA, M. Insulin Resistance and Impaired Mitochondrial Function in Obese Adolescent Girls. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2014, 12(1), 56–61. Dostupné z: DOI:10.1089/met.2013.0100
- SLOTBOOM, J.; BOVÉE, W.M.M.J. Adiabatic slice-selective rf pulses and a single-shot adiabatic localization pulse sequence. *Concepts in Magnetic Resonance*. 1995, 7(3), 193–217. Dostupné z: DOI:10.1002/cmr.1820070303
- SUZUKI, E.; KASHIWAGI, A.; HIDAKA, H.; MAEGAWA, H.; NISHIO, Y.; KOJIMA, H.; HANEDA, M.; YASUDA, H.; MORIKAWA, S.; INUBUSHI, T.; KIKKAWA, R. 1 H- and 31 P-magnetic resonance spectroscopy and imaging as a new diagnostic tool to evaluate neuropathic foot ulcers in Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2000, 43(2), 165–172. Dostupné z: DOI:10.1007/s001250050025
- SZENDROEDI, J.; SCHMID, A.I.; CHMELIK, M.; KRSSAK, M.; NOWOTNY, P.; PRIKOSZOVICH, T.; KAUTZKY-WILLER, A.; WOLZT, M.; WALDHÄUSL, W.; RODEN, M. Skeletal muscle phosphodiester content relates to body mass and glycemic control. *PLoS ONE*. 2011, 6(7), e21846. Dostupné z: DOI:10.1371/journal.pone.0021846
- ŠEDIVÝ, P. *Mellitus, MR spektroskopie pacientů s diabetes*. Praha, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, matematicko-fyzikální fakulta.
- ŠEDIVÝ, P.; HERYNEK, V.; DEZORTOVÁ, M.; DROBNÝ, M.; GALISOVÁ, A.; HAJEK, M. 31P a 19F MR spektroskopie a zobrazování v IKEM. 2017, 71(4), 312–322.

- ŠEDIVÝ, P.; CHRISTINA KIPFELSBERGER, M.; DEZORTOVÁ, M.; KRŠŠÁK, M.; DROBNÝ, M.; CHMELÍK, M.; RYDLO, J.; TRATTNIG, S.; HÁJEK, M.; VALKOVIČ, L. Dynamic 31 P 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
- TÁBORSKÝ, P.; SOTORNÍK, I.; KASLÍKOVÁ, J.; SCHÜCK, O.; HÁJEK, M.; HORSKÁ, A. 31P magnetic resonance spectroscopy investigation of skeletal muscle metabolism in uraemic patients. *Nephron*. 1993, 65(2), 222–226. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8247184>
- TAYLOR, D.J.; KEMP, G.J.; RADDA, G.K. Bioenergetics of skeletal muscle in mitochondrial myopathy. *Journal of the Neurological Sciences*. 1994, 127(2), 198–206. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707079>
- TAYLOR, D.J.; STYLES, P.; MATTHEWS, P.M.; ARNOLD, D.A.; GADIAN, D.G.; BORE, P.; RADDA, G.K. Energetics of human muscle: exercise-induced ATP depletion. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1986, 3(1), 44–54. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3959889>
- TECILAZICH, F.; DINH, T.; LYONS, T.E.; GUEST, J.; VILLAFUERTE, R.A.; SAMPANIS, C.; GNARDELLIS, C.; ZUO, C.S.; VEVES, A. Postexercise phosphocreatine recovery, an index of mitochondrial oxidative phosphorylation, is reduced in diabetic patients with lower extremity complications. *Journal of Vascular Surgery*. 2013, 57(4), 997–1005. Dostupné z: DOI:10.1016/j.jvs.2012.10.011
- THOMPSON, C.H.; KEMP, G.J.; TAYLOR, D.J.; RADDA, G.K.; RAJAGOPALAN, B. No evidence of mitochondrial abnormality in skeletal muscle of patients with iron-deficient anaemia. *Journal of Internal Medicine*. 1993, 234(2), 149–154. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8340737>
- THOMSON, C.H.; GREEN, Y.S.; LEDUNGHAM, J.G.; RADDA, G.K.; RAJAGOPALAN, B. The effect of iron deficiency on skeletal muscle metabolism of the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1993, 147(1), 85–90. Dostupné z: DOI:10.1111/j.1748-1716.1993.tb09475.x
- TOSNER, Z.; DEZORTOVÁ, M.; TINTĚRA, J.; HÁJEK, M. Application of two-dimensional CSI for absolute quantification of phosphorus metabolites in the human liver. *Magma (New York, N.Y.)*. 2001, 13(1), 40–46. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410395>
- TOUSSAINT, J.F.; KOELLING, T.M.; SCHMIDT, C.J.; KWONG, K.K.; LARAIA, P.J.; KANTOR, H.L. Local relation between oxidative metabolism and perfusion in leg muscles of patients with heart failure studied by magnetic resonance imaging and spectroscopy. *The Journal of Heart and Lung Transplantation : The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1998, 17(9), 892–900. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9773862>
- TOWSE, T.F.; SLADE, J.M.; AMBROSE, J.A.; DELANO, M.C.; MEYER, R.A. Quantitative analysis of the postcontractile blood-oxygenation-level-dependent (BOLD) effect in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2011, 111(1), 27–39. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.01054.2009
- TOWSE, T.F.; SLADE, J.M.; MEYER, R.A. Effect of physical activity on MRI-measured blood oxygen level-dependent transients in skeletal muscle after brief contractions. *Journal of Applied Physiology*. 2005, 99(2), 715–722. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.00272.2005

- TUŠEK JELENC, M.; CHMELÍK, M.; BOGNER, W.; KRŠŠÁK, M.; TRATTNIG, S.; VALKOVIČ, L. Feasibility and repeatability of localized ^{31}P -MRS four-angle saturation transfer (FAST) of the human gastrocnemius muscle using a surface coil at 7T. *NMR in Biomedicine*. 2016, 29(1), 57–65. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3445
- UFFMANN, K.; MADERWALD, S.; AJAJ, W.; GALBAN, C.G.; MATEIESCU, S.; QUICK, H.H.; LADD, M.E. In vivo elasticity measurements of extremity skeletal muscle with MR elastography. *NMR in Biomedicine*. 2004, 17(4), 181–190. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.887
- VALKOVIČ, L.; BOGNER, W.; GAJDOŠÍK, M.; POVAŽAN, M.; KUKUROVÁ, I.J.; KRŠŠÁK, M.; GRUBER, S.; FROLLO, I.; TRATTNIG, S.; CHMELÍK, M. One-dimensional image-selected in vivo spectroscopy localized phosphorus saturation transfer at 7T. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2014, 72(6), 1509–1515. Dostupné z: DOI:10.1002/mrm.25058
- VALKOVIČ, L.; CHMELÍK, M.; JUST KUKUROVÁ, I.; JAKUBOVÁ, M.; KIPFELSBERGER, M.C.; KRUMPOLEC, P.; TUŠEK JELENC, M.; BOGNER, W.; MEYERSPEER, M.; UKROPEC, J.; FROLLO, I.; UKROPCOVÁ, B.; TRATTNIG, S.; KRŠŠÁK, M. Depth-resolved surface coil MRS (DRESS)-localized dynamic ^{31}P -MRS of the exercising human gastrocnemius muscle at 7 T. *NMR in Biomedicine*. 2014, 27(11), 1346–1352. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3196
- VALKOVIČ, L.; CHMELÍK, M.; JUST KUKUROVA, I.; KRŠŠÁK, M.; GRUBER, S.; FROLLO, I.; TRATTNIG, S.; BOGNER, W. Time-resolved phosphorous magnetization transfer of the human calf muscle at 3T and 7T: A feasibility study. *European Journal of Radiology*. 2013, 82(5), 745–751. Dostupné z: DOI:10.1016/j.ejrad.2011.09.024
- VALKOVIČ, L.; CHMELÍK, M.; KRŠŠÁK, M. In-vivo ^{31}P -MRS of skeletal muscle and liver: A way for non-invasive assessment of their metabolism. *Analytical Biochemistry*. 2017. Dostupné z: DOI:10.1016/j.ab.2017.01.018
- VALKOVIČ, L.; CHMELÍK, M.; MEYERSPEER, M.; GAGOSKI, B.; RODGERS, C.T.; KRŠŠÁK, M.; ANDRONESI, O.C.; TRATTNIG, S.; BOGNER, W. Dynamic ^{31}P -MRSI using spiral spectroscopic imaging can map mitochondrial capacity in muscles of the human calf during plantar flexion exercise at 7 T. *NMR in Biomedicine*. 2016, 29(12), 1825–1834. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3662
- VALKOVIČ, L.; CHMELÍK, M.; UKROPCOVÁ, B.; HECKMANN, T.; BOGNER, W.; FROLLO, I.; TSCHAN, H.; KREBS, M.; BACHL, N.; UKROPEC, J.; TRATTNIG, S.; KRŠŠÁK, M. Skeletal muscle alkaline Pi pool is decreased in overweight-to-obese sedentary subjects and relates to mitochondrial capacity and phosphodiester content. *Scientific Reports*. 2016, 6(1), 20087. Dostupné z: DOI:10.1038/srep20087
- VALKOVIČ, L.; UKROPCOVÁ, B.; CHMELÍK, M.; BALÁŽ, M.; BOGNER, W.; SCHMID, A.I.; FROLLO, I.; ZEMKOVÁ, E.; KLIMEŠ, I.; UKROPEC, J.; TRATTNIG, S.; KRŠŠÁK, M. Interrelation of ^{31}P -MRS metabolism measurements in resting and exercised quadriceps muscle of overweight-to-obese sedentary individuals. *NMR in Biomedicine*. 2013, 26(12), 1714–1722. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3008
- VAN DEN BROEK, N.M.A.; DE FEYTER, H.M.M.L.; GRAAF, L. D.; NICOLAY, K.; PROMPERS, J.J. Intersubject differences in the effect of acidosis on phosphocreatine recovery kinetics in muscle after exercise are due to differences in proton efflux rates. *AJP: Cell Physiology*. 2007, 293(1), C228–C237. Dostupné z: DOI:10.1152/ajpcell.00023.2007

- VAN DER KEMP, W.J.M.; STEHOUWER, B.L.; RUNGE, J.H.; WIJNEN, J.P.; NEDERVEEN, A.J.; LUIJTEN, P.R.; KLOMP, D.W.J. Glycerophosphocholine and Glycerophosphoethanolamine Are Not the Main Sources of the In Vivo ^{31}P MRS Phosphodiester Signals from Healthy Fibroglandular Breast Tissue at 7 T. *Frontiers in Oncology*. 2016, 6, 29. Dostupné z: DOI:10.3389/fonc.2016.00029
- VAN OORSCHOT, J.W.M.; SCHMITZ, J.P.J.; WEBB, A.; NICOLAY, K.; JENESON, J.A.L.; KAN, H.E. ^{31}P MR spectroscopy and computational modeling identify a direct relation between Pi content of an alkaline compartment in resting muscle and phosphocreatine resynthesis kinetics in active muscle in humans. *PLoS One*. 2013, 8(9), e76628. Dostupné z: DOI:10.1371/journal.pone.0076628
- VANDERTHOMMEN, M.; DUTEIL, S.; WARY, C.; RAYNAUD, J.S.; LEROY-WILLIG, A.; CRIELAARD, J.M.; CARLIER, P.G. A comparison of voluntary and electrically induced contractions by interleaved ^1H - and ^{31}P -NMRS in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2003, 94(3), 1012–1024. Dostupné z: DOI:10.1152/jappphysiol.00887.2001
- VARGHESE, J.; SCANDLING, D.; JOSHI, R.; ANEJA, A.; CRAFT, J.; RAMAN, S. V.; RAJAGOPALAN, S.; SIMONETTI, O.P.; MIHAL, G. Rapid assessment of quantitative T_1 , T_2 and T_2^* in lower extremity muscles in response to maximal treadmill exercise. *NMR in Biomedicine*. 2015, 28(8), 998–1008. Dostupné z: DOI:10.1002/nbm.3332
- WAHL, D.G.; SIMON, J.P.; ROBIN, B.; WALKER, P.; JOUANNY, P.; ESCANYE, J.M.; PAILLE, F.; SCHMIDT, C.; BRUNOTTE, F.; ROBERT, J. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy: a noninvasive technique for the study of occlusive arterial leg disease and peripheral vasodilator therapy. *Angiology*. 1994, 45(5), 367–376. Dostupné z: DOI:10.1177/000331979404500506
- WALTER, G.; VANDENBORNE, K.; MCCULLY, K.K.; LEIGH, J.S. Noninvasive measurement of phosphocreatine recovery kinetics in single human muscles. *The American Journal of Physiology*. 1997, 272(2 Pt 1), C525-34. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9124295>
- WARY, C.; NADAJ-PAKLEZA, A.; LAFORÊT, P.; CLAEYS, K.G.; CARLIER, R.; MONNET, A.; FLEURY, S.; BALIGAND, C.; EYMARD, B.; LABRUNE, P.; CARLIER, P.G. Investigating glycogenosis type III patients with multi-parametric functional NMR imaging and spectroscopy. *Neuromuscular Disorders : NMD*. 2010, 20(8), 548–558. Dostupné z: DOI:10.1016/j.nmd.2010.06.011
- WEBER-FAHR, W.; BACHERT, P.; HENN, F.A.; BRAUS, D.F.; ENDE, G. Signal enhancement through heteronuclear polarisation transfer in in-vivo ^{31}P MR spectroscopy of the human brain. *Magma*. 2003, 16(2), 68–76. Dostupné z: DOI:10.1007/s10334-003-0008-6
- WEST, A.M.; ANDERSON, J.D.; EPSTEIN, F.H.; MEYER, C.H.; HAGSPIEL, K.D.; BERR, S.S.; HARTHUN, N.L.; WELTMAN, A.L.; ANNEX, B.H.; KRAMER, C.M. Percutaneous intervention in peripheral artery disease improves calf muscle phosphocreatine recovery kinetics: a pilot study. *Vascular Medicine (London, England)*. 2012, 17(1), 3–9. Dostupné z: DOI:10.1177/1358863X11431837
- WIENER, D.H.; FINK, L.I.; MARIS, J.; JONES, R.A.; CHANCE, B.; WILSON, J.R. Abnormal skeletal muscle bioenergetics during exercise in patients with heart failure: role of reduced muscle blood flow. *Circulation*. 1986, 73(6), 1127–1136. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3698247>

- WILLCOCKS, R.J.; FULFORD, J.; BARKER, A.R.; ARMSTRONG, N.; WILLIAMS, C.A. Two Protocols to Measure Mitochondrial Capacity in Women and Adolescent Girls: A ³¹P-MRS Preliminary Study. *Pediatric Exercise Science*. 2014, 26(2), 210–217. Dostupné z: DOI:10.1123/pes.2013-0043
- WONG, R.; LOPASCHUK, G.; ZHU, G.; WALKER, D.; CATELLIER, D.; BURTON, D.; TEO, K.; COLLINS-NAKAI, R.; MONTAGUE, T. Skeletal muscle metabolism in the chronic fatigue syndrome. In vivo assessment by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chest*. 1992, 102(6), 1716–1722. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1446478>
- WRAY, D.W.; NISHIYAMA, S.K.; MONNET, A.; WARY, C.; DUTEIL, S.; CARLIER, P.G.; RICHARDSON, R.S. Multiparametric NMR-Based Assessment of Skeletal Muscle Perfusion and Metabolism During Exercise in Elderly Persons: Preliminary Findings. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2009, 64A(9), 968–974. Dostupné z: DOI:10.1093/gerona/glp044
- WU, F.-Y.; TU, H.-J.; QIN, B.; CHEN, T.; XU, H.-F.; QI, J.; WANG, D. H. Value of dynamic ³¹P magnetic resonance spectroscopy technique in in vivo assessment of the skeletal muscle mitochondrial function in type 2 diabetes. *Chinese Medical Journal*. 2012, 125(2), 281–286. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22340560>
- YOSHIDA, T.; ABE, D.; FUKUOKA, Y. Phosphocreatine resynthesis during recovery in different muscles of the exercising leg by ³¹P-MRS. *Scandinavian Journal of Medicine Science in Sports*. 2013, 23(5), e313-9. Dostupné z: DOI:10.1111/sms.12081
- YOSHIDA, T.; WATARI, H.; TAGAWA, K. Effects of active and passive recoveries on splitting of the inorganic phosphate peak determined by ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *NMR in Biomedicine*. 1996, 9(1), 13–19. Dostupné z: DOI:10.1002/(SICI)1099-1492(199602)9:1<13::AID-NBM394>3.0.CO;2-9
- YOUNKIN, D.P.; BERMAN, P.; SLADKY, J.; CHEE, C.; BANK, W.; CHANCE, B. ³¹P NMR studies in Duchenne muscular dystrophy: age-related metabolic changes. *Neurology*. 1987, 37(1), 165–169. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3796830>
- ZANGE, J.; GREHL, T.; DISSELHORST-KLUG, C.; RAU, G.; MÜLLER, K.; SCHRÖDER, R.; TEGENTHOFF, M.; MALIN, J.-P.; VORGERD, M. Breakdown of adenine nucleotide pool in fatiguing skeletal muscle in McArdle's disease: a noninvasive ³¹P-MRS and EMG study. *Muscle Nerve*. 2003, 27(6), 728–736. Dostupné z: DOI:10.1002/mus.10377
- ZATINA, M.A.; BERKOWITZ, H.D.; GROSS, G.M.; MARIS, J.M.; CHANCE, B. ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy: noninvasive biochemical analysis of the ischemic extremity. *Journal of Vascular Surgery*. 1986, 3(3), 411–420. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2936903>
- ZOLADZ, J.A.; KORZENIEWSKI, B.; KULINOWSKI, P.; ZAPART-BUKOWSKA, J.; MAJERCZAK, J.; JASIŃSKI, A. Phosphocreatine recovery overshoot after high intensity exercise in human skeletal muscle is associated with extensive muscle acidification and a significant decrease in phosphorylation potential. *The Journal of Physiological Sciences : JPS*. 2010, 60(5), 331–341. Dostupné z: DOI:10.1007/s12576-010-0101-3