

## DYNAMICKÁ *IN VIVO* <sup>31</sup>P MR SPEKTROSKOPIE ČLOVĚKA

Věnováno 30. výročí zavedení MR metod v IKEM.

MILAN HÁJEK<sup>a</sup>, PETR ŠEDIVÝ<sup>a,b</sup>, JAN KOVÁŘ<sup>a</sup> a MONIKA DEZORTOVÁ<sup>a</sup>

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

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

Došlo 12.5.17, přijato 14.6.17.

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

Klíčová slova: *in vivo* dynamická <sup>31</sup>P MR spektroskopie, energetický metabolismus svalu, pH svalu, mitochondriální kapacita

### Obsah

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

### 1. Úvod

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

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

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

Předkládaný přehledný článek představuje tuto mezioborovou biomedicínskou metodu a popisuje metodiky měření a zpracování *in vivo* dynamických <sup>31</sup>P MR vyšetření kosterních svalů člověka.

#### 1.1. *In vivo* <sup>31</sup>P MR spektroskopie

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

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

Izotop <sup>31</sup>P má jaderný spin rovný ½ a 100% přírodní zastoupení. Není bez zajímavosti, že první *in vivo* MR spektra tkání byla naměřena vysoko rozlišující <sup>31</sup>P NMR

Tabulka I

MR rezonanční frekvence ( $f_0$ ) a receptivita klinicky využitelných nuklidů

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

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

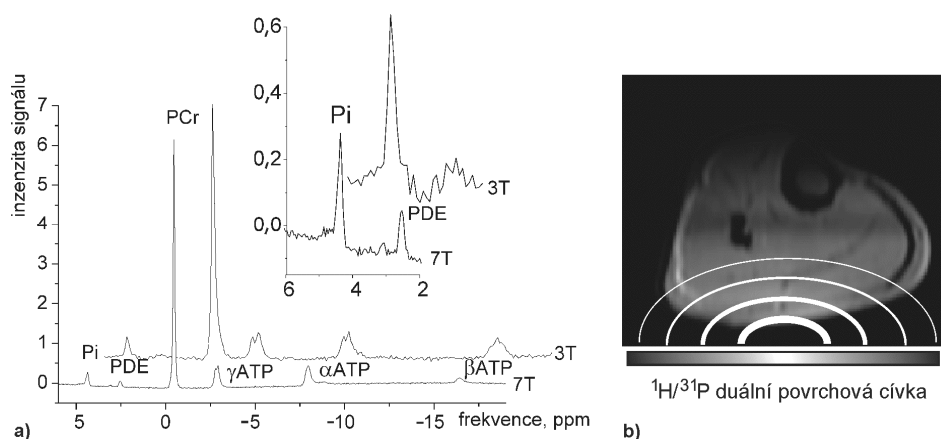
spektroskopii již před více než 40 lety<sup>2</sup>. Bylo to díky skutečnosti, že v živých tkáních je jen omezený počet metabolitů s dostatečnou koncentrací pro měření  $^{31}\text{P}$  *in vivo* MR spekter a žádný z těchto metabolitů se výrazně neodlišuje svou koncentrací tak, jako je tomu v případě  $^1\text{H}$  MR spektroskopie, kdy o několik řádů silnější signál vody byl po řadu let omezujícím faktorem aplikace *in vivo*  $^1\text{H}$  MR spektroskopie. Detegovatelné metabolity fosforu pozorovatelné  $^{31}\text{P}$  MRS na celotělových tomografech jsou především makroergní fosfáty zapojené do energetického metabolismu a sloučeniny metabolismu membránových fosfolipidů<sup>9–11</sup>.

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

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

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

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

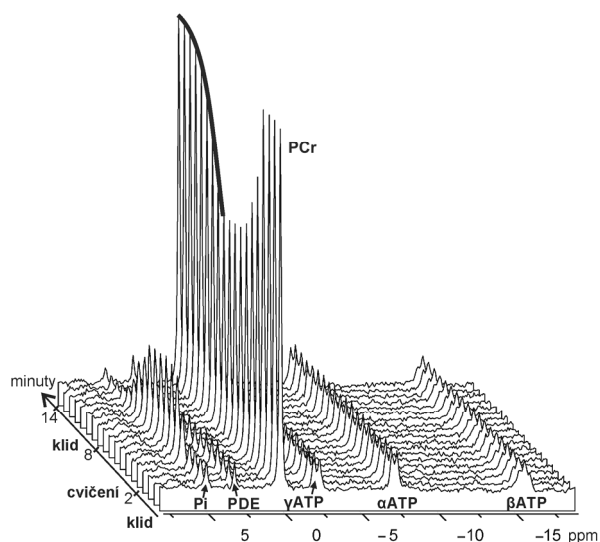


Obr. 1. a) Klidové  $^{31}\text{P}$  MR spektrum z lýtkového svalu při 3T a 7T zdravého dobrovolníka. Spektra byla měřena duální  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$  povrchovou cívkou (průměr 11 cm; 16 akvizic; repetiční čas 15 s; náběr signálu z volné precese); b) Příčný  $^1\text{H}$  MR obraz lýtkva. Signál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

Tabulka II  
Chemické posuny hlavních MR viditelných fosforových metabolitů<sup>11,29–31</sup>

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

Chemické posuny jsou vztaženy k signálu fosfokreatinu; vodné roztoky, pH 7; (Relaxační časy nejdůležitějších metabolitů<sup>32</sup> při 3T jsou uvedeny v závorkách: \*T1 [ms]; \*\*T2 [ms])

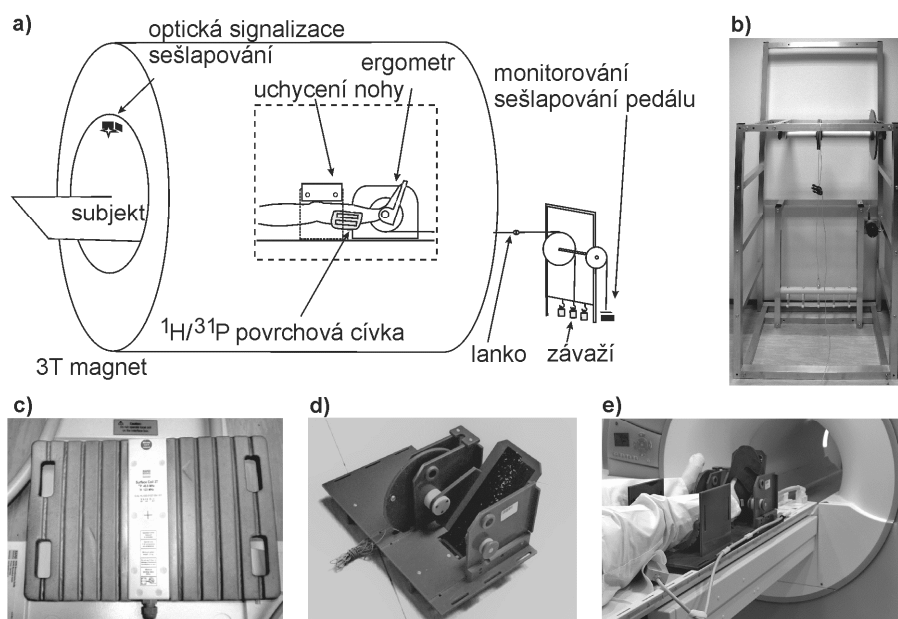


Obr. 2. Kumulovaný graf (stack plot) dynamické <sup>31</sup>P MR spektroskopie (výběr 4 spekter před zahájením cvičení, 7 spekter během cvičení a 8 spekter z klidové periody po cvičení), náběr signálu z volné precese

### 1.3. Technika měření spekter *in vivo* dynamickou <sup>31</sup>P MR spektroskopií

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

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



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

vané končetiny. Konstrukce ergometru by měla umožňovat kvantitativní měření vykonané práce, regulaci zátěže a v neposlední řadě zaručovat komfort vyšetřovaného subjektu během vyšetření, které by nemělo přesáhnout 60 minut. MR kompatibilní ergometry jsou buď mechanické, nebo pneumatické. Jsou dostupné komerčně, ale řada pracovišť používá vlastní konstrukce<sup>14</sup>. V celotělových MR tomografech se nejčastěji provádí měření lýtkových a stehenních svalů. Celá řada studií však byla provedena i na horizontálních experimentálních tomografech s průměrem tunelu kolem 20 cm, a to zvláště při zátěži svalů předloktí (např. cvičení prsty rukou<sup>15</sup>).

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

#### 1.4. Zpracování dynamických $^{31}\text{P}$ MR spekter

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

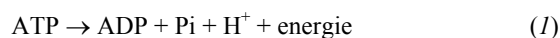
Měření absolutních koncentrací je obtížné vzhledem k používání povrchových cívek, kde hraje roli např. závislost sklápěcího úhlu radiofrekvenčního pulzu na vzdálenosti vyšetřovaného místa od cívky, vliv excitačního profilu cívky nebo nehomogenita vyšetřované oblasti. Doporučovány jsou techniky externího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

ní excitačního profilu<sup>8,12,13</sup>. Pro absolutní kvantifikaci lze také použít molární koncentraci ATP ve svalu známou z biochemických stanovení, tj. 8,2 mmol  $\text{l}^{-1}$ . Tato hodnota je ovšem jen orientační a lze ji použít jen u zdravých subjektů<sup>7</sup>.

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

### 2.1. Základní rovnice pro zpracování dat dynamické $^{31}\text{P}$ MR spektroskopie

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

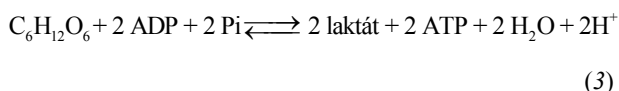


Ve svalu je relativně stálá zásoba ATP (8,2 mmol  $\text{l}^{-1}$ ) a okamžitý úbytek ATP je kompenzován hydrolyzou fosfokreatinu v reakci katalyzované kreatinkinase (2). Ta však postačí pokrýt potřebu ATP jen po dobu 7 až 10 sekund.



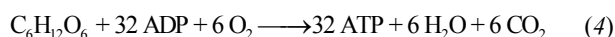
PCr tak udržuje stálou koncentraci ATP pro svalové kontrakce, než se rozběhnou další metabolické pochody poskytující ATP. Tento mechanismus je také aktivní v klidovém stavu, kdy je energie spotřebovávána především na udržení teploty svalu.

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



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

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



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

## 2.2. Informace ze spekter získaných dynamickou $^{31}\text{P}$ MR spektroskopií

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

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

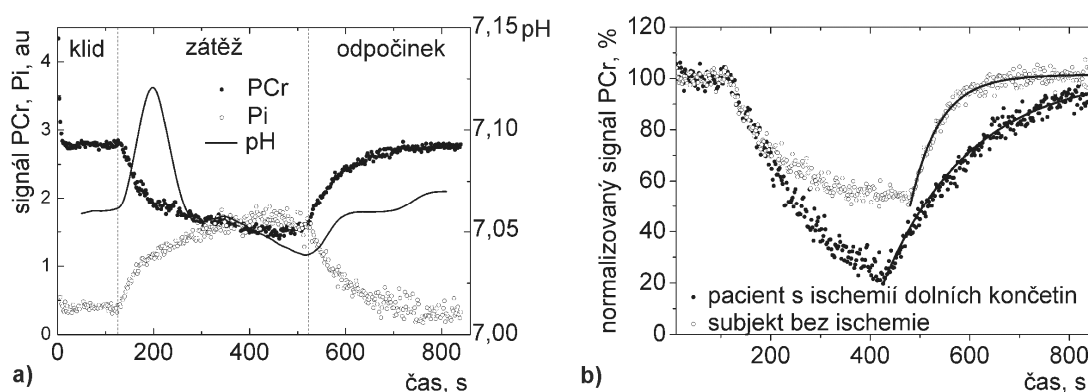
kde  $K_{\text{p}}$  je disociační konstanta pro rovnováhu:



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

Podobně lze využít i chemické posuny signálů  $\alpha\text{ATP}$  a  $\beta\text{ATP}$  pro výpočet koncentrace hořčíku ve svalové tkáni pro zpřesnění popisu reakcí katalyzovaných kreatinkinasou a adenylátkinasou<sup>9,15,18</sup>.

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



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

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

Pro kvantitativní popis dynamického  $^{31}\text{P}$  MR experimentu, který umožňuje porovnání různých subjektů nebo experimentů, se používá několik parametrů. Jak již bylo výše zmíněno, při vyšetřování kosterního svalu při zátěži je nejvýhodnější sledování změn  $^{31}\text{P}$  signálů po fyzické zátěži. Po cvičení probíhá doplňování koncentrace ATP aerobní metabolickou dráhou. Příspěvek anaerobního metabolismu se považuje za zanedbatelný<sup>6</sup>. Současně se reverzní kinasovou reakcí vrací intenzita signálu PCr do klidových hodnot a matematickou analýzou průběhu návratu se získají informace o mitochondriální syntéze ATP. Návrat intenzit signálu PCr do rovnovážného stavu je popsán exponenciální rovnicí:

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

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

Počáteční rychlost resyntézy PCr –  $V_{\text{iPCr}}$ , která charakterizuje oxidativní fosforylační tok<sup>19</sup>  $\text{ATP}_{\text{flux\_PCr}}$  (vyjma bazálního příspěvku), je popsána vztahem:

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

Nejdůležitější kvantitativní veličinou popisující metabolický stav svalu je mitochondriální kapacita svalu<sup>20</sup> –  $Q_{\text{max}}$  (9). Je to maximální rychlost oxidativní syntézy ATP v mitochondriích, kterou jsou schopny mitochondrie dosáhnout. Tento parametr je závislý jen na počtu mitochondrií a jejich oxidativních schopnostech a je nezávislý na velikosti svalu.

V prvním způsobu výpočtu  $Q_{\text{max}}$  se vychází z lineárního modelu stanovení maximální rychlosti oxidativní syntézy ATP, který předpokládá lineární vztah mezi  $V_{\text{iPCr}}$  a velikostí poklesu PCr. Při extrapolaci na 100% pokles PCr by  $V_{\text{iPCr}}$  mělo odpovídat mitochondriální kapacitě ( $Q_{\text{max}_1}$ ):

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

Tento model má však řadu omezení<sup>6,21</sup> a jeho význam je pouze orientační.

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

$$Q_{\text{max\_ADP}} = V_{\text{iPCr}}(1 + K_m/[\text{ADP}]_{e\_ex}) = \text{ATP}_{\text{flux\_PCr}}(1 + K_m/[\text{ADP}]_{e\_ex}) \quad (10)$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Hodnoty parametrů získané z rovnic (5) – (14) tvoří soubor základních hodnot pro studium metabolismu svalu pomocí  $^{31}\text{P}$  MR spektroskopie. Je nutné poznamenat, že absolutní hodnoty mitochondriálních kapacit  $Q_{\text{max}_G}$ ,  $Q_{\text{max}_n}$ ,  $Q_{\text{max\_ADP}}$ ,  $Q_{\text{max}_1}$  vypočtené podle vztahů (9) – (14) nejsou porovnatelné. Pro kvantitativní výpočty se používá řada konstant, které byly a jsou získávány různými způsoby. Tab. III sumarizuje hodnoty konstant používané pro výpočet parametrů energetického metabolismu svalů.

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

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

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

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

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

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

$$\text{ATP}_{\text{flux\_gl}} = 3/2 (H_{\text{ef\_flux}} + H_{\text{pufer}} - g\text{ATP}_{\text{flux\_PCr}} - m\text{ATP}_{\text{flux\_Ox}}) \quad (15)$$

### 3. Aplikace *in vivo* $^{31}\text{P}$ MR spektroskopie

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

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

### 4. Závěr

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

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

### LITERATURA

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

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

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

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