

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

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

přehledový článek

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

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

Přijato: 15. 11. 2017.

Korespondenční adresa:

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

Konflikt zájmů: žádný.

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

Hlavní stanovisko práce

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

SOUHRN

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

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

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

Major statement

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

SUMMARY

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

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

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

ÚVOD

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

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

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

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

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

FOSFOROVÁ MR SPEKTROSKOPIE

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

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

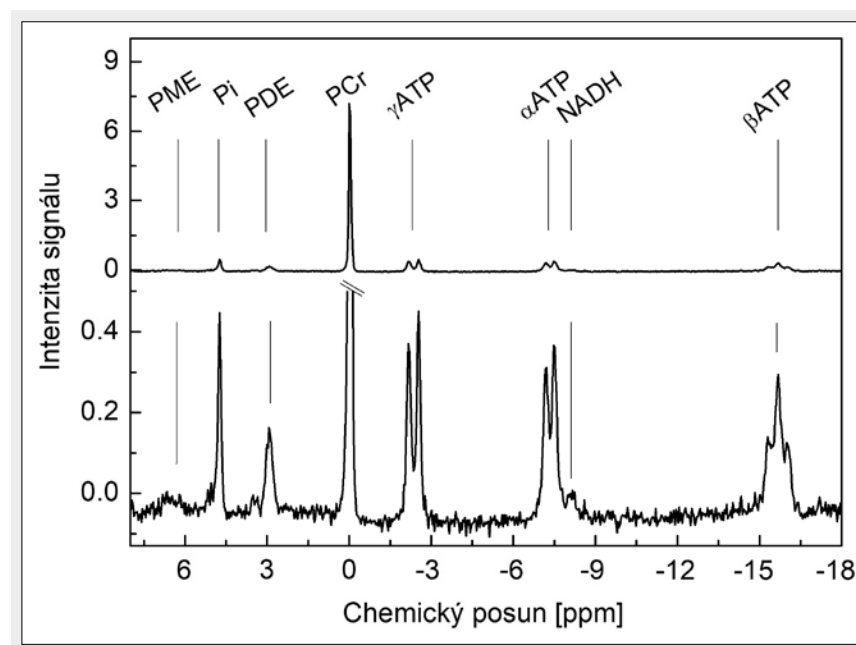
Table 1. MR resonance frequency (f_0) and receptivity of the most clinically interesting nuclides

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

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

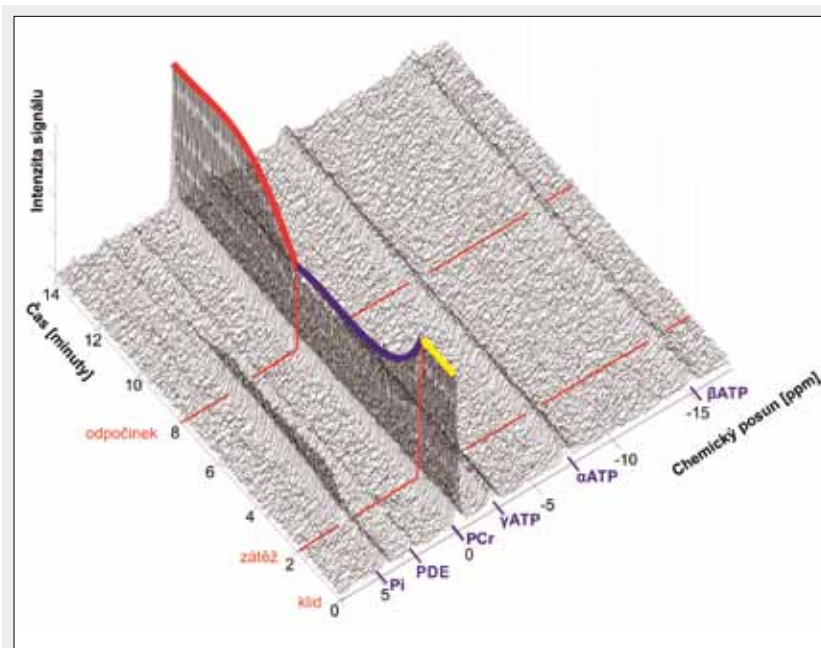
Pro měření se tedy používají spektroskopické techniky (náběr signálu z volné precese – FID, single voxel spektroskopie – SVS, spektroskopické zobrazování – CSI) bez použití selektivního potlačování konkrétního signálu, nejčastěji v kombinaci s povrchovými cívkami, které mohou být také samostatně použity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

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



◀ Obr. 1

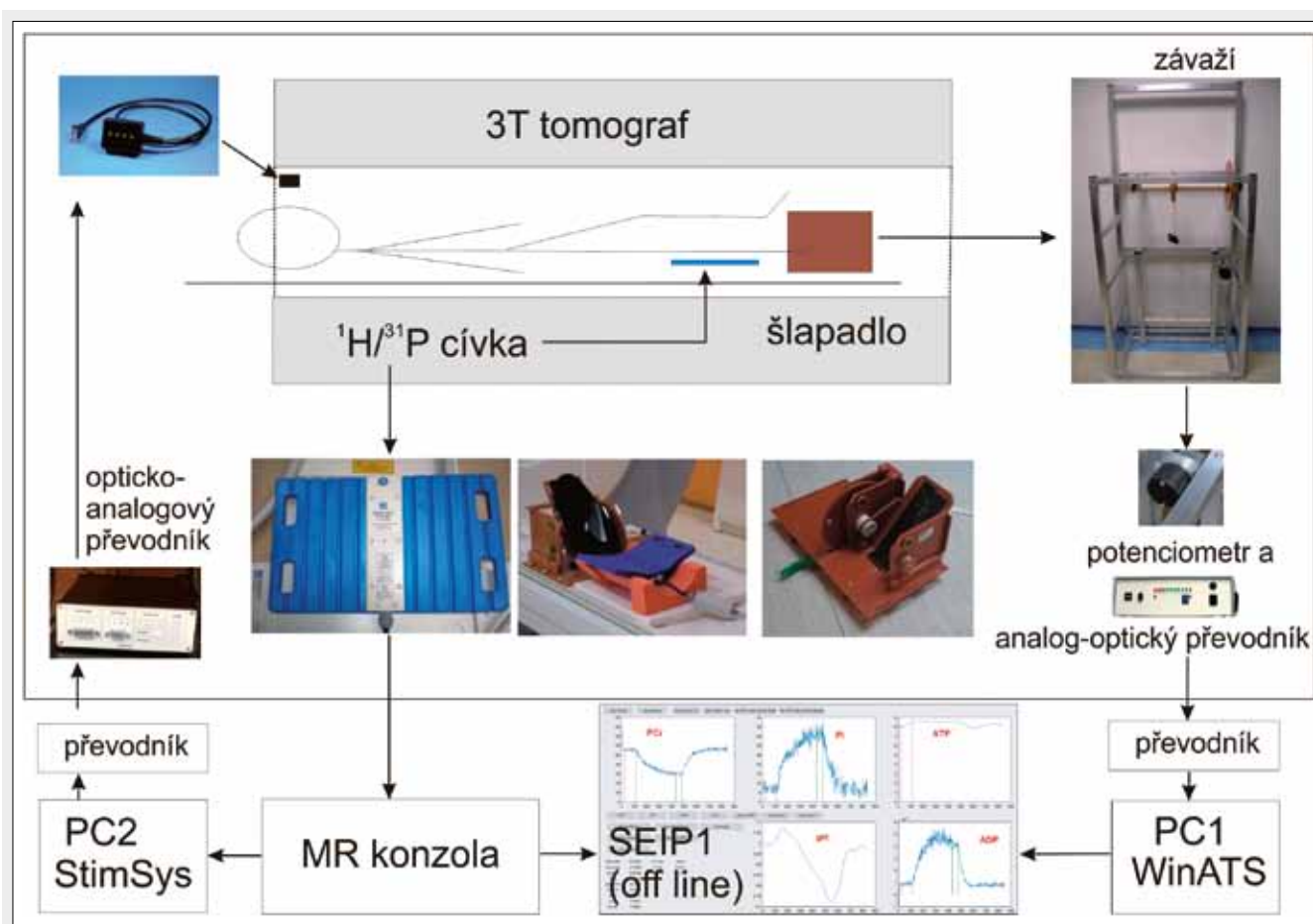
Obr. 1. ^{31}P MR spektrum z lýtkového svalu, spektrum měřeno povrchovou cívkou a sekvencí FID (3 T, 16 akvizic, TR = 15 s). Signály ve spektru: PME – fosfomonoestery, Pi – anorganický fosfát, PDE – fosfodiester, PCr – fosfokreatin, ATP – adenosintrifosfát (signály α , β , γ , při dobrém shimu je pozorovatelné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



Obr. 2

Obr. 2. Kumulovaný graf průběhu vyšetření dynamickou ^{31}P MRS lýtkového svalu při 3 T. Vyšetřovací protokol používaný v IKEM: akumulace spekter v klidu – 2 minuty ($\text{TR} = 2$ s); akumulace spekter při cvičení uvnitř magnetu po dobu 6 minut s frekvencí 1 sešlápnutí za 2 s; akumulace spekter v klidu po dobu 6 minut, vyhodnocuje se rychlost exponenciálního návratu PCr do klidových hodnoty (v grafu modrou čarou zdůrazněn pokles a červenou křivkou návrat ke klidovým hodnotám). Vyhodnocení výsledků se provádí semi-automaticky programem SEIP1, který využívá program jMRUI a další funkce MATLAB pro zpracování dat.

Fig. 2. A stacked plot of dynamic ^{31}P MRS examination of calf muscles at 3T. The examination protocol used in IKEM: 2-minute acquisition of spectra at rest ($\text{TR} = 2$ s); acquisition of spectra during 6 minutes of exercise inside the magnet, frequency of pedaling is once per 2 s; 6-minute data acquisition at rest to obtain recovery data for the calculation of dynamic parameters. The evaluation is performed via semi-automatic software SEIP1 which includes the jMRUI and MATLAB functions.



Obr. 3

Obr. 3. Schematické uspořádání pro dynamickou ^{31}P MR spektroskopii v IKEM. Pro řízení a zpracování dat se používá software: StimSYS – domácí software pro spouštění měřicí sekvence a signalizace (Rydlo J, Tintěra J, IKEM); SEIP1 – domácí vyhodnocovací software pro zpracování a interpretaci dat (Šedivý P, IKEM); WinATS – komerční software pro sledování vykonané práce (SYSMA, Francie).

Fig. 3. Set-up of equipment for dynamic ^{31}P MR spectroscopy in IKEM. Experiments and data processing are controlled by software: StimSYS – home-made software for data acquisition control (Rydlo J, Tintěra J, IKEM); SEIP1 – home-made software for data evaluation (Šedivý P, IKEM); WinATS – commercial software for monitoring the work performed (SYSMA, France).

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

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

KLINICKÁ ^{31}P MRS

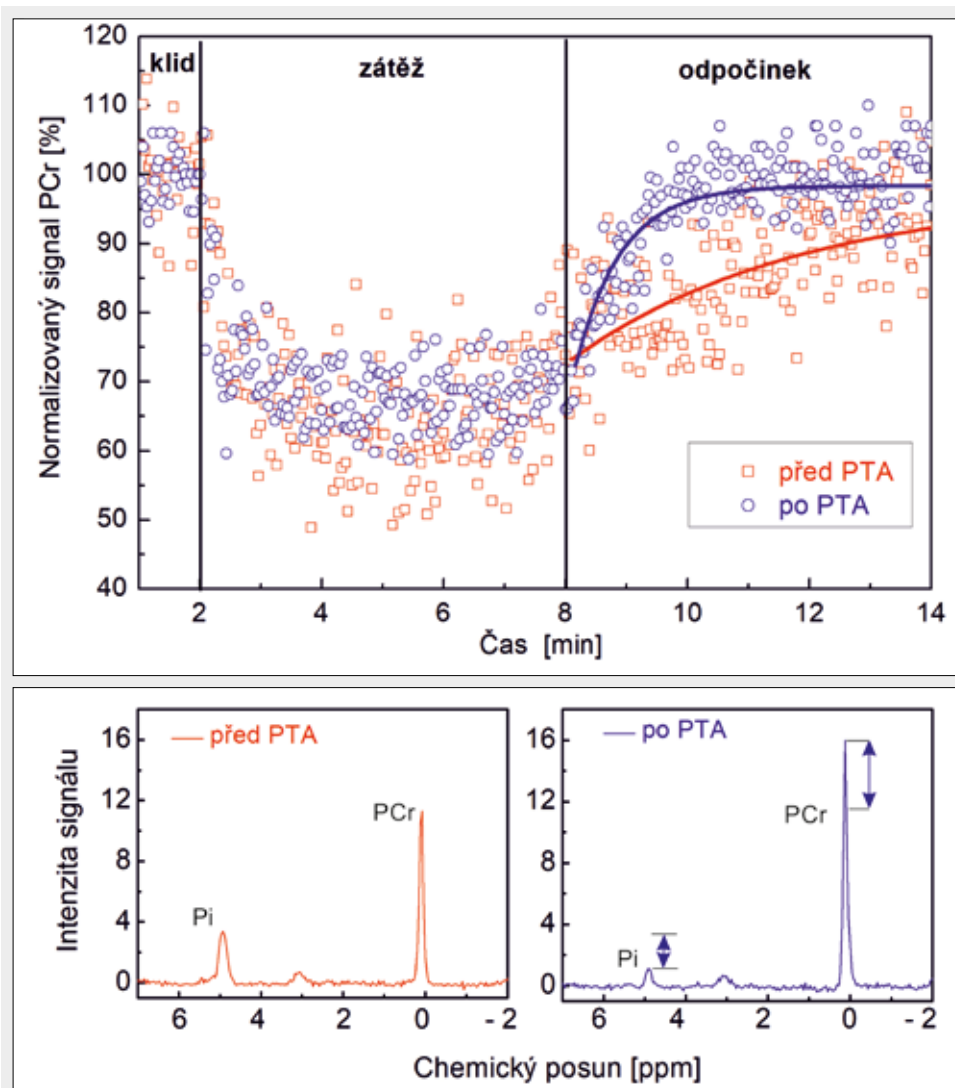
Vyšetřování kosterních svalů

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

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

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

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



◀ Obr. 4A

◀ Obr. 4B

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

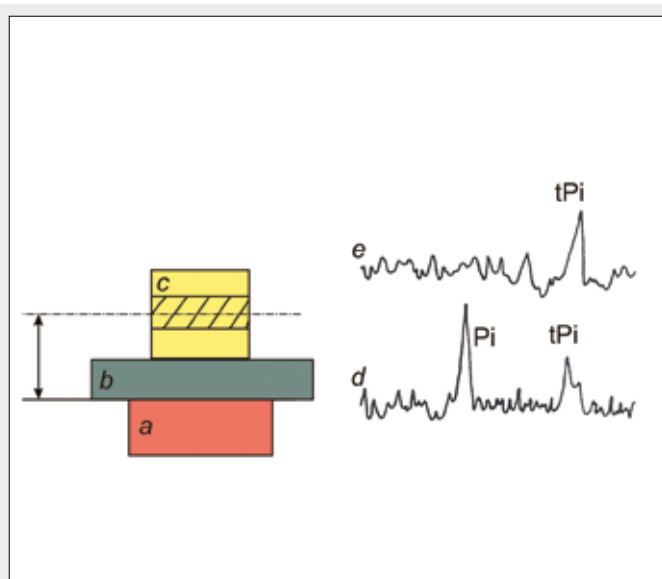
Fig. 4. ^{31}P MRS spectra of calf muscles one day before and after PTA. A – the difference in energy metabolism is pronounced in dynamic MRS – PCr recovery to the rest values after PTA is three times faster than before PTA; B – the difference in rest intensities PCr is about 34%.

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

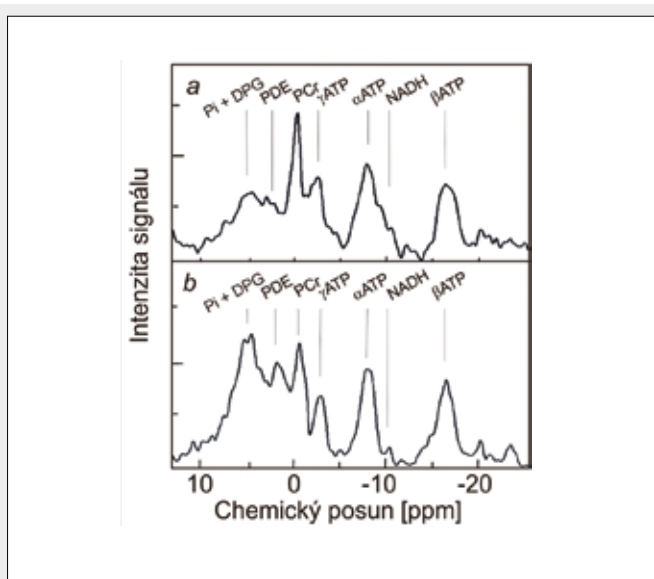
První publikované výsledky fosforové MR spektroskopie z IKEM se datují do roku 1990 (9). Tato úplně první publikace měla za cíl seznámit širší odbornou veřejnost s touto novou vyšetřovací metodou. Zároveň ale také již přinášela konkrétní srovnání klidového svalového metabolismu u pacientů s chronickým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

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

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



▲ Obr. 5A



▲ Obr. 5B

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

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

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

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

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

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

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

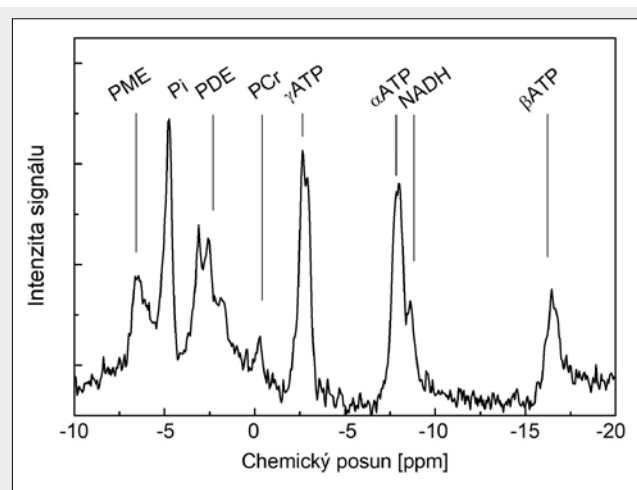
Vyšetřování srdce

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

Vyšetřování jater a ledvin

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

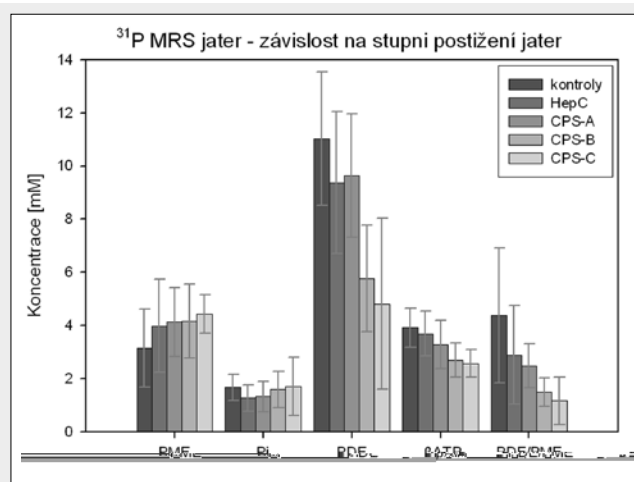
V současných studiích se využívá zkušeností, které jsme získali při vyšetřování jater na 1,5 T MR tomografu. Dva grantové projekty na 1,5 T MR tomografu byly zaměřeny na energetický metabolismus jater při různém stupni jejich poškoze-



▲ Obr. 6

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

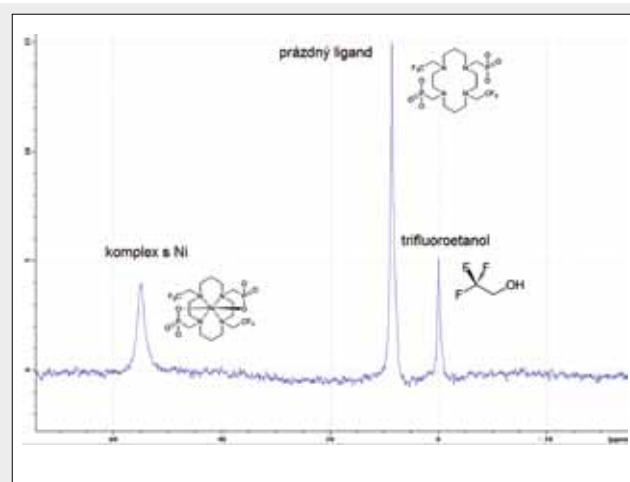
Fig. 6. ^{31}P MR spectrum of the liver of a healthy volunteer. Spectrum obtained with surface coil and 1D ISIS sequence at 3 T (VOI ~ 100 ml ml, 128 acquisitions, TR 2s). Signals in the spectrum: PME – phosphomonoesters, Pi – inorganic phosphate, PDE – phosphodiesteres, PCr – phosphocreatine (contamination from surrounding tissue), ATP – adenosintrifosphate (α , β , γ signals; J-coupling is visible if the shim is good enough), NADH – nicotinamide adenine dinucleotide (its signal is overlapped with α ATP signal) (IKEM 2017)



▲ Obr. 7

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

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

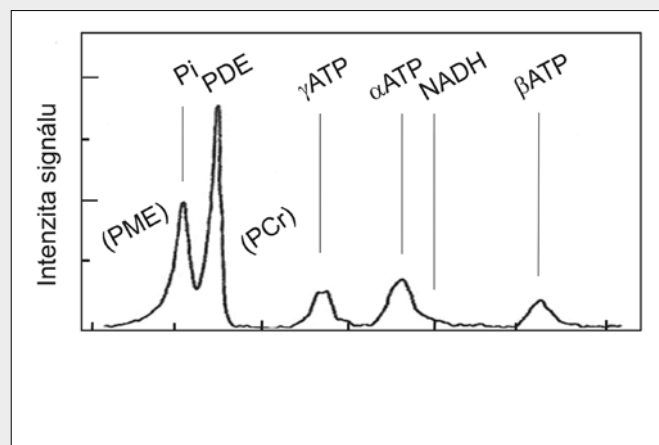


▲ Obr. 9

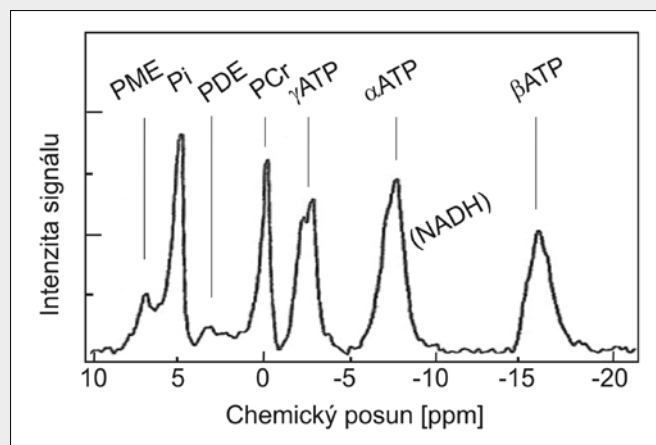
Obr. 9. ^{19}F MR spektrum fantomu se třemi rozdílnými sloučeninami. Nejvyšší signál (uprostřed) odpovídá fluorovanému ligandu na bázi tetraazacyclotetradekanu, signál vlevo téže sloučenině s navázaným iontem niklu, který způsobuje výrazný chemický posun. Jako reference byl použit trifluoroethanol (pravý signál). Všechny tři sloučeniny mají všechny své fluorové ionty magneticky ekvivalentní, proto každou sloučeninu ve spektru reprezentuje jeden signál.

Fig. 9. ^{19}F MR spectrum of a phantom containing three different compounds. The highest signal (middle) corresponds to a fluorinated ligand based on tetraazacyclotetradecane, the left signal corresponds to the complex of the same compound with nickel ion, which causes a distinct chemical shift. Trifluoroethanol (right signal) was used as a reference. All the three compounds have their fluorine ions magnetically equivalent; therefore, each of them is represented by a single signal.

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

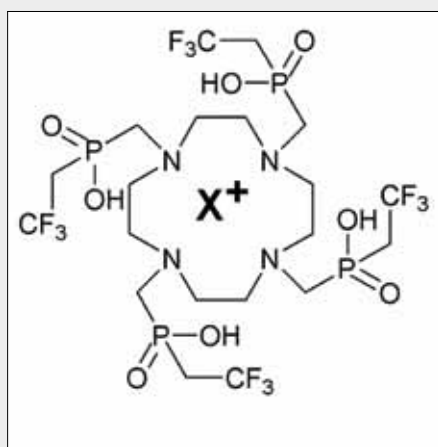


▲ Obr. 8A

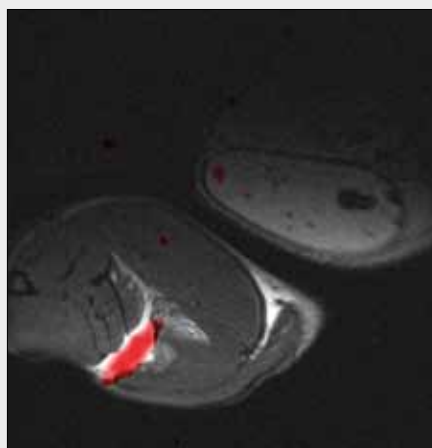


▲ Obr. 8B

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



▲ Obr. 10A



▲ Obr. 10B

Obr. 10. ^{19}F MR zobrazení pomocí komplexu DOTPtf (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluoroethyl)fosfinové kyseliny]). A – struktura komplexu s kationem lanthanoidu (X^+) má 12 magneticky ekvivalentních fluorových jader; B – fluorové zobrazení (červená oblast, sekvence turbospinového echa) po injekční aplikaci kontrastní látky DOTPtf-Yb do lýtky potkana na pozadí standardního ^1H MR obrazu (T_2 -vážená turbospinová sekvence). ^{19}F MR obraz byl interpolován na velikost matice ^1H MR obrazu.

Fig. 10. ^{19}F MR imaging using a complex DOTPtf (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis[methyl(trifluoroethyl)fosfin acid]). A – complex structure with a lanthanoid cation (X^+) has 12 magnetically equivalent fluorine nuclei. B – fluorine imaging (red scale, turbospin echo sequence) after application of the contrast agent DOTPtf-Yb into the calf muscle of a rat overlaid over the background of a standard ^1H MR image (T_2 -weighted turbospin echo sequence). The ^{19}F MR image was interpolated to match the size of the ^1H MR image.

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

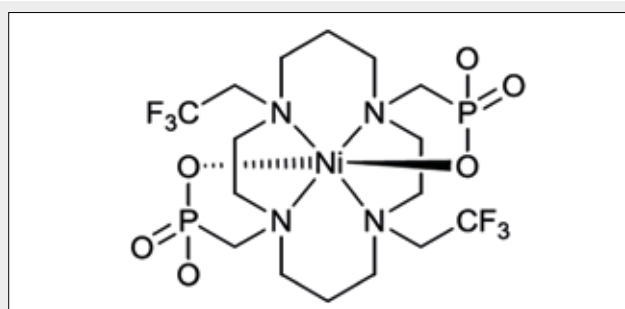
Další krok vedl k precirhotickým stádiím poškození jater. Pro analýzu byla vybrána skupina pacientů s chronickou hepatitidou C s různým stupněm fibrózy. V tomto případě však nebyla ^{31}P MR spektroskopie dostatečně citlivá, aby prokázala signifikantní rozdíly ve spektrech od zdravých dobrovolníků nebo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

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

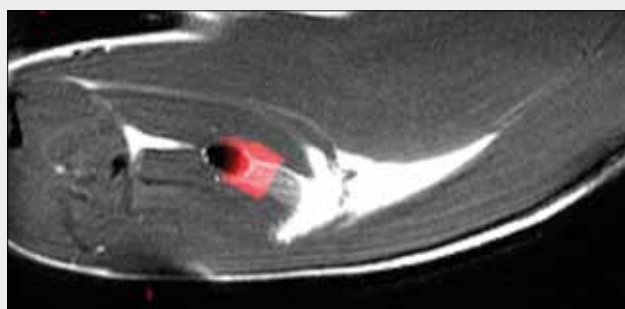
EXPERIMENTÁLNÍ ^{31}P MRS

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

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



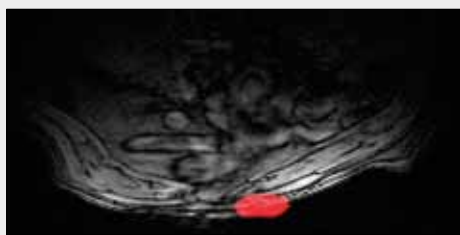
▲ Obr. 11A



▲ Obr. 11B

Obr. 11. ^{19}F MR zobrazení pomocí komplexu na bázi tetraazacyklotetradekanu s niklem. A – struktura komplexu s šesti magneticky ekvivalentními fluorovými jádry; B – ^{19}F MR obraz (červená oblast, sekvence gradientního echa) po injekční aplikaci kontrastní látky na bázi komplexu niklu do lýtky potkana na pozadí standardního ^1H MR obrazu (T_2 -vážená turbospinová sekvence). Kontrastní látka je přesně lokalizovatelná jako hypointenzní oblast i na ^1H MR obrazu.

Fig. 11. ^{19}F MR imaging with nickel complex of tetraazacyclotetradecane. A – the structure of the complex with six magnetic equivalent fluorine cores; B – ^{19}F MR image (red area, gradient echo sequence) after the injection of the complex into the rat calf; ^{19}F image is on the background of ^1H MR image (T_2 turbo-spine sequence). Contrast agent is localized as hypointensive area in ^1H MR image too.



▲ Obr. 12

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

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

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

EXPERIMENTÁLNÍ FLUOROVÁ MAGNETICKÁ REZONANCE

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

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

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

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

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

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

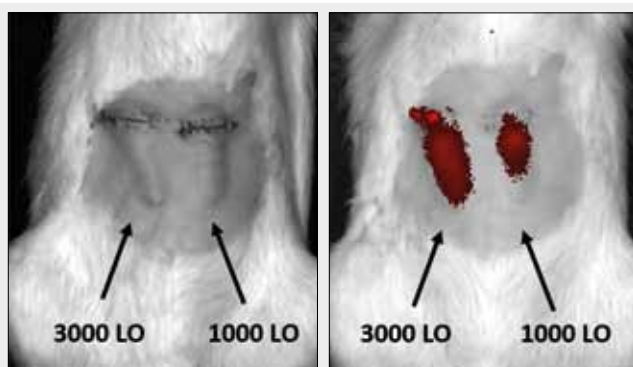
Komplex s niklem založený na tetraazacyklotetradekanu se šesti magneticky ekvivalentními fluorovými jádry (obr. 11A) má relaxační časy v řádu milisekund ($T_1 = 4,2$ ms, $T_2 = 1,8$ ms, $T_2^* = 1,1$ ms) (33), což umožňuje extrémní zkrácení měřicí sekvenční a zvýšení poměru signál/šum více akvizicemi.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

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

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

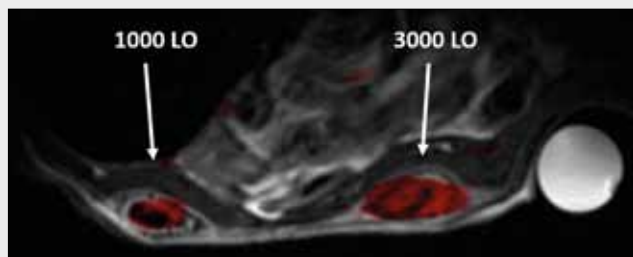
Table 2. ^{19}F relaxation times of DOTPtf complexes with lanthanides Ce, Yb, Tm, Dy and Ho

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



▲ Obr. 13A

▲ Obr. 13B



▲ Obr. 13C

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

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

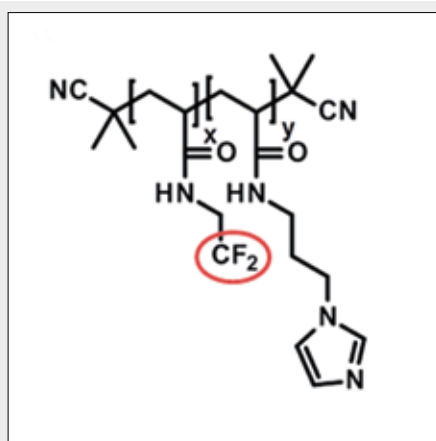
na pro značení a následnou detekci transplantovaných buněk a malých buněčných útvarů.

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

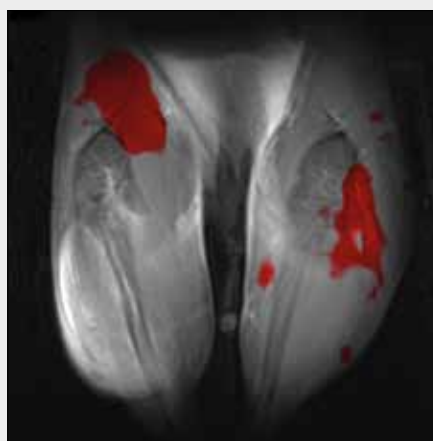
Potenciálně velmi zajímavou aplikací ^{19}F MRI je sledování lokálně aplikovaných polymerních nosičů léčiv. Ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie Akademie věd ČR byly testovány také termoresponzivní a pH-senzitivní látky, které při teplotách nad 20°C změni fázi z tekuté na pevnou. Po aplikaci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

ZÁVĚR

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



▲ Obr. 14A



▲ Obr. 14B

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

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

LITERATURA

1. **Bottomley PA, Edelstein WA, Foster TH, Adams WA.** In vivo solvent-suppressed localized hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy: a window to metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(7): 2148–2152.
2. **Gladys H, Fuller J.** Nuclear spins and moments. *Phys Chem Ref* 1976; 5: 835.
3. **Dezortova M, Taimr P, Skoch A, Spicak J, Hajek M.** Etiology and Functional Status of Liver Cirrhosis by 31P MR Spectroscopy. *World J Gastroenterol* 2005; 11(44): 6926–6931.
4. **Hájek M, Palyzová D, Kořínek M, Kurková D.** Concentrations of free Mg²⁺, pH and 31P MR Metabolite Ratios in Calf Muscles of Healthy Controls and Patients with Primary Juvenile Hypertension. *Physiol Res* 2002; 51: 159–167.
5. **Kemp GJ, Radda GK.** Quantitative interpretation of bioenergetic data from 31P and 1H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q* 1994; 10(1): 43–63.
6. **Argov Z, Bank WJ, Maris J, Peterson P, Chance B.** Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies: phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *Neurology* 1987; 37(2): 257–262.
7. **Kemp GJ, Ahmad RE, Nicolay K, Prompers JJ.** Quantification of skeletal muscle mitochondrial function by 31P magnetic resonance spectroscopy techniques: a quantitative review. *Acta Physiol* 2015; 213(1): 107–144.
8. **Hájek M, Šedivý P, Kovář J, Dezortová M.** Dynamická in vivo 31P MR spektroskopie člověka. *Chem Listy* 2017; 111: 516–523.
9. **Hájek M, Horská A, Belán A, Tábořský P, Grosmanová A.** Application of 31P MR spectroscopy for study of human muscles in vivo (Czech). *Prakt. Lék.* 1990; 70: 538–544.
10. **Tábořský P, Sotorník I, Kašlíková J, et al.** Uremická myopatie v obraze magnetické rezonanční spektroskopie. *Prakt. Lék.* 1991; 71: 303–306.
11. **Tábořský P, Sotorník I, Kašlíková J, et al.** 31P Magnetic resonance spectroscopy investigation of skeletal muscle metabolism in uraemic patients. *Nephron* 1993; 65: 222–226.
12. **Hájek M, Grosmanová A, Horská A, et al.** Initial clinical experience using the method of 31P MR spectroscopy in investigations of neuromuscular diseases in children. *Čes Slov Neurol N* 1991; 54/87: 149–156.
13. **Hájek M, Grosmanová A, Horská A, Urban P.** Comparison of the clinical state and its changes in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy with results of in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy. *Eur Radiol* 1993; 3(6): 499–506.
14. **Kratochvílová S, Vyhnanovská P, Vlasáková Z, et al.** Metabolic characteristics of soleus muscle in relation to insulin action in the offspring of hypertensive parents. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2006; 55(10): 1388–1396.
15. **Resnick LM.** Cellular ions in hypertension, insulin resistance, obesity, and diabetes: a unifying theme. *J Am Soc Nephrol* 1992; 3(4 Suppl): S78–85.
16. **Štich V, Hájek M, Horská A.** Effect of very low-energy diet on muscle bioenergetics at rest and during exercise: A 31-P in vivo NMR spectroscopy study. *Obesity in Europe 1991* (Ailhaud G, et al. (eds.)), 23–27. J Libbey and Comp Ltd 1991.
17. **Sedivý P, Kipfelsberger MC, Dezortova M, et al.** Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design. *Med Phys* 2015; 42(4): 1678–1689.
18. **Chmelik M, Povazan M, Jiru F, et al.** Flip-angle mapping of 31P coils by steady-state magnetic resonance spectroscopic imaging. *J Magn Reson Imaging* 2014; 40(2): 391–397.
19. **Němcová A, Dubský M, Jirkovská A, et al.** Diabetic foot syndrome: importance of calf muscles MR spectroscopy in the assessment of limb ischemia and effect of revascularization. *Vnitř. Lék.* 2017; 63(4): 236–241.
20. **Horská A.** Využití magnetické rezonance při diagnostice morfologických změn v myokardu. *Závěrečná zpráva grantu IGA 0106-3*, 1993.
21. **Kessler P.** Program SOFIS pro vyhodnocování 31P MR spekter, SIB, 1990.
22. **Horská A, Fridl P, Hájek M, et al.** 31P in vivo MR spectroscopy of myocardium (Czech). *Prakt. Lék.* 1992; 72: 103–106.
23. **Palecek T, Bultas J, Hajek M, et al.** Association between cardiac energy metabolism and gain of left ventricular mass in Fabry disease. *Int J Cardiol* 2010; 144: 337–339.
24. **Tošner Z, Dezortová M, Tintěra J, Hájek M.** Application of two-dimensional CSI for absolute quantification of phosphorus metabolites in the human liver. *Magn Reson Mater Phy* 2001; 13: 40–46.
25. **Vyhnanovska P, Dezortova M, Herynek V, et al.** In vivo 31P MR spectroscopy of human kidney grafts using the 2D-chemical shift imaging method. *Transplant Proc* 2011; 43(5): 1570–1575.
26. **Kurková D, Herynek V, Gintelová J, Tábořský P, Hájek M.** Potential of the 31P MR spectroscopy in monitoring of the viability of human grafts stored in euro-collins perfusion solution. *Physiol Res* 1995; 44: 327–332.
27. **Hájek M, Bohm F.** Temperature Probe for organ examination using 31P spectroscopy and 1H MR imaging. *Cryo Letters* 1990; 11: 401–404.
28. **Kurkova D, Hájek M.** A stable-temperature container suitable for 31P MRS and 1H MRI examination of organs in hypothermia. *Cryo Letters* 1994; 15: 267–268.
29. **Horská A, Vavříčková H, Hájek M, et al.** Phosphate pool of isolated dog heart during global ischemia: comparison of two. *Cardioplegic solutions with 31P MR spectroscopy.* *Physiol Res* 1991; 40: 427–436.
30. **Hoult DI, Busby SJ, Gadian DG, et al.** Observation of tissue metabolites using 31P nuclear magnetic resonance. *Nature* 1974; 252(5481): 285–287.
31. **Jozefovicova M, Herynek V, Jiru F, et al.** 31P MR Spectroscopy of the testes and immunohistochemical analysis of sperm of transgenic boars carried n-terminal part of human mutated huntingtin. *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(Suppl 2): S2S28–S2S33.
32. **Jozefovicova M, Herynek V, Jiru F, et al.** Minipig model of Huntington's disease: (1) H magnetic resonance spectroscopy of the brain. *Physiol Res* 2016; 65(1): 155–163.
33. **Blahut J, Hermann P, Gálisová A, et al.** Nickel(II) complexes of N-CH₂CF₃ cyclam derivatives as contrast agents for 19F magnetic resonance imaging. *Dalton Trans* 2016; 45(2): 474–478.
34. **Herynek V, Martinisková M, Gálisová A, et al.** Contrast agents with chelated lanthanoid ions for 19F MR imaging. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2014; 22: 3837.
35. **Herynek V, Gálisová A, Blahut J, et al.** A probe for a combined 1H and 19F in vivo MRI. *World Molecular Imaging Meeting, NY* 2016; control ID 2493856.
36. **Srinivas M, Cruz LJ, Bonetto F, et al.** Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging. *Biomaterials* 2010; 31(27): 7070–7077.
37. **Herynek V, Gálisová A, Srinivas M, et al.** Pre-microporation improves outcome of pancreatic islet labelling for optical and 19F MR imaging. *Biological Procedures Online* 2017; 19: 6.
38. **Jiráček D, Gálisová A, Sedláček O, Hrubý M, Hájek M.** A novel theranostic thermoresponsive 19F probe for tumor imaging. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2017; 25: 3588.