

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta



Dizertační práce

**Studium metabolismu kosterního svalu technikami
MR spektroskopie a MR zobrazování**

MUDr. Antonín Škoch

Školitel: Ing. Milan Hájek DrSc.

Praha 2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorského studijního programu biomedicíny na 2. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

MUDr. Antonín Škoch

Oddělení magnetické rezonance - ZRIR

Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)

Vídeňská 1958/9

140 21 Praha 4

ansk@medicon.cz

Oborová rada: 11 – Lékařská biofyzika

Školitel: Ing. Milan Hájek, DrSc.

V Praze dne 16. 1. 2007

Rád bych poděkoval svému školiteli Ing. Milanu Hájkovi, Dr.Sc. za jeho trpělivý přístup a všestrannou podporu při přípravě dizertační práce a souvisejících publikací.

Těž děkuji Mgr. Filipovi Jirů, Ph.D. za jeho cenné rady a četné konzultace, které mi velmi pomohly v získání znalostí potřebných k práci na tomto tématu.

Můj veliký dík patří mé ženě Janě za její lásku, pochopení a trpělivost.

*Experimentální části níže publikovaných studií byly podpořeny granty
č. CEZ:L17/98:00023001, OC B21, MZO 00023001, IGA MZ NB 7517-3 a MSMT:
1M0002375201*

Obsah

Obsah	3
Použité zkratky	5
<u>1 Úvod</u>	<u>8</u>
<u>2 Cíl dizertační práce</u>	<u>10</u>
<u>3 Teoretická část</u>	<u>11</u>
<u>3.1 Fyzikální principy MR zobrazování a MR spektroskopie</u>	<u>11</u>
<u>3.2 Mikroskopická anatomie nervosvalového komplexu</u>	<u>21</u>
<u>3.3 Myopatie a její klinické MR zobrazování</u>	<u>23</u>
<u>3.3.1 Myopatie – úvodní poznámky</u>	<u>23</u>
<u>3.3.2 Fyziologická MR anatomie svalů lýtky a bérce</u>	<u>23</u>
<u>3.3.3 Všeobecný popis patologických nálezů na MRI svalu</u>	<u>24</u>
<u>3.3.4 Typické MRI nálezy u různých typů myopatií</u>	<u>27</u>
<u>3.4 Analýza textury</u>	<u>30</u>
<u>3.4.1 Význam analýzy textury v radiologii</u>	<u>30</u>
<u>3.4.2 Analýza textury – teoretický úvod</u>	<u>31</u>
<u>3.4.3 Strukturální metody TA (morfologické, syntaktické)</u>	<u>32</u>
<u>3.4.4 Statistické metody TA</u>	<u>33</u>
<u>3.4.5 TA založená na modelování</u>	<u>37</u>
<u>3.4.6 TA založená na obrazové transformaci</u>	<u>38</u>
<u>3.4.7 Vliv akvizičních parametrů na obrazovou texturu a reprodukovatelnost výsledků TA</u>	<u>39</u>
<u>3.4.8 Metodický postup TA</u>	<u>40</u>
<u>3.5 Svalové lipidy a MR spektroskopie svalu</u>	<u>49</u>
<u>3.5.1 Fyziologie a biochemie lipidů</u>	<u>49</u>
<u>3.5.2 Insulinová rezistence</u>	<u>50</u>
<u>3.5.3 Vztah LCACoA a insulinové rezistence</u>	<u>51</u>
<u>3.5.4 1H MR spektroskopie svalu – přehled dosavadních výsledků</u>	<u>52</u>
<u>3.5.5 Popis 1H svalového spektra</u>	<u>54</u>
<u>3.5.6 Teorie bulk magnetic susceptibility – separace EMCL a IMCL ve spektru</u>	<u>60</u>
<u>3.5.7 Zpracování spekter – technika LCModel</u>	<u>62</u>
<u>4 Experimentální část</u>	<u>64</u>
<u>4.1 Klasifikace T1 obrazů lýtkových svalů technikami analýzy textury</u>	<u>64</u>
<u>4.1.1 Cíl studie</u>	<u>64</u>
<u>4.1.2 Metodika</u>	<u>64</u>
<u>4.1.3 Výsledky</u>	<u>67</u>
<u>4.1.4 Diskuze</u>	<u>74</u>
<u>4.1.5 Závěr</u>	<u>76</u>
<u>4.2 Kvantifikace intramyocelulárních lipidů z MR spekter měřených při 1,5 T a 3 T a vyhodnocených pomocí techniky LCModel</u>	<u>77</u>
<u>4.2.1 Úvod</u>	<u>77</u>
<u>4.2.2 Metodika</u>	<u>79</u>

4.2.3 Výsledky.....	85
4.2.4 Diskuze.....	92
4.2.5 Závěr.....	96
4.3 Měření hladiny intramyocelulárních lipidů u subjektů s poruchou glukosové tolerance léčených telmisartanem.....	98
4.3.1 Úvod.....	98
4.3.2 Metody.....	99
4.3.3 Výsledky a diskuze.....	100
4.3.4 Závěr.....	101
5 Souhrn dizertační práce, závěr.....	102
6 Matematická příloha.....	104
6.1 Příznaky kookurenční matice (Haralickovy příznaky).....	104
6.2 Příznaky run-length matice.....	105
7 Publikace autora dizertační práce.....	106
7.1 Publikace autora týkající se tématu dizertační práce.....	106
7.2 Ostatní publikace.....	106
8 Literatura.....	107

Použité zkratky

¹ H MR spektroskopie	protonová magneticko-rezonanční spektroskopie
ACC	průměrný korelační koeficient (<i>average correlation coefficient</i>)
AD	analogově-digitální
ANOVA	analýza rozptylu (<i>analysis of variance</i>)
AR	autoregresivní
ATP	adenosin trifosfát
BMI	<i>body mass index</i>
BMS	objemová magnetická susceptibilita (<i>bulk magnetic susceptibility</i>)
ConC	skupina zdravých dobrovolníků
ConH	skupina zdravých dobrovolníků, potomků hypertonických rodičů
DA	diskriminační analýza
DiaP	skupina diabetických pacientů
DifP1	zdravý sval dle radiologické klasifikace
DifP2	mírné, nepřímé nebo nespecifické známky svalového postižení dle radiologické klasifikace
DifP3	středně těžké myopatické změny svalu dle radiologické klasifikace
DifP4	těžké myopatické změny svalu dle radiologické klasifikace
EMCL	extramyocelulární lipidy
EMCL_CH ₂	CH ₂ skupina extramyocelulárních lipidů
EMCL_CH ₃	CH ₃ skupina extramyocelulárních lipidů
<i>Exp_fwhm</i>	očekávaná hodnota pološířky píku
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
FID	<i>free induction decay</i>
FOX	bazální oxidace tuků (<i>fat oxidation</i>)
HSL	hormon senzitivní lipáza
CHESS	<i>chemical shift selective suppression</i>
IMCL	intramyocelulární lipidy
IMCL_CH ₂	CH ₂ skupina intramyocelulárních lipidů
IMCL_CH ₃	CH ₃ skupina intramyocelulárních lipidů
IMTG	intramyocelulární triglyceridy (synonymum IMCL)

LCACoA	<i>long chain acyl coenzyme A</i>
M	spotřeba glukosy – parametr insulinové senzitivity
MCR	<i>metabolic clearance rate</i> – parametr insulinové senzitivity
MG	mediální hlava dvouhlavého svalu lýtkového (<i>caput mediale musculi gastrocnemii</i>)
<i>Min_fwhm</i>	minimální hodnota pološířky píku
MR	magnetická rezonance
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (<i>magnetic resonance imaging</i>)
MRS	magneticko-rezonanční spektroskopie
MS	šikmý sval lýtkový (<i>musculus soleus</i>)
MTA	přední sval holenní (<i>musculus tibialis anterior</i>)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární (jaderná) magnetická rezonance
PCA	analýza hlavních komponent (<i>principal component analysis</i>)
PGT	porucha glukosové tolerance
PKC	protein kináza C
POE	metoda minimalizace klasifikační chyby (<i>probability of error</i>)
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRESS	<i>point resolved spectroscopy</i>
PSAG	polystyren agar
ROI	oblast zájmu (<i>region of interest</i>)
SD	standardní odchylka (<i>standard deviation</i>)
<i>SD_fwhm</i>	směrodatná (standardní) odchylka hodnoty pološířky píku
SNR	poměr signál/šum (<i>signal to noise ratio</i>)
STEAM	<i>stimulated echo acquisition mode</i>
TA	analýza textury (<i>texture analysis</i>)
TDFDFIT	<i>time domain frequency domain fitting</i>
TE	echo čas
TR	repetiční čas
TSE	turbo spinové echo

1 Úvod

Kosterní svaly tvoří nezbytnou součást lidského těla, jsou integrální součástí muskuloskeletálního systému. Jeho základní funkcí je umožnit pohyb organismu a mechanickou oporu jeho součástí. Selhání těchto funkcí vede k výraznému zhoršení kvality života individua, přičemž úplná ztráta funkčnosti muskuloskeletálního systému není slučitelná se životem. Muskuloskeletální systém může být postižen řadou patologických stavů. Tyto stavy postihují buď primárně sval, nebo může být sval postižen sekundárně při nějakém typu neurologického onemocnění, ať již se jedná o onemocnění nervosvalové ploténky, periferních nervů či centrálního nervstva. V případě sekundárního postižení dochází k omezení nervosvalové stimulace a k následné atrofii svalu.

Kromě základní pohybové funkce tvoří svaly důležitý kompartment, který se podílí významným způsobem na metabolismu řady látek. Vzhledem k tomu, že kosterní sval je tkání s výraznými nároky na energetickou spotřebu, tvoří velmi významnou roli při metabolismu energetických sloučenin – lipidů a sacharidů. Nejnovější studie prokazují, že poruchy tohoto metabolismu na úrovni svalu, ač nevedou k patrné alteraci svalových funkcí, mají jiné závažné důsledky, protože vedou přímo či nepřímo k vývoji řady závažných onemocnění, jako je obezita, diabetes mellitus a ateroskleróza.

Magnetická rezonance (MR) je vyšetřovací technika, která našla v medicíně všestranné použití. MR zobrazování (*magnetic resonance imaging* - MRI) oproti ostatním dostupným zobrazovacím metodám poskytuje výborný kontrast měkkých tkání. Přináší tedy velmi cenné informace o morfologii svalové tkáně a bývá součástí vyšetřovacího protokolu při diagnostice svalových onemocnění. S rozvojem digitálních zobrazovacích technik jsou ve výzkumném stádiu i automatické metody zpracování obrazu, jako je např. analýza textury (*texture analysis* – TA). Tyto metody mohou poskytnout dodatečné informace o struktuře tkání a pomoci tak v diagnostice onemocnění a při jeho dlouhodobém sledování.

MR spektroskopie je další metodou založenou na principu magnetické rezonance, využívanou především v klinickém výzkumu. ³¹P MR spektroskopie umožňuje získat informace o metabolitech obsahujících fosfor (tedy především energetických metabolitech jako ATP a fosfokreatin), o hladinách anorganického fosfátu a intracelulárním pH. ¹H MR spektroskopie kosterního svalu umožňuje měřit signály pocházející z lipidů uvnitř svalových buněk (intramyocelulárních lipidů – IMCL), a tak monitorovat jejich metabolismus *in vivo*. Dosud provedené studie prokazují těsnou souvislost mezi

metabolismem IMCL a insulinovou senzitivitou, faktorem významně ovlivňujícím riziko vzniku diabetu mellitu 2. typu. Patobiochemické vztahy insulinové rezistence (senzitivity), diabetu mellitu a lipidového metabolismu nejsou v současnosti ještě zdaleka objasněny. ^1H MR spektroskopie svalu s měřením IMCL může významným způsobem přispět při studiu onemocnění souvisejících s metabolismem lipidů, jako je např. obezita a diabetes mellitus.

Tato práce se zabývá vývojem a klinickou aplikací technik analýzy textury a ^1H MR spektroskopie kosterního svalu u zdravých osob a pacientů se specifickým onemocněním.

2 Cíl dizertační práce

Cílem této dizertační práce bylo ověření možností studia metabolismu kosterního svalu pomocí MR zobrazování a MR spektroskopie. Zaměřili jsme se na studium následujících aspektů:

1. Navržení a praktické ověření techniky analýzy textury pro klasifikaci T1 vážených MR obrazů lýtky zdravých subjektů a subjektů s myopatickým onemocněním.
2. Porovnání výsledků klasifikace metodou analýzy textury s hodnocením stupně patologického postižení svalu, které provedl radiolog.
3. Zavedení techniky měření ^1H MR spekter kosterního svalu a techniky výpočtu koncentrací intramyocelulárních lipidů z těchto spekter.
4. Kvantifikace intramyocelulárních lipidů u kontrolních osob a pacientů s insulinovou rezistencí s cílem ověřit poznatky o vztahu metabolismu intramyocelulárních lipidů a insulinové rezistence.
5. Kvantifikace intramyocelulárních lipidů k ověření účinku podávání telmisartanu u osob s poruchou glukosové tolerance.

3 Teoretická část

3.1 Fyzikální principy MR zobrazování a MR spektroskopie

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je metoda, která využívá specifických magnetických vlastností atomových jader. Na jevu magnetické rezonance jsou založeny dvě základní měřicí techniky, které byly použity v této práci ke studiu kosterního svalu – technika MR zobrazování (MRI) a technika MR spektroskopie (MRS). V následujícím teoretickém úvodu jsou uvedeny pouze základní zjednodušené principy a termíny, které jsou nutné k porozumění dalšímu textu. K bližšímu seznámení s touto technikou odkazujeme na literaturu (^{1,2,3,4}) a internet (^{5,6}).

Každé atomové jádro obsahuje protony a neutrony, které souborně nazýváme nukleony. Stav nukleonů v jádře lze popsat mj. jaderným spinem \mathbf{J} . Tento jaderný spin je spojen s efektivním magnetickým momentem jádra $\boldsymbol{\mu}_J$ vztahem

$$\boldsymbol{\mu}_J = \gamma_J \cdot \mathbf{J} \quad [3.1]$$

kde γ_J je gyromagnetický poměr, což je konstanta charakteristická pro dané jádro.

Magnetický moment jádra popisuje magnetické vlastnosti jádra. Ze vztahu [3.1] vyplývá, že každé jádro s nenulovým jaderným spinem má i nenulový magnetický moment. Nejčastěji používaným jádrem pro MR zobrazování a MR spektroskopii je jádro vodíku. Vzhledem k tomu, že toto jádro obsahuje pouze jediný proton, jsou hodnoty \mathbf{J}_J a $\boldsymbol{\mu}_J$ rovny hodnotám \mathbf{J} a $\boldsymbol{\mu}$ jednoho protonu. U složitějších atomů je situace komplikovanější a je proto často nutné stanovit jaderný spin experimentálně. Obecně však platí, že jádra se sudým počtem protonů i sudým počtem neutronů (tzv. sudo-sudá jádra) mají v základním stavu nulový spin, tj. chovají se magneticky neutrálně a nejsou detekovatelné magnetickou rezonancí.

V analogii s klasickým popisem si lze představit, že jádro s nenulovým magnetickým momentem bude interagovat s magnetickým polem podobně jako kompas v magnetickém poli Země. Vlivem této interakce dojde k vytvoření nových energetických hladin, které podle kvantové teorie nenabývají libovolných hodnot, ale jsou obecně diskrétně rozděleny. Jev, při kterém dochází absorpcí energie elektromagnetického záření k přechodu mezi takto vzniklými energetickými stavy jádra v magnetickém poli, nazýváme jadernou magnetickou rezonancí (NMR).

Pokud se dále omezíme na atom vodíku, jehož spin je roven 1/2, lze ukázat, že může v magnetickém poli nabývat pouze dvou hodnot energie, mezi kterými je energetický rozdíl

$$\Delta E = |\gamma| \cdot \hbar \cdot B_0 \quad [3.2]$$

kde \hbar je Planckova konstanta. Pro úhlovou frekvenci vlnění absorbovaného záření ω_0 , které způsobí přechod mezi hladinami energie, pak platí vztah

$$\omega_0 = |\gamma| \cdot B_0 \quad [3.3]$$

kde γ je gyromagnetický poměr vodíku. Tato úhlová frekvence elektromagnetického záření, schopná způsobit přechod mezi energetickými hladinami jádra, se nazývá Larmorovou frekvencí (rezonanční frekvencí). Pro atom vodíku konstanta $\gamma = 42,5 \text{ MHz/T}$, tedy pro magnetické pole $B_0 = 1,5 \text{ T}$ je $\omega_0 = 63,62 \text{ MHz}$. Z toho je zřejmé, že frekvence elektromagnetického záření nutného k vyvolání magnetické rezonance spadá do pásma velmi krátkých rádiových vln. Na rozdíl od rentgenového vyšetření je při standardním MR vyšetření vyšetřovaný subjekt vystaven elektromagnetickému vlnění, které na něj nepůsobí nežádoucími škodlivými účinky.

V praxi se zajímáme především o makroskopické vzorky, tvořené souborem mnoha jader. Za tímto účelem je zaveden pojem vektoru magnetizace \mathbf{M}_0 , což je vektor magnetického momentu makroskopického vzorku, který vznikne součtem všech magnetických momentů jader vzorku. Na základě chování velikosti vektoru magnetizace po vložení vzorku do magnetického pole můžeme magnetické vlastnosti látek klasifikovat. Neuvažujeme-li feromagnetické látky, je bez přítomnosti vnějšího magnetického pole vektor magnetizace nulový – látka se navenek chová nemagneticky. Po vložení vzorku do magnetického pole se však látka „zmagnetizuje“ – vytvoří se v ní magnetizace \mathbf{M}_0 . Velikost tohoto vektoru a jeho směr závisí na fyzikálních vlastnostech látky – pro NMR jsou důležité látky diammagnetické (např. voda a běžné metabolity), paramagnetické (např. gadoliniové kontrastní látky), superparamagnetické (speciální kontrastní látky na bázi oxidů železa).

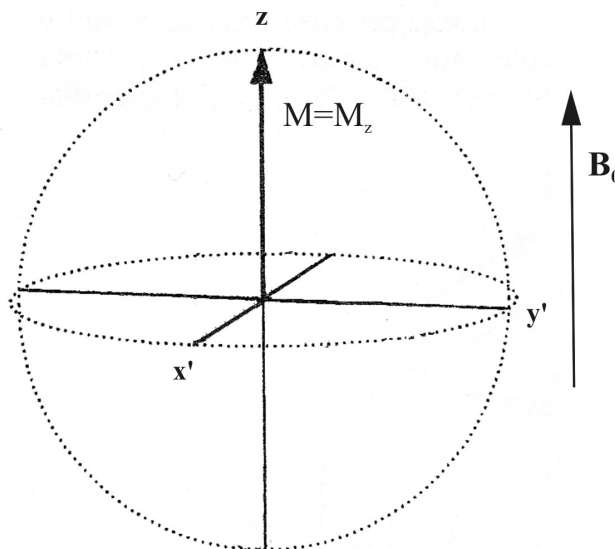
Matematicky se chování vektoru magnetizace v magnetickém poli popisuje pomocí tzv. Blochových rovnic. Blochovy rovnice představují diferenciální rovnice, které popisují časový vývoj velikosti jednotlivých složek vektoru magnetizace:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \quad [3.4]$$

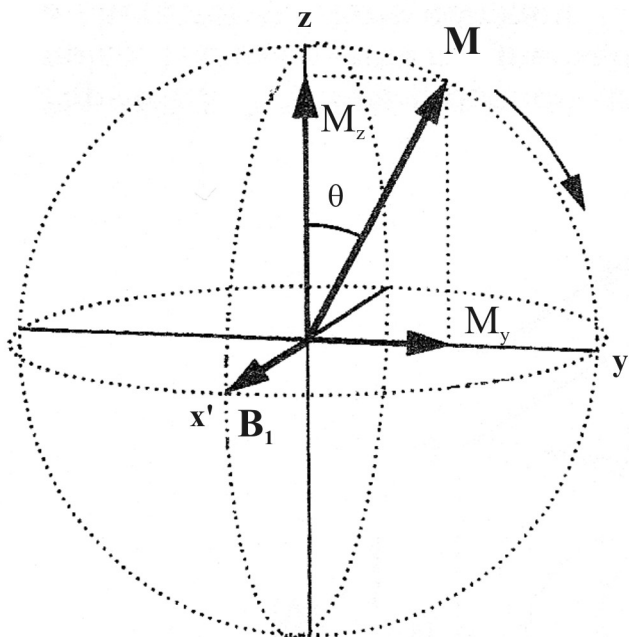
$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad [3.5]$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma (\mathbf{M} \times \mathbf{B})_z - \frac{M_z - M_0}{T_1} \quad [3.6]$$

M_0 je velikost vektoru magnetizace v rovnovážném stavu a T_1 , T_2 jsou tzv. relaxační časy, charakterizující změnu velikosti složek magnetizace M_x , M_z a M_y vlivem interakcí mezi spiny navzájem a mezi spiny a okolím. Tyto relaxační časy jsou dané fyzikálními vlastnostmi vzorku a jsou pro konkrétní typ tkáně charakteristické. Zavedeme nyní pravoúhlou soustavu souřadnic, kde osa z bude rovnoběžná se stacionárním magnetickým polem. Průmět vektoru magnetizace do osy z pak budeme nazývat podélná složka magnetizace M_z a průmět vektoru magnetizace do roviny x,y pak nazveme příčná složka magnetizace (obr. 3.1). Řešením Blochových rovnic lze získat následující chování vektoru magnetizace při NMR experimentu:



Obr. 3.1 Zavedení podélné (M_z) a příčné ($M_{x,y}$) složky magnetizace. Podélná složka magnetizace je v ustáleném stavu rovnoběžná s polem \mathbf{B}_0 , velikost příčné složky magnetizace je nulová. Upraveno podle (4).



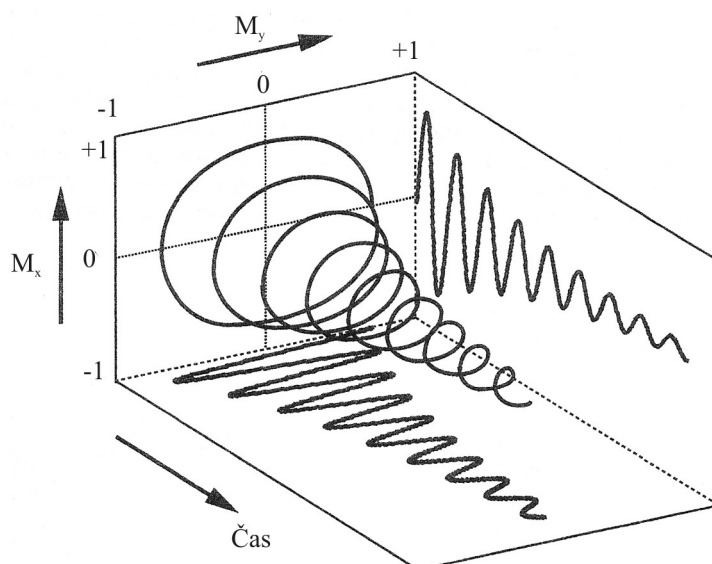
Obr. 3.2 Rotace vektoru magnetizace \mathbf{M} okolo radiofrekvenčního pole \mathbf{B}_1 . V soustavě souřadnic rotující okolo osy z s úhlovou frekvencí rovnou ω_0 se vektor \mathbf{B}_1 jeví jako stacionární. Rychlost sklápění \mathbf{M} závisí na velikosti B_1 opět dle rezonanční podmínky. Upraveno podle (4).

Po vložení jader vodíku do magnetického pole dojde k vytvoření vektoru \mathbf{M}_0 rovnovážné magnetizace. Aplikujeme-li na tento systém po určité době elektromagnetické pole o velikosti úhlové frekvence $\omega_0 = |\gamma| B_0$, jehož vektor \mathbf{B}_1 je kolmý na vektor \mathbf{B}_0 , dojde k otočení vektoru magnetizace \mathbf{M} okolo osy dané směrem vektoru \mathbf{B}_1 (dobře si tento jev můžeme zobrazit, pokud zavedeme rotující soustavu souřadnic o úhlové frekvenci odpovídající velikosti ω_0 , protože v této vztažené soustavě se vektor magnetizace bude jevit jako stacionární, obr. 3.2).

\mathbf{B}_1 pole se aplikuje pouze po omezený časový interval ve formě radiofrekvenčního (RF) pulsu. Úhel θ , o který se vlivem RF pulsu vektor magnetizace \mathbf{M} otočí okolo osy dané směrem vektoru \mathbf{B}_1 , se nazývá sklápěcí úhel. Nejčastěji užívanými RF pulsy jsou pulsy s hodnotami sklápěcího úhlu 90° a 180° . RF puls se sklápěcím úhlem 90° se používá k excitaci spinového systému – sklopením vektoru magnetizace do roviny \mathbf{x},\mathbf{y} zaniká podélná složka magnetizace a dochází k vytvoření maximální hodnoty příčné složky magnetizace. 180° puls se nejčastěji používá k eliminaci vlivu nehomogenit magnetického pole, jak je popsáno níže.

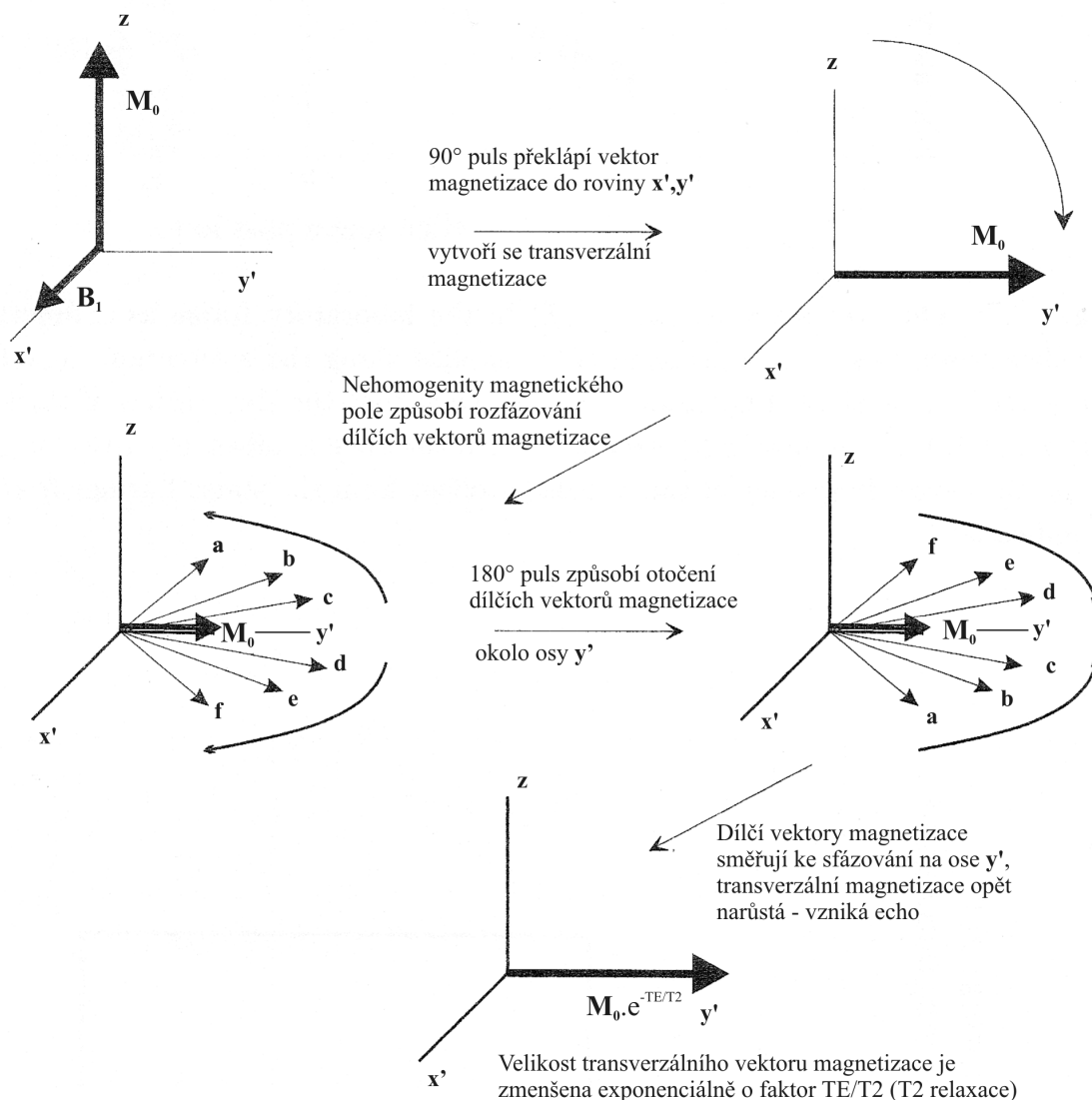
Bezprostředně po RF pulsu koná dle Blochových rovnic příčná složka magnetizace rotační pohyb v rovině \mathbf{x},\mathbf{y} o frekvenci rovné ω_0 . Současně dochází vlivem relaxace

k nárůstu velikosti podélné složky magnetizace (T1 relaxace popsaná konstantou T1) a k postupnému vymizení příčné složky magnetizace (T2 relaxace popsaná konstantou T2). Magnetizace se tedy vrací do původního rovnovážného stavu, kdy je velikost její podélné složky maximální a velikost její příčné složky nulová. Pohyb vektoru magnetizace indukuje v přijímací cívice signál, který se nazývá FID (*free induction decay*, obr. 3.3).



Obr. 3.3 Ilustrace časového vývoje signálu FID. Upraveno podle (4).

Sledem radiofrekvenčních pulsů lze vytvářet tzv. pulsni sekvence. Základním typem sekvence je sekvence spinového echa, která se skládá z posloupnosti 90° a 180° pulsu (obr. 3.4).



Obr. 3.4 Princip sekvence spinového echa. Upraveno podle (4).

Aplikujeme-li 90° puls a sledujeme-li velikost příčné složky magnetizace, vidíme, že dojde velmi rychle k jejímu zániku. Tento zánik, rychlejší než by odpovídalo parametru T_2 , je způsoben existencí nehomogenit magnetického pole \mathbf{B}_0 , způsobených jak nedokonalostí vnějšího magnetického pole, tak i tzv. susceptibilitními efekty ve vzorku. Rychlost poklesu amplitudy je pak popsána konstantou T_2^* . T_2^* konstanta má dvě komponenty, pro které platí vztah

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \quad [3.7]$$

kde T_2 je již známá konstanta popisující vlastní T_2 relaxaci a komponenta T_2' vyjadřuje příspěvek nehomogenit vnějšího magnetického pole \mathbf{B}_0 ve vzorku. Názorně si vliv T_2' na

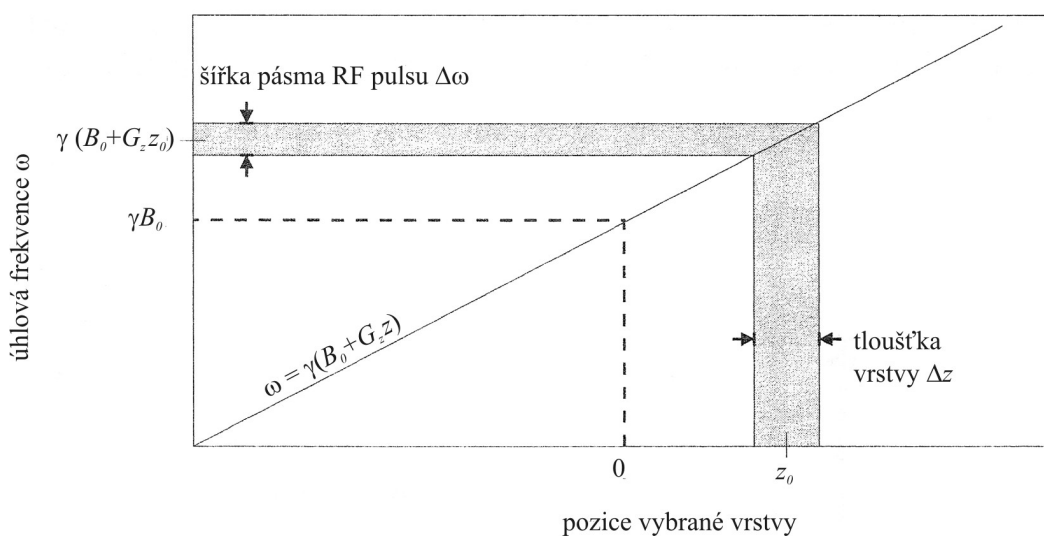
vektor magnetizace můžeme představit následujícím způsobem. Nehomogenita vnějšího magnetického pole \mathbf{B}_0 způsobuje variaci hodnoty Larmorovy frekvence ω_0 v prostoru. Díky tomu, že jednotlivé vektory magnetizace precedují s rozdílnou úhlovou frekvencí, dochází po krátkém čase k ztrátě jejich fázové koherence (rozfázování) a tím i k zániku příčné složky magnetizace (ta je dána vektorovým součtem dílčích vektorů magnetizace). Vzhledem k tomu, že variace ω_0 je v čase konstantní, lze ji kompenzovat aplikací tzv. refokusačního 180° pulsu, který způsobí otočení dílčích vektorů magnetizace o 180° kolem osy, která je v rovině \mathbf{x}, \mathbf{y} .

Názorně si můžeme efekt 180° pulsu představit jako závod dvou běžců na závodní dráze – v čase 0 jsou oba na startu, po určité době ten rychlejší předběhne toho pomalejšího; dáme-li v určitém čase povel obrátit se a běžet zpět ke startu (analogie 180° pulsu), startem proběhnou oba současně. 180° puls tedy po určitém čase (který je roven $TE/2$) způsobí návrat koherence příčné magnetizace. V čase $TE/2$ od 180° pulsu tedy detekujeme nárůst signálu do jeho lokálního maxima a pak jeho opětovný pokles. Tento detekovaný signál nazýváme spinovým echem. Velikost transverzální složky magnetizace v čase TE závisí pouze na relaxační konstantě T_2 . Fluktuační lokálního pole, která je způsobena vzájemným magnetickým ovlivňováním precedujících vektorů magnetizace, zodpovědná za T_2 relaxaci, je proces náhodný, časově proměnný a není tedy kompenzovatelný aplikací 180° pulsu.

Velikost transverzální složky magnetizace detekované při spinovém echu můžeme ovlivnit několika způsoby: a) volbou doby, která uplyne mezi jednotlivými excitačními pulsy (tzv. repetiční čas TR); b) sklápěcím úhlem excitačního pulsu; c) volbou délky časového intervalu mezi excitačním pulsem a vznikem echa (tzv. echo čas TE). Vhodnou kombinací parametrů TR , sklápěcího úhlu a TE můžeme získat obraz, jehož kontrast je ovlivněn T_1 , resp. T_2 relaxačním časem zobrazované tkáně. Získáváme tak T_1 , resp. T_2 vážený obraz. Lze zkonstruovat i takový obraz, ve kterém je vliv T_1 i T_2 minimalizován a kontrast odpovídá počtu protonů (neboli spinové denzitě). Takové vážení pak nazýváme proton-denzitní.

Prostorová lokalizace signálu je v NMR zajištěna pomocí aplikace dodatečných, prostorově závislých magnetických polí, tzv. gradientů magnetického pole. Tyto gradienty jsou generovány speciálními cívkami. Aplikací RF pulsu s omezenou šířkou pásma (tj. RF pulsu obsahujícího úzký rozsah úhlových frekvencí) spolu se zapnutým gradientem magnetického pole selektivně excitujeme pouze tu oblast, kde velikost lokálního B_0 odpovídá Larmorovým frekvencím obsažených v RF pulsu. Tímto způsobem excitujeme

vždy vrstvu, jejíž tloušťku můžeme ovlivnit buď velikostí gradientu nebo šířkou pásma (*bandwidth*) RF pulsu (obr. 3.5).



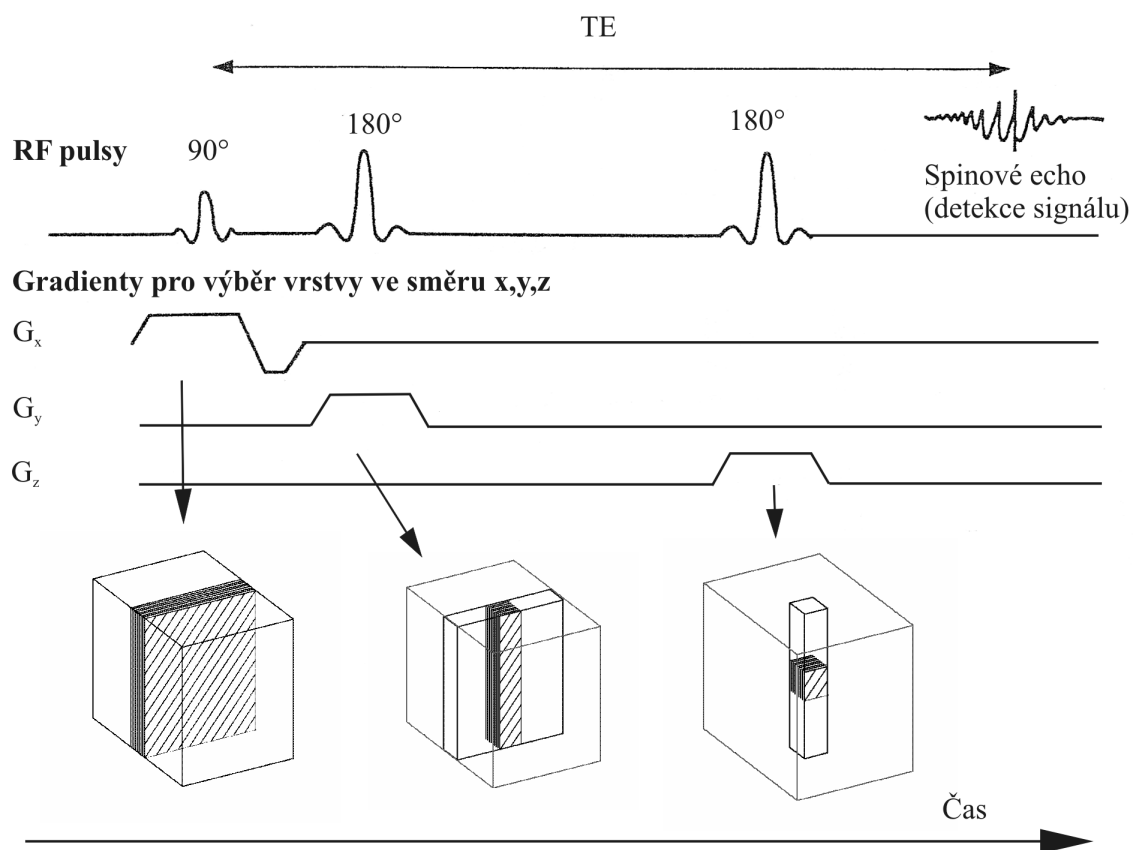
Obr. 3.5 Závislost tloušťky a pozice vybrané vrstvy na úhlové frekvenci a spektrální šířce excitačního RF pulsu. Upraveno podle (4).

V MRI se k prostorovému kódování signálu ve vybrané vrstvě používá dalších technik využívajících vlastnosti gradientu, rezonanční podmínky a vlastností Fourierovy transformace – tzv. frekvenční a fázové kódování.

Signál, který v MRI *in vivo* detekujeme, pochází v naprosté většině z protonů látky, která je v organismu nejrozšířenější - z vodíku v H_2O molekule. Oproti tomu MR spektroskopie je založena na detekci signálů z atomů nacházejících se v různých molekulách. Protože jádra nejsou osamocená, ale jsou součástí atomů a molekul, efektivní velikost lokálního magnetického pole B_0 v atomovém jádře je ovlivněna okolními nabitými částicemi – elektrony v atomových orbitalech a v chemických vazbách. Tento jev, kdy rezonanční frekvence jader dané molekuly (nebo funkční skupiny) je ovlivněna chemickou strukturou, nazýváme chemický posun. Resonanční frekvence je proto pro každou funkční skupinu charakteristická. Pro popis chemického posunu je zavedena tzv. konstanta chemického posunu δ vztahem

$$\delta_i = \frac{\omega_i - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \cdot 10^6 \quad [3.8]$$

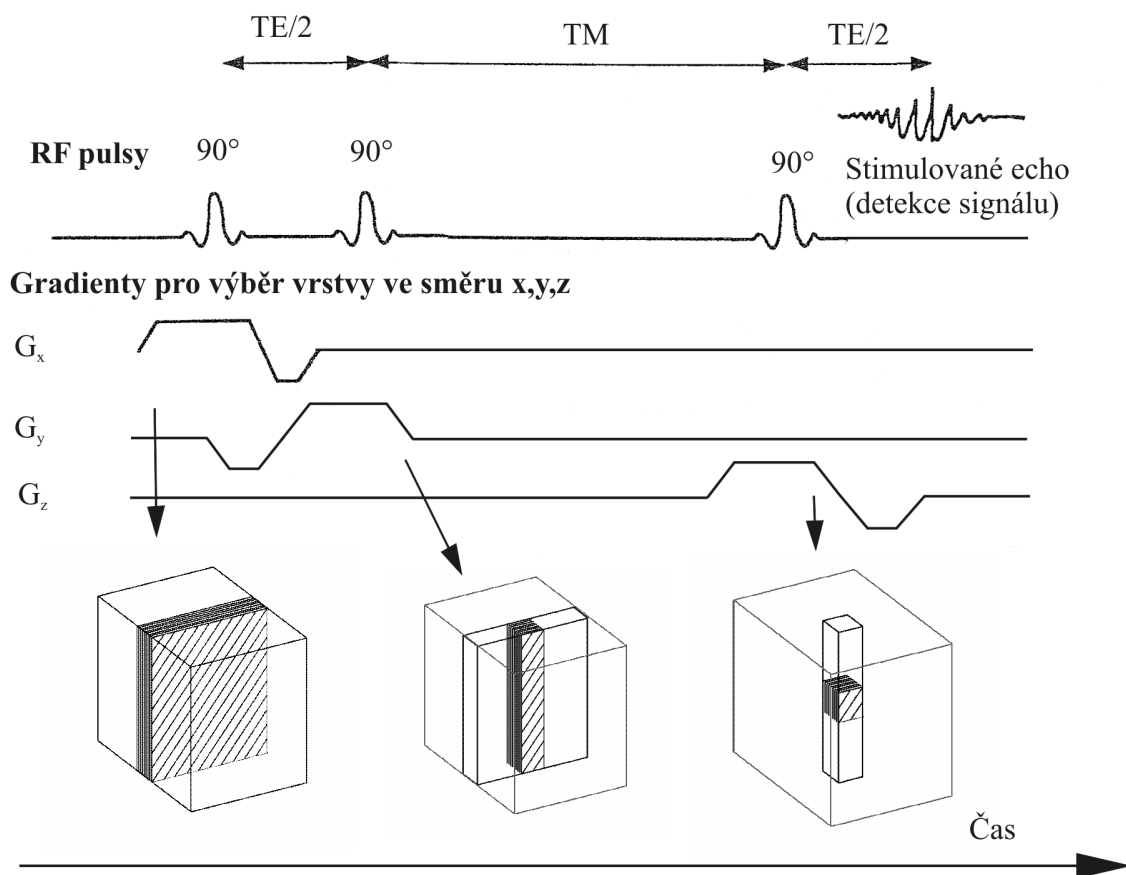
kde ω_i je rezonanční frekvence dané chemické skupiny a ω_{ref} je rezonanční frekvence standardu, což je sloučenina zvolená konvencí (v případě ^1H MR spektroskopie se jedná o tetrametylsilan). Chemický posun δ je vyjádřen v ppm (*part per milion*).



Obr. 3.6 Časové schéma sekvence PRESS. Voxel, ze kterého detekujeme signál, je vybrán jako průnik tří na sebe kolmých rovinných pásů. Upraveno podle (4).

V MR spektroskopii *in vivo* je často potřebné měřit signál pouze z vymezené oblasti měřeného subjektu (*volume of interest* - VOI). K tomuto účelu se v MR spektroskopii nejčastěji používají lokalizační techniky PRESS a STEAM. PRESS sekvence (*point resolved spectroscopy*) (7) je složena z posloupnosti jednoho 90° a dvou 180° pulsů, kdy signál detekujeme až jako druhé echo po druhém 180° pulsů. Základem je opět princip excitace rovinné vrstvy (viz obr. 3.5). Při aplikaci jednotlivých RF pulsů se však mění směr gradientu magnetického pole tak, aby výsledná oblast, kde byla splněna rezonanční podmínka u všech tří pulsů a odkud tedy pochází signál echa, byl rovnoběžnostěn (průnik 3 na sebe kolmých rovinných pásů), tzv. voxel. Způsob výběru voxelu v technice STEAM (*stimulated echo acquisition mode*) je založena na stejném principu, avšak tato sekvence se skládá z posloupnosti tří 90° pulsů a signál, který detekujeme, není spinové echo, ale tzv.

stimulované echo ⁽⁸⁾. Časové schéma posloupnosti RF pulsů, gradientů a náběru signálu v sekvencích PRESS a STEAM je uvedeno na obr. 3.6 a 3.7.

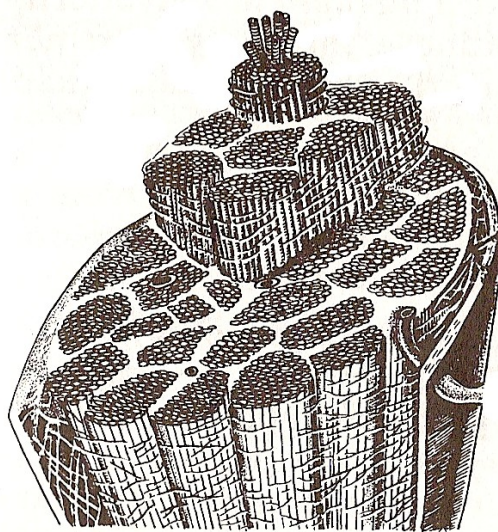


Obr. 3.7 Časové schéma sekvence STEAM. Upraveno podle (4).

Na rozdíl od MRI není signál ve spektroskopických sekvencích prostorově kódován pomocí frekvenčního kódování, ale je detekován bez přítomnosti gradientu magnetického pole. To umožňuje zachování informace o chemickém posunu jednotlivých sloučenin. Fourierovou transformací tohoto signálu získáme spektrum, které po zpracování a dalších korekcích umožňuje výpočet koncentrací jednotlivých metabolitů v měřené tkáni.

3.2 Mikroskopická anatomie nervosvalového komplexu

Základní stavební jednotkou kosterního svalu je svalové vlákno, což je mnohojaderné tenké vlákno vzniklé spojením mnoha buněk v tzv. *syncytium* (soubunní). Toto vlákno obsahuje důležité proteiny, jako aktin a myosin, které umožňují změnu podélného rozměru svalového vlákna. Svalová vlákna jsou uspořádána do svazečků a svazků, jednotlivé svazky (snopce) jsou odděleny septy, která jsou tvořena pojivovou tkání, nervy a adipocyty. Sval má vysoce pravidelně uspořádanou vláknitou strukturu (obr. 3.8).



Obr. 3.8 Mikroskopická anatomie kosterního svalu: obrázek ilustruje typickou vláknitou strukturu svalové tkáně. Mezi svalovými snopci se nachází tuková tkáň tvořená adipocyty (extramyocelulární lipidy - EMCL). Menší množství tuku se nachází v cytoplasmě svalových vláken (intramyocelulární lipidy - IMCL). Upraveno podle (9).

V kosterních svalech se nachází čtyři typy svalových vláken (10) – typ I (pomalá červená vlákna), typ IIa, IIb (rychlá vlákna) a typ III. Svaly většinou obsahují vlákna všech typů, ale zastoupení jednotlivých typů je v jednotlivých svalech různé. Svalová vlákna typu I (pomalá červená vlákna, *slow oxidative*) obsahují více myoglobinu, IMCL a mitochondrií, mají větší síť kapilár, pomaleji reagují na nervové podněty a jsou odolnější vůči únavě. Tato svalová vlákna jsou vybavena k pomalejší kontrakci a jsou přizpůsobena pro dlouhodobou vytrvalostní činnost. Vyskytují se především ve svalech, které se funkčně podílejí na udržení postoje těla (posturální svaly). Mezi tyto svaly patří např. *m. soleus* a hluboké zádové svaly. Vlákna typu IIa (rychlá červená vlákna, *fast oxidative and glycolytic*) jsou objemnější, mají více myofibril a méně mitochondrií. Jsou určena pro

rychlý pohyb prováděný velkou silou. Jsou odolná proti únavě. Též se nazývají fázická vlákna. Vlákna typu IIb (rychlá bílá vlákna, *fast glycolytic*) mají velký objem, málo kapilár, nízký obsah oxidativních enzymů, IMCL a myoglobinu a naopak vysokou koncentraci glykogenu, Ca a Mg iontů. Jsou určena k rychlému stahu maximální silou. Jsou málo odolná proti únavě. Mezi ně patří např. okohybné svaly a drobné svaly ruky. Vlákna typu III (přechodná, intermediární vlákna) jsou nediferencovaná vlákna, která zřejmě představují potenciální zdroj pro všechna předchozí vlákna. Při dlouhodobé změně typu zátěže dojde pravděpodobně k proliferaci a diferenciaci těchto vláken, která je zodpovědná za modifikaci zastoupení jednotlivých typů vláken ve svalu.

3.3 Myopatie a její klinické MR zobrazování

3.3.1 Myopatie – úvodní poznámky

Myopatie je obecný název pro onemocnění, kde jsou chorobným procesem postiženy svaly ⁽¹⁾. Svaly nejsou samostatnou entitou, ale jsou významně troficky i funkčně závislé na motoneuronech předního míšního rohu. Onemocnění motoneuronů může způsobit klinické syndromy, které lze odlišit od primárních onemocnění kosterního svalu pouze speciálními vyšetřovacími technikami. Tato skutečnost velmi těsného funkčního vztahu mezi motoneuronem a kosterním svalem vedla k tomu, že se o těchto dvou strukturách hovoří jako o motorické jednotce ⁽²⁾. Mezi nejčastější příznaky myopatií patří svalová slabost, ochablost svalového tonu, zmenšení nebo naopak zvětšení objemu svalu, bolest svalu, svalové křeče a svalové kontraktury.

Za standard v diagnostice myopatií je považována svalová biopsie. Toto invazivní vyšetření však má svá omezení a úskalí. U myopatií jsou jednotlivé svaly často zasaženy nestejnou měrou. Dokonce stupeň postižení kolísá i v rámci jednoho svalu. Proto má řada pacientů falešně negativní bioptický nález a k stanovení diagnózy je nutná opakovaná biopsie. Naopak falešně pozitivní biopsie mohou být způsobeny odběrem vzorku z oblasti svalu, do které byly opakovaně aplikovány intramuskulární injekce ⁽³⁾. Při odběru vzorku z m. gastrocnemius může superponovaná S1 radikulopatie (která je poměrně častým onemocněním starších jedinců) imitovat nález myopatie v bioptickém nálezu. Biopsie má své omezené použití v rutinním dlouhodobém sledování vývoje onemocnění též díky své invazivnosti.

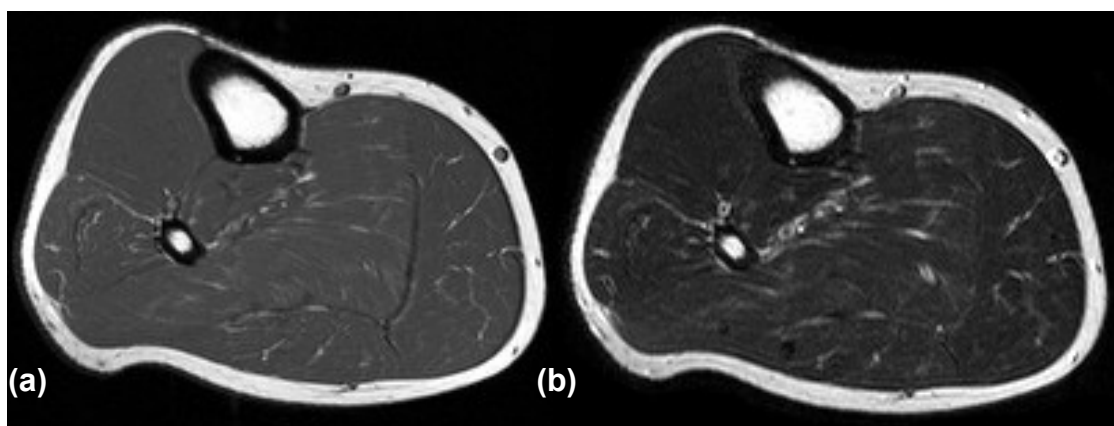
Technika MR zobrazování, ač dosud relativně málo využívaná při diagnostice myopatií, může přinést řadu cenných informací: Především pomůže posoudit morfologii svalu a rozhodnout, které svalové skupiny jsou nejvíce zasaženy. Těto informace lze pak využít k přesnému zacílení svalové biopsie k snížení falešně negativních výsledků biopsie a ke snížení počtu případů, kdy je nutno biopsii opakovat. Autoři ve studii ⁽¹³⁾ doporučují, aby bylo provedení MRI svalů zvaženo před každou svalovou biopsií. MRI svalů je též vhodným nástrojem při monitorování vývoje onemocnění nebo posouzení efektů léčby.

3.3.2 Fyziologická MR anatomie svalů lýtky a bérce

Základní technikou MR zobrazování muskuloskeletálního systému jsou T1 vážené obrazy. K tomuto typu zobrazení se používá technika spinového echa, s parametry TR/TE přibližně 500/12 ms (parametry užívané na našem pracovišti), s transverzální orientací

řezů, která spolehlivě ukazuje anatomii jednotlivých svalů a poskytuje výborný kontrast mezi svalovou a tukovou tkání. Při T1 vážení samotná svalová tkáň vykazuje u zdravého svalu poměrně konstantní, středně intenzní signál. Pojivová tkáň (šlachy, fascie) má oproti svalové tkáni výrazně nižší signál. Můžeme též pozorovat kostní tkáň tibie a fibuly, kompaktní kost díky převaze minerálních látek a malému obsahu vody nedává prakticky žádný signál. Lipidová tkáň v oblasti lýtky se nachází především v podkoží (ve zvýšené míře u žen oproti mužům), v oblasti kostní dřevě diafýzy kostí tibie a fibuly a fyziologicky v malém množství i v mezisvalových septech a dosahuje v T1 vážených obrazech vysoké intenzity .

Vyšetření doplňujeme T2 váženou sekvencí turbospinového echa, s typickými parametry TR/TE = 5400/99 ms. Tato sekvence umožňuje ve svalu posoudit množství vody a vody obsahujících složek. Omezení specificity T2 vážené sekvence je způsobeno faktem, že tuk na T2 vážených sekvencích turbospinového echa (TSE) má stejně jako voda vysoký signál. Tento nedostatek lze řešit různými technikami potlačení tukového signálu, např. STIR nebo fat-sat. Typické T1 a T2 vážené obrazy zdravého svalu jsou uvedeny na obr. 3.9.



Obr. 3.9 Typický MR obraz zdravého svalu. **(a)** T1 vážení; **(b)** T2 vážení.

Při posuzování MR snímků svalů jednak posuzujeme celkové množství svalové tkáně, dále proporcionalitu velikosti svalů – zjišťujeme, zda není určitá svalová skupina hypertrofická nebo hypotrofická oproti ostatním, hodnotíme množství a tloušťku svalových sept. Dále si všímáme signálu svalové tkáně na obou typech sekvencí a posuzujeme tloušťku podkožního tuku.

3.3.3 Všeobecný popis patologických nálezů na MRI svalu

Na MR zobrazování lze pozorovat několik základních typů patologických změn:

a) Iniciální stádium tukové degenerace

Prvními známkami tukové degenerace svalu bývá výskyt difúzně rozptýlených drobných okrsků lipidové tkáně. Velikost svalu a jeho tvar (kontura) zůstává zatím beze změn. V tomto stadiu není možné rozlišit atrofii způsobenou progresivní myopatií a neurogenní atrofii. V těchto stádiích je často pozorováno zesílení signálu na T2, značící *edema-like* změny.

b) Svalová atrofie s úbytkem objemu svalu

Jak svalová degenerace postupuje, dochází ke zvětšování objemu lipidových depozit a jejich splývání ve větší celky. V pozdějších stádiích sval dostává typickou „strakatou“ texturu, kdy jsou septa mezi svalovými snopci vyplněna tukovou tkání, ve které se nacházejí zbylé okrsky svalové tkáně. Tento obraz bývá patognomonický pro spinální muskulární atrofie. V tomto stadiu jsou tato onemocnění morfologicky odlišitelná od dystrofií, kde je proces svalové degradace v rámci jednoho svalu relativně homogenní (viz bod c). Podle stupně atrofie a množství tkáně, která svalovou tkáň nahrazuje, se objem svalu snižuje, mění se kontury svalu – stávají se nerovnějšími a svalové fascie přestávají být patrné.

c) „Vyplnění“ svalu tukem – *filling up* fenomén

V některých případech dochází k svalové degeneraci jiným způsobem. Po společném prvním stadiu drobných tukových depozit nedochází ke zmenšování objemu svalu, svalová kontura i fascie zůstávají intaktní, nicméně dochází k progresivní, difúzní náhradě svalové hmoty tukovou tkání. Svalová atrofie tedy v tomto případě spočívá v náhradě svalových buněk buňkami pojiva. Dochází sice ke snižování počtu aktivních svalových buněk, ale objem svalu zůstává nezměněn. Tento obraz bývá často přítomen u dystrofií, někdy zde pozorujeme dokonce tzv. pseudohypertrofii, kdy se objem svalu opticky zvětšuje.

d) *Edema-like* změny

Tyto změny lze sledovat u akutních fází zánětlivých svalových onemocnění jako je polymyositida. Vyznačují se zesílením signálu na T2 vážených obrazech a především na sekvenci STIR⁽¹⁴⁾. Zesílený signál svalu na T2 vážených sekvencích bývá často přítomen i u řady myopatií v jejich počátečním stadiu. Přesná příčina však zůstává nejasná (13) – někteří autoři považují tento nález edému svalů za známku zánětu. Nicméně k zesílení signálu dochází i v počátečních stádiích denervací, které nejsou provázeny zánětem.

Dokonce ani u zánětlivých myopatií edém v histologických obrazech nedominuje. Proto bývá tento nález v literatuře některými autory označován jako *edema-like*. Bývá též pozorován u prosté insuficience žilního systému dolních končetin.

e) Kompenzatorní hypertrofie

Tento obraz bývá typický pro časná stádia svalových dystrofií. Zde dochází k selektivní atrofii pouze jednoho svalu či svalové skupiny. Během progresu onemocnění však ostatní svaly zůstávají onemocněním dlouho nepostiženy. Díky zvýšené zátěži ostatních, zatím zdravých svalů dochází k jejich kompenzatorní hypertrofii. Morfologický obraz se pak skládá z „mozaikovitého“ vzoru více či méně hypertrofických svalů, mezi kterými se nacházejí atrofické svalové skupiny. Tento obraz může přetrvávat velmi dlouho a klinicky může být pacient v poměrně dobrém stavu bez patrné alterace svalových funkcí. V pozdějších stádiích však atrofie postihuje i zbylé svaly a klinický obraz se pak velmi rychle zhoršuje.

f) Pravá hypertrofie

Hypertrofie, která není pouhou kompenzatorní reakcí nepostižených svalů na ztrátu funkce okolních svalů zasažených primárním onemocněním, bývá pozorována u myotonií (např. bývá popisována u myotonia congenita). Dále se vyskytuje u endokrinních poruch jako je např. akromegalie nebo hypothyreóza.

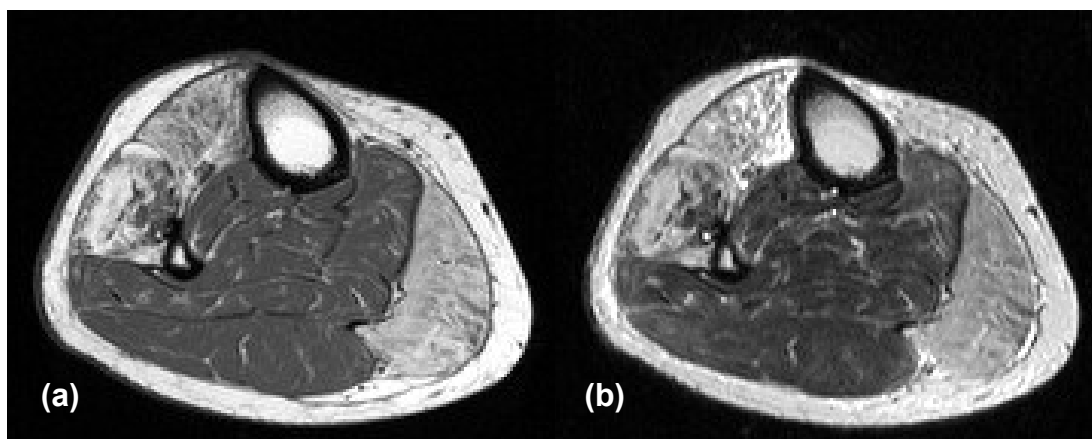
g) Pseudohypertrofie

Pojmem pseudohypertrofie se označuje stav, kdy opticky dochází k zvětšení objemu svalu, nicméně objem svalu narůstá pouze díky zmnožení tukové tkáně – objem svalové hmoty se nezvyšuje. Tento nález bývá častý u svalových dystrofií.

h) Konečné stádium svalové degenerace

Všechny typy progresivní svalové degenerace končí stavem, kdy zmizí téměř veškerá svalová hmota a funkce svalu jako hybného elementu je nenávratně ztracena. U atrofického typu svalové degenerace (spinální svalové atrofie) nacházíme na místech svalů jen tukovou tkáň (*panniculus adiposus*). Původní objem svalu může nebo nemusí být zmenšen. Můžeme též pozorovat variabilní množství zmnožené fibrózní tkáně, případně hyalinní mezibuněčné hmoty. Často vidíme v této arteficiálně zmnožené pojivové tkáni drobné okrsky zbytků svalových vláken, nyní již nefunkčních. V případě postižení více svalů již nelze původní svaly od sebe morfologicky odseparovat, neboť kontury fascií vymizí.

U dystrofického typu svalové degenerace nalézáme též tukovou tkáň na místě vymizelých svalů, ale původní kontura svalových fascií je zachována, takže lze jednotlivé svaly od sebe na obrazech morfologicky odseparovat. Cévy a nervy zůstávají v původních lokalizacích, objem svalů zůstává často nezměněn. T1 a T2 vážené MR obrazy zdravého svalu a svalu postiženého závažnou tukovou degenerací jsou uvedeny na obr. 3.9 a 3.10.



Obr. 3.10 MR obraz lýtka pacienta se závažnou tukovou degenerací. **(a)** T1 vážení; **(b)** T2 vážení.

3.3.4 Typické MRI nálezy u různých typů myopatií

Chronická onemocnění, jak myopatická, tak neurogenní, vedou v konečném důsledku k depozici tukové tkáně, která způsobuje zesílení signálu jak na T1, tak na T2 TSE obrazech. Na základě poznatků z velkého množství studií, které se zabývaly MRI u myopatií, lze v současnosti říci, že morfologické známky onemocnění jsou výrazně variabilní, překrývají se a tudíž nejsou patognomonické. Na druhou stranu však určité typické MRI nálezy pro jednotlivé skupiny onemocnění existují a mohou pomoci při jejich diagnostice.

3.3.4.1 Onemocnění gangliových buněk předního míšního rohu

Typickým představitelem těchto onemocnění je amyotrofická laterální sklerosa. Převládá obraz subakutní až chronické denervace: v případě subakutního vývoje onemocnění bývá pozorovatelné zesílení signálu na T2, které vymizí do cca 2 let od počátku onemocnění (13). Chronické změny se pak vyznačují svalovou atrofií s hyperintenzitami na T1 vážených obrazech, které jsou způsobeny zmnožením tukové tkáně.

3.3.4.2 Zánětlivé myopatie

Typickými představiteli jsou polymyositida nebo dermatomyositida. V MR obraze převládají *edema-like* změny na T2 vážených obrazech. Tyto změny mohou být fokální

(omezené pouze na určité části svalu) nebo difúzní. Díky nehomogennímu postižení svalů je u těchto onemocnění velký problém při bioptické diagnostice vzhledem k velkému riziku získání falešně negativního vzorku. Jednotlivé svaly lýtky mohou být postiženy rozdílnou měrou. U dermatomyositidy mohou být též patrné edematosní změny subkutánního tuku. U mnoha pacientů by bez MRI vůbec myositida nebyla rozpoznána, neboť jejich obtíže jsou dlouhou dobu nespecifické a jiné neinvazivní metody neukazují patologii. V chronickém stadiu pak převládá relativně symetrická a homogenní tuková degenerace, projevující se zesílením signálu na T1 i T2 TSE vážených obrazech. V tomto stadiu je hledání edematosních známek na T2 TSE obrazech obtížné vzhledem k podobné intenzitě signálu tuku a vody. V těchto situacích bývá velmi nápomocná STIR sekvence, která umožní spolehlivou detekci *edema-like* změn. V případě potřeby svalové biopsie je vhodné zacílit ji do oblasti, která vykazovala *edema-like* změny.

3.3.4.3 Onemocnění nervosvalové ploténky

Typickým představitelem těchto onemocnění je myasthenia gravis. MRI svalů je u těchto onemocnění většinou bez patologického nálezu. U některých pacientů však dochází i k paralelní manifestaci jiného autoimunního svalového onemocnění, které pak může v MRI dominovat. Někteří pacienti mají v MRI nálezu drobné T1 intenzity, které indikují slabou tukovou degeneraci svalů. Není jasné, jestli jsou tyto změny způsobeny přímo myasthenií nebo jsou známkami sekundární atrofie svalů díky fyzické inaktivitě pacienta, která je způsobena svalovými obtížemi.

3.3.4.4 Endokrinní a metabolické myopatie

Nejčastěji se vyskytují myopatie podmíněné hypothyreoidismem. U této myopatie se nejčastěji vyskytují známky hypertrofie a hyperintenzity na T2. Časté jsou postižení svalu u glykogenózy, kde se v pozdějších stádiích může objevit tuková degenerace některých svalů.

3.3.4.5 Svalové dystrofie

Do této skupiny patří dědičné choroby, které postihují primárně sval. Příčinou je vždy defekt rozličných proteinů svalové buňky. Patologie nebývá přítomná ihned po narození, příznaky svalové dysfunkce se objeví až po určité (různě dlouhé) době a onemocnění pomalu či rychleji progreduje. Nejznámější z těchto onemocnění jsou Duchennova a Beckerova svalová dystrofie. Dále sem patří např. dystrofie u syndromu MELAS nebo facioskapulohumerální svalová dystrofie. Nejčastějším nálezem u těchto

onemocnění je selektivní tuková degenerace určitých svalů, často je pozorován *filling up* fenomén a kompenzatorní hypertrofie zatím nepostížených svalů. Bylo prokázáno, že u řady dystrofií je přítomna i zánětlivá složka – o její přítomnosti svědčí jednak histologické nálezy makrofágů a CD8 pozitivních buněk, jednak nálezy *edema like* změn ve STIR obrazech. Tato skutečnost zdůvodňuje fakt, že kortikosteroidy mají u těchto onemocnění nezanedbatelný terapeutický efekt.

3.3.4.6 Kongenitální myopatie

Do této skupiny patří kongenitální onemocnění vyznačující se genetickým defektem různých typů proteinů, které jsou zapojeny v interakci mezi svalovou buňkou a extracelulární matrix (integriny, dystroglykany), proteinů bazální laminy (laminin alfa2) nebo proteinů extracelulární matrix (kolagen typu VI) ⁽¹⁵⁾. MR obraz bývá v počátečních stádiích normální (což je zejména způsobeno absencí zánětlivé složky). Později je pozorován *filling up* fenomén a obraz se pak podobá obrazu u dystrofií.

3.4 Analýza textury

3.4.1 Význam analýzy textury v radiologii

Úkolem radiologické interpretace obrazů získaných moderními zobrazovacími metodami je spolehlivá detekce a přesná charakterizace možných abnormalit v obraze. Radiologické posouzení bývá často důležitým krokem ke stanovení diagnózy a efektivní terapie. Úspěšné splnění tohoto úkolu závisí na provedení dvou kroků: a) správného rozpoznání obrazu, jeho anatomických souvislostí a texturních vlastností; b) klinické úvahy a dedukce k odhalení souvislostí mezi pozorovanými obrazovými rysy a možnými diagnózami. Úspěch obou kroků silně závisí na empirických znalostech radiologa, jeho paměti, deduktivních schopnostech, intuici a pečlivosti ⁽¹⁶⁾. Radiologický přístup vyhodnocení obrazů není prost omezení a chyb. Variabilita výsledků interpretace radiologických obrazů a výskyt chyb při diagnóze jsou skutečnostmi, které byly prokázány a zmapovány ⁽¹⁷⁾.

Rychlý rozvoj digitální technologie a výpočetní techniky umožnil vývoj technik zabývajících se automatickou analýzou obrazu. Tyto techniky mohou být použity spolu s automatickými klasifikačními systémy a tvoří jednu z oblastí aplikace technik CAD (*computer aided diagnosis*). Jednou z technik, kterou lze použít k automatickému zpracování obrazů a k citlivé detekci některých patologických rysů v obrazech, je analýza textury (*texture analysis* – TA).

Textura obrazu je tvořena především strukturami, které mají vůči svému okolí významný kontrast. V případě T1 vážených obrazů se především jedná o lipidovou tkáň, která je výrazně hypersignální vůči středně až nízké signální svalové tkáni. Vliv na kvalitu textury T1 obrazů svalu má tedy především uspořádání mezisvalových sept, jejich množství a množství adipocytů v nich. K výrazným změnám tohoto uspořádání a tedy i výrazným změnám v textuře svalové tkáně dochází především při tukové degeneraci. Textura T1 váženého MR obrazu je v tomto případě dána množstvím a prostorovým uspořádáním lipidů vně svalových buněk (extramyocelulární lipidy - EMCL). T2 vážené obrazy umožňují především posouzení množství vody a vody obsahujících látek ve svalové tkáni.

Techniky TA mohou sloužit jako klasifikační nástroj schopný rozlišit a klasifikovat typy a stupeň tukové degenerace, rozpoznat a klasifikovat stupeň edematózního prosáknutí tkáně a detekovat i jiné, někdy obtížně prostým okem pozorovatelné patologické změny svalové tkáně. Bylo prokázáno, že texturní informace související s vyšším řádem obrazové

statistiky není schopno lidské oko rozpoznat⁽¹⁸⁾. Další výhodou technik TA je, že nejsou zatížené subjektivní chybou osoby, která obraz hodnotí. Techniky TA mohou též pomoci v multicentrických studiích při standardizaci a kontrole kvality obrazů, získaných na různých přístrojích nebo pracovištích. TA může být pomocným nástrojem k posuzování vývoje onemocnění při opakovaných vyšetřeních. Praktické použití technik TA je však nutno ověřit v klinických studiích.

3.4.2 Analýza textury – teoretický úvod

Pojem textura je široký. Ve výkladových slovnících zejména anglosaské literatury bývá textura definována jako kvalita povrchu, kterou lze posoudit dotykem⁽¹⁹⁾, v české literatuře bývá definována jako vnitřní uspořádání, struktura, stavba⁽²⁰⁾. Textura obrazu jako užší pojem znamená kvalitu, charakterizující strukturu a vzájemné prostorové uspořádání jednotlivých úrovní jasu (případně barvy) obrazových bodů (pixelů). Textura obrazu bývá často definována víceúrovňově. Na základní úrovni bývá hledán v obraze větší či menší shluk obrazových bodů (*primitive*), který se v obraze opakuje. Na globální úrovni je pak studováno prostorové uspořádání těchto primitiv. Při pohledu na obraz toto pravidelné či méně pravidelné rozmístění jednotlivých primitiv tvoří důležitou součást vznikajícího obrazového vjemu, které texturu obrazu charakterizuje⁽²¹⁾. Texturu lze hodnotit jak u barevného, tak u černobílého obrazu. Analýza barevných obrazů však vyžaduje sofistikovanější a komplikovanější metody.

Textura obrazu je důležitým a bohatým zdrojem obrazové informace. Matematické a statistické metody hodnocení textury obrazu se souhrnně nazývají analýza textury (*texture analysis* – TA). Podrobný popis metod TA lze nalézt v přehledových článcích^(22, 23). Metody TA našly uplatnění v různých oborech, například v automatickém vyhodnocování mikroskopických snímků pískovcových hornin, leteckých a satelitních snímků⁽²⁴⁾. Rozvoj digitálních technologií v medicíně umožnil rozšíření této metody i na medicínské aplikace. Analýza textury byla použita při klasifikaci obrazů USG jater⁽²⁵⁾, štítné žlázy⁽²⁶⁾, prsu⁽²⁷⁾, prostaty⁽²⁸⁾, srdce⁽²⁹⁾, CT ledvin⁽³⁰⁾, RTG plic⁽³¹⁾, MRI mozku^(32, 33), jater⁽³⁴⁾, svalů^(35, 36) a v dalších aplikacích.

Dvojdímní digitální obraz se skládá z malých čtvercových, případně obdélníkových plošek, které jsou nazývány pixely (*pixel – picture element*). Každý pixel je charakterizován svou polohou v obraze a hodnotou obrazové intenzity, která odpovídá velikosti detekovaného signálu. V závislosti na tzv. rozsahu analogově digitálního (AD) převodníku, který je součástí zobrazovacího zařízení, je pak informace o intenzitě signálu

v daném pixelu uložena do proměnné určitého rozsahu bitů. V MRI je např. nejčastěji užíván převodník kódující intenzitu signálu do 12 bitů – pixel tedy může nabývat maximální intenzity $2^{12}-1$, rozsah intenzit obrazu je tedy 0-4095⁽³⁷⁾.

Intenzita je nejčastěji mapována do úrovní šedi – výsledný obraz je pak černobílý. Na obrazový záznam se lze též dívat jako na matici, která představuje distribuci signálových intenzit jednotlivých pixelů v rovině řezu. Metody TA jsou založeny na matematické analýze této matice nebo její vybrané části - oblasti zájmu (*region of interest* – ROI). Výstupem analýzy textury jsou obvykle tzv. texturní příznaky⁽³⁸⁾. Zpravidla jsou metody TA děleny podle typu analytického přístupu do 4 typů⁽³⁹⁾, které budou charakterizovány v kapitolách 3.4.4 až 3.4.7.

3.4.3 Strukturální metody TA (morfologické, syntaktické)

Tyto metody popisují obraz způsobem, který byl uveden jako definice textury v kapitole 3.4.3, tedy jako souhrn primitiv. Struktura primitiv tvoří tzv. mikrotexturu⁽⁴⁰⁾. Prostorové uspořádání primitiv do větších celků tvoří tzv. makrotexturu. Popis textury se tedy odehrává ve dvou úrovních: v úrovni tzv. mikrotextury je úkolem nalézt a popsat texturní jednotku, v druhém kroku tzv. makrotextury je pak studováno prostorové uspořádání těchto texturních jednotek v obraze. Prvním krokem je tedy morfologická definice, druhým krokem je popis prostorového rozmístění a uspořádání nalezených obrazových entit. K popisu prostorového uspořádání bývají užívány prostředky matematické morfologie a umělé inteligence (např. jazyk PROLOG).

Výhoda strukturálního přístupu spočívá v tom, že může teoreticky poskytnout dobré fyzikálně morfologické vysvětlení jednotlivých texturních jednotek – poskytuje možnost texturním jednotkám přiřadit konkrétní morfologické struktury (např. mezisvalová septa, jaterní lalůček atd.). Jedním z klíčových problémů je nalezení a popis texturní jednotky, neboť neexistuje jasná hranice mezi mikrotexturou a makrotexturou. Mikrotexturou může být malá skupina několika pixelů, ale též i poměrně velká obrazová oblast. Obrazy ze zobrazovacích metod vykazují vysokou míru neuspořádanosti, která komplikuje modelování, navíc neexistuje jednoduché spojení biochemických změn a makroskopické textury.

Strukturální metody TA by teoreticky mohly přinést velmi cenné informace o struktuře a patologické morfologii tkání, nicméně z výše uvedených důvodů byly vyzkoušeny v medicíně zatím pouze k popisu histologických obrazů, kde je definice mikrotextury (reprezentované jednou buňkou) výrazně jednodušší^(41,42). Metody, které

explicitně morfologicky definují texturní jednotku a pak popisují prostorové uspořádání statisticky, jsou některými autory kategorizovány jako strukturálně-statistické (40).

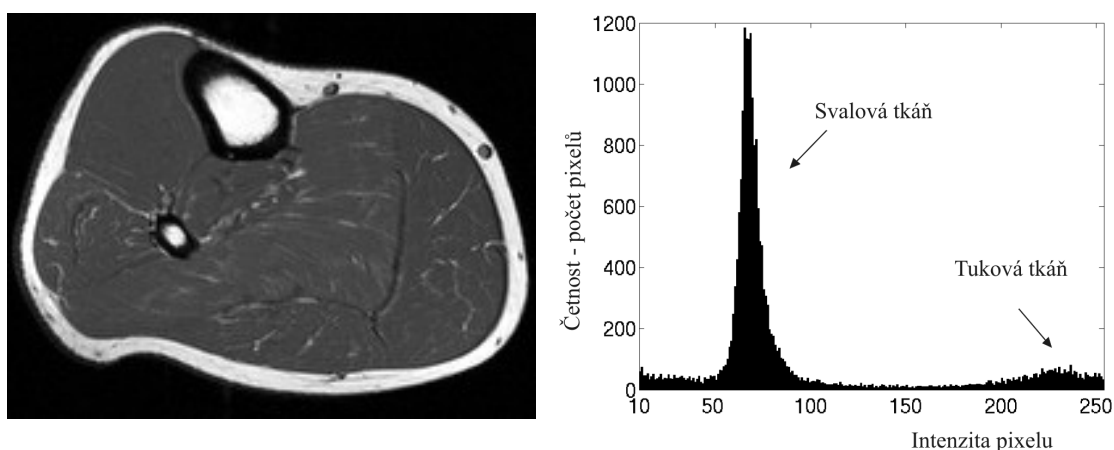
3.4.4 Statistické metody TA

Tyto metody nepopisují texturu víceúrovňově, hierarchicky, ale jsou založeny na studiu pravděpodobnosti výskytu jednotlivých intenzit v obraze. Způsob náběru MR obrazů v *in vivo* podmínkách není deterministickým procesem, zahrnuje do jisté míry nepredikovatelnou nejistotu, která je podmíněna řadou náhodných vlivů, jako je nepatrný pohyb vyšetřovaného subjektu během měření, tok krve kapilárami tkáně, difúze látek, šum elektroniky a další. Na intenzitu jednotlivých pixelů se můžeme dívat jako na náhodnou veličinu, kterou lze popsat statistickými technikami. Podrobné pojednání o této problematice lze nalézt např. v publikaci (43).

Rozlišujeme několik podtypů těchto metod, které budou popsány dále.

3.4.4.1 Metody statistiky prvního řádu

Tyto metody jsou založeny na studiu pravděpodobnosti výskytu jednotlivých intenzit obrazové škály. Takovou informaci poskytuje např. obrazový histogram stupňů šedi, který je grafem četnosti jednotlivých obrazových intenzit (obr. 3.11).



Obr. 3.11 Příklad MR obrazu lýtkového svalu a jeho histogramu. Oblast nulových intenzit (tmavé pixely mimo lýtko) není zobrazena. Oblasti intenzit v histogramu, které odpovídají svalové a tukové tkáni, jsou v obrázku vyznačeny.

Texturní příznaky tohoto typu určitým způsobem popisují vlastnosti vypočteného histogramu. Konkrétně se např. jedná o výpočet střední hodnoty intenzity (*mean*), rozptylu (*variance*), šikmosti (*skewness*) a špičatosti (*kurtosis*). Absence popisu prostorového

rozložení však znamená, že tyto texturní příznaky necharakterizují obrazovou texturu dostatečně.

3.4.4.2 Metody statistiky druhého řádu

Tyto metody popisují vzájemnou prostorovou závislost mezi pixely. Tyto příznaky tedy, na rozdíl od parametrů prvního řádu, nesou prostorovou informaci. Texturní příznaky statistiky druhého řádu bývají nejčastěji odvozeny od tzv. dvojdimenzionálního histogramu, což je např. kookurenční matice (*co-occurrence matrix*), nebo od gradientní matice (*gradient matrix*).

Při sestavování kookurenční matice (23,38,⁴⁴) se v rámci celého ROI vypočte, kolikrát spolu sousedí dva pixely o intenzitách daných indexem prvku v kookurenční matici (resp. jaká je pravděpodobnost tohoto výskytu). Okolí prvku je definováno tzv. separačním vektorem (p,q) . Vybereme-li pixel o souřadnicích $[a,b]$, druhý pixel pro výpočet kookurence má souřadnice $[a+p,b+q]$. Druhou možností je definovat dvojici pixelů jejich vzdáleností d a směrem (úhlem) θ , neboli vyjádřit separační vektor v polárních souřadnicích. Na obr. 3.12 pro ilustraci uvádíme jednoduchý obrázek a jemu odpovídající matici intenzit pixelů

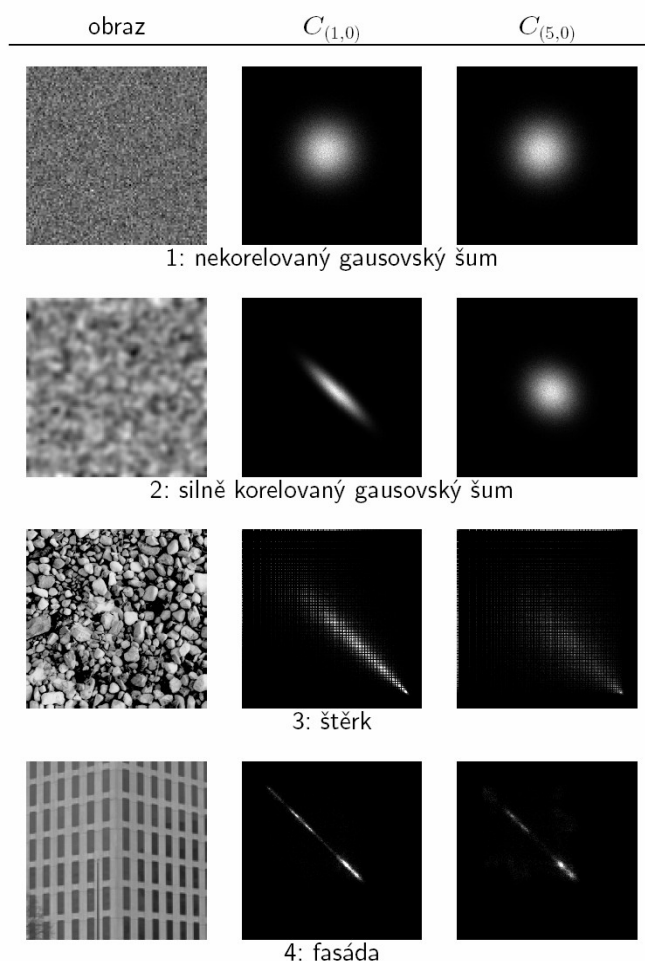


Obr. 3.12 (a) obrázek ilustrující výpočet kookurenční matice; (b) matice intenzit pixelů odpovídající obrázku.

Kookurenční matice tohoto obrázku pro separační vektor $(0,1)$ má tvar

$$C_{(0,1)}(I) = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 2 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 2 & 1 \end{pmatrix} \quad [3.8]$$

Z tvaru kookurenční matice tohoto obrázku vyplývá, že pokud vezmeme pixel o intenzitě 0, pak nalezneme 1x situaci, kdy se ve svislém směru nad ním v obrázku vyskytuje pixel o intenzitě 0; 2x se vyskytuje pixel o intenzitě 1; ani jednou se nevyskytuje pixel o intenzitě 2 nebo 3 (prvky prvního sloupce kookurenční matice). To samé pak provedeme pro pixel o intenzitě 1, 2 a 3 (prvky druhého, třetího a čtvrtého sloupce kookurenční matice). Příklad obrazové matice a z ní získané kookurenční matice pro separační vektor (1,0) a (5,0) na jednoduchých texturách je demonstrován na obr. 3.13.



Obr. 3.13 Příklady jednoduchých textur a jejich kookurenční matice pro dva separační vektory (1,0) a (5,0). Upraveno podle (44).

Z takto získaných matic lze vypočítat řadu texturních příznaků. Příkladem může být entropie, která je mírou neuspořádanosti (náhodnosti) distribuce obrazových intenzit v rámci studovaných dvojic pixelů. Podrobnější výklad viz příloha.

Gradientní matice (23) je jinou maticí, která charakterizuje distribuci rozdílů obrazových intenzit v okolí pixelu. Okolí studovaného pixelu je dáno tzv. maskou okolních

pixelů, jejíž velikost bývá obvykle 3x3 nebo 5x5 pixelů. Máme-li obrazovou matici $g(x,y)$, pak gradient pro pixel o souřadnicích (x,y) (pro masku 3x3) je vypočten pomocí vzorce

$$gr_3(x,y) = \sqrt{[g(x+1,y) - g(x-1,y)]^2 + [g(x,y+1) - g(x,y-1)]^2} \quad [3.9]$$

Větší rozdíl v intenzitách v okolí pixelu tedy vede k vyšší hodnotě gradientu pro daný index gradientní matice. Tato metoda bývá některými autory (22) zařazována do statistických metod prvního řádu.

3.4.4.3 Metody statistiky vyšších řádů

Tyto techniky popisují závislosti mezi třemi a více pixely v ROI. Představitelem těchto metod je například tzv. *run-length* matice (37,⁴⁵). Kalkulace této matice spočívá v tom, že se zjišťuje, kolikrát najdeme v obrazu řetězec kolineárních pixelů (*pixel run*), které mají stejnou obrazovou intenzitu. Matice je zavedena tak, že každý její element $p(i,j)$ reprezentuje počet řetězců, které mají intenzitu pixelu rovnou i a délku řetězce rovnou j (příp. menší nebo rovnou, zde záleží na konkrétní implementaci). Matice se počítá pro určitý konkrétní směr (ve 2D výpočtech je to směr horizontální, vertikální, šikmý 45° a 135°). Příklad výpočtu *run-length* matice obrazu je uveden na obr. 3.14.



Obr. 3.14 (a) obrázek ilustrující výpočet *run-length* matice; (b) matice intenzit pixelů odpovídající obrázku.

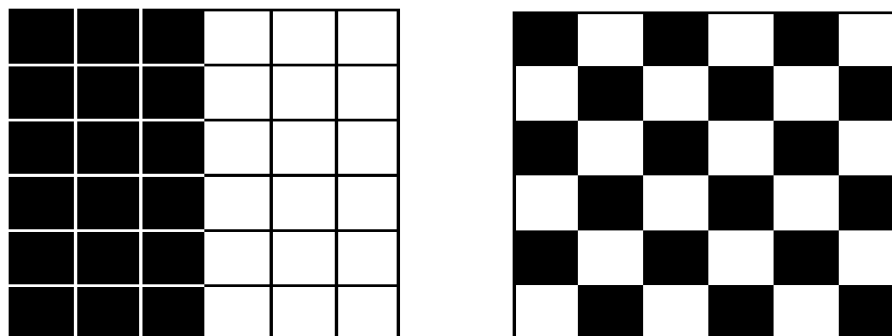
Run-length matice tohoto obrázku pro směr 0° (horizontální) má následující tvar:

	1	2	3	4
0	4	0	0	0
1	1	0	1	0
2	3	0	0	0
3	3	1	0	0

Řádky v matici představují obrazovou intenzitu a sloupce představují délku řetězce. Z této matice lze vypočítat podobné příznaky jako z kookurenční matice. Pro tuto matici existují další specifické texturní příznaky. Příkladem může být příznak *fraction of image in runs*

vyjadřující procentuální podíl pixelů, které jsou součástí nějakého řetězce stejných intenzit. Dalším důležitým příznakem je *short run emphasis*, který vyjadřuje podíl výskytu krátkých řetězců vůči celkovému počtu řetězců. Tento příznak charakterizuje „jemnost“ textury.

Rozdíl mezi výše uvedenými postupy statistické texturní analýzy lze demonstrovat na jednoduchém schematickém obr. 3.15. Zobrazené obrázky mají identické texturní příznaky prvního řádu, ale liší se v texturních příznacích druhého řádu.



Obr. 3.15 Dva schematické obrázky o velikosti 6x6 pixelů. Tyto obrázky mají shodné texturní příznaky 1. řádu (histogram), ale rozdílné texturní příznaky druhého řádu.

Bylo prokázáno, že statistické texturní příznaky druhého řádu velmi dobře charakterizují obrazovou texturu a mají největší diskriminační sílu (tj. schopnost odseparovat od sebe různé typy textury) (^{46, 47}). Statistické metody TA jsou nejčastěji používanými metodami TA v medicíně.

3.4.5 TA založená na modelování

K interpretaci obrazové textury je použito modelů různých typů. Popis obrazové textury je dosažen určením parametrů modelu. Model může být použit nejen k popisu textury, ale je vhodný i k modelové syntéze textury. V praxi je díky matematické složitosti a komplexnosti problému největším úskalím určení adekvátních parametrů modelu. Uvedeme dva nejdůležitější typy používaných modelů v TA:

a) Fraktálový model (⁴⁸)

Princip metody spočívá v určení fraktální dimenze obrazu. Bylo zjištěno, že tento parametr vykazuje silnou korelaci se subjektivním posouzením „hrubosti“ textury. Metod určení fraktální dimenze obrazu je řada, používá se například tzv. Hausdorffova nebo mřížková (*box-counting*) dimenze. Nevýhoda tohoto typu modelu je, že nebere v potaz směrovost textury a není citlivý na lokální variace v obrazové textuře. Hodí se tedy spíše

na prostorově homogenní obrazy. V medicíně byla tato metoda použita např. ke studiu kostní struktury (⁴⁹).

b) Autoregresivní (AR) model

Tento model předpokládá lokální vztah mezi sousedními pixely v obrazu. Jeho principem je modelování intenzity pixelu jako vážené sumy intenzit okolních pixelů. Necht' je obraz náhodným polem \mathbf{f} , pak AR kauzální model můžeme definovat jako

$$f_s = \sum_{r \in N_s} \theta_r f_r + e_s, \quad [3.10]$$

kde f_s je intenzita obrazu na místě s , e_s je nekorelovaný šum, N_s je okolí pixelu o indexu s a $\boldsymbol{\theta}$ je vektor parametrů modelu. Z ostatních modelových technik lze zmínit např. model Gibbsova nebo Markovova náhodného pole (*random Markov field*). Tyto techniky byly použity k segmentaci obrazů (^{50, 51, 52}).

3.4.6 TA založená na obrazové transformaci

Tyto metody využívají některé typy transformace obrazu k popisu obrazové textury, např. Fourierovu, Gaborovu nebo vlnkovou transformaci (*wavelet transform*). Cílem této operace je převést původní obraz, který je funkcí intenzity pixelu v závislosti na jeho umístění v prostoru, do funkce jiných proměnných, které popisují nebo jinak zvýrazní vlastnosti textury původního obrazu. V případě Fourierovy transformace je jedná o funkci frekvencí, tedy spektrum. Fourierovy transformace radiologických snímků a následné analýzy hlavních komponent (*principal component analysis* - PCA) bylo užito v detekci kostní fraktury (⁵³). Problém této metodiky je její necitlivost na směrovost textury, což může v některých aplikacích způsobit ztrátu důležité informace. Tento problém je však řešitelný vhodnou modifikací techniky (⁵⁴).

Všechny výše popsané metody využívají k výpočtu texturních příznaků rovinný obraz, tedy 2D matici. Některé výše uvedené techniky TA lze modifikovat k použití na 3D datech. Např. Mahmoud-Ghoneim *et al.* vyvinuli algoritmus výpočtu 3D kookurenční matice a ověřili tuto techniku na texturní analýze mozkových tumorů (⁵⁵). Tyto techniky se nejčastěji nazývají volumetrická analýza textury. V budoucnu lze očekávat další vývoj těchto technik.

3.4.7 Vliv akvizičních parametrů na obrazovou texturu a reprodukovatelnost výsledků TA

Signál a kontrast MR obrazu je určen především následujícími fyzikálními parametry tkáně: T1, T2 relaxační čas, protonová denzita, magnetická susceptibilita (nehomogenita statického magnetického pole), případně průtok v cévách, difúze a další. Váha, jakou jednotlivé faktory do obrazového kontrastu přispívají, je určena volbou typu pulsní sekvence a nastavení jejích parametrů. Existuje mnoho typů pulsních sekvencí a mnoho možností, jak nastavit jejich parametry tak, abychom dosáhli optimálního poměru signál/šum a požadovaného typu kontrastu. Všechny tyto parametry výrazným způsobem ovlivňují texturní rysy obrazu. Dále je textura obrazu ovlivněna způsobem náběru dat během měření, velikostí magnetické indukce B_0 a její homogenitou. V neposlední řadě závisí na vlastnostech hardwaru přístroje – parametrech fázového detektoru a AD převodníku, excitačním a detekčním profilu cívky, na přítomnosti vířivých proudů (*eddy currents*) atd. Tento fakt velmi komplikuje interpretaci a reprodukovatelnost výsledků texturní analýzy. Výsledky multicentrické studie s texturní analýzou polystyren-agar (PSAG) fantomů⁽⁵⁶⁾ potvrdily, že se texturní parametry při měření na rozdílných MR přístrojích významně liší. Snížení této variability lze dosáhnout volbou co nejpodobnějších parametrů měření, tj. užitím stejného typu měřicí sekvence, počtu akvizic a rozlišení. Autoři Schad *et al.* studovali závislost variability diskriminační síly texturních příznaků (tj. schopnosti odlišit různé typy textury) na poměru signál/šum (*signal to noise ratio* - SNR) a rozlišení – velikosti pixelu (43). Studie potvrdila zvyšování diskriminační síly při zvyšujícím se SNR. Dále bylo zjištěno, že diskriminační síla texturních příznaků vypočtených při zlepšujícím se SNR (a při neměnném rozlišení 1x1x2 mm, obvykle používaném při klinicky užívaných sekvencích) se zvyšuje různou měrou pro různé typy tkání: pro šedou hmotu vykazuje strmější průběh než pro bílou hmotu. Tuto vlastnost autoři vysvětlují tak, že v případě šedé hmoty se při zvyšování SNR zlepšuje charakterizace tkáně její obrazovou texturou. Oproti tomu průběh stabilizace příznaků u bílé hmoty pravděpodobně spíše reflektuje vlastnosti obrazového šumu než skutečnou texturu tkáně. Znamená to, že obvykle používané rozlišení je v případě bílé hmoty příliš hrubé k tomu, aby bylo schopno popsat její strukturu. Texturní parametry tedy vykazují závislost na SNR, nicméně tato závislost je individuální pro každý typ tkáně a použité rozlišení obrazu. Výše uvedený experiment umožňuje pro konkrétní tkáň ověřit, do jaké míry vypočtené texturní příznaky reflektují skutečnou strukturu tkáně.

3.4.8 Metodický postup TA

Nejprve zavedeme pojem texturní třída. Pod tímto pojmem budeme rozumět typ textury, který přísluší určité homogenní skupině objektů (ať už je touto skupinou skupina pacientů s podobným stupněm svalového postižení nebo skupina MR obrázků z jednoho typu texturního fantomu). Cílem TA je rozdělit skupinu objektů do texturních tříd (tedy klasifikovat je do tříd) nebo předem očekávaným a definovaným texturním třídám přiřadit jednotlivé objekty. V prvním případě je počet a typ tříd předem neznámý, v druhém (jednodušším) případě jsou třídy předem známe.

Postup TA lze rozdělit do několika základních kroků, popsanych v následujících subkapitolách.

3.4.8.1 Vlastní výpočet texturních příznaků (*feature extraction*)

Tento krok spočívá ve vlastním výpočtu texturních příznaků z obrazu. Tyto parametry jsou vypočteny na základě výše uvedených metodik z hodnot intenzity pixelů obrazové matice nebo její části. Tato užší oblast zájmu (*region of interest – ROI*) může být určena manuálně operátorem, který zvolí např. anatomickou strukturu, o jejíž analýzu má zájem. Na texturní příznaky je třeba pohlížet jako na statistický popis náhodné veličiny, kterou je intenzita pixelů v ROI. Proto je nutné počítat texturní příznaky z dostatečného počtu pixelů v ROI, aby vypočtený texturní příznak skutečně reprezentativně charakterizoval analyzovanou texturu. Autoři uvádějí přibližně 300 pixelů v ROI jako minimální mez, nicméně tato hodnota závisí na typu texturního příznaku. Na druhou stranu je třeba dodržet homogenitu textury v ROI, tzn. zajistit, že se ROI neskládá z více oblastí s rozdílnými texturními vlastnostmi.

Druhou možností je výpočet tzv. map texturních příznaků. V tomto případě jsou texturní příznaky většinou počítány pro každý pixel obrazu. Oblast, ze které se výpočet provádí, je vždy okolí daného pixelu, které může mít různou velikost. Příklad map tří různých texturních příznaků je uveden na obr. 3.16.

InvDfMom
separační vektor (5,-5)

S(1,-1)InvDfMom
separační vektor (1,-1)

ShrtREmp
horizontální směr



Obr. 3.16 Příklady map texturních příznaků, výchozí obrázek viz obr. 3.9a.

3.4.8.2 Výběr a redukce počtu texturních příznaků (*feature reduction*)

Před klasifikací objektů do tříd je vhodné provést redukci počtu texturních příznaků (39,^{57, 58}). Velký počet navzájem korelujících texturních příznaků, z nichž některé nesou pouze šumovou informaci, by totiž ze statistického hlediska vyžadoval k dosažení patřičné diskriminační síly veliký počet objektů, který obvykle není k dispozici. Ukazuje se, že je výhodnější ke klasifikaci použít pouze příznaky s nejvyšší diskriminační silou. Úspěšnost klasifikace analýzou textury výrazně závisí na optimální volbě texturních příznaků, které budou ke klasifikaci použity. Tento problém nemá obecné řešení - není možné dopředu říci, které texturní příznaky poskytnou základ pro nejlepší klasifikaci objektů.

Jestliže předem máme k dispozici informaci, jaké texturní třídy se v klasifikované skupině objektů vyskytují, můžeme použít zavedených statistických technik, které využívají kalkulace diskriminační síly. Tyto metody se nejčastěji souhrnně nazývají metody výběru příznaků (*feature selection*). Uvedeme příklady některých těchto metod.

3.4.8.2.1 Metoda Fisherova koeficientu

Fisherův koeficient je definován jako poměr rozptylu mezi třídami vůči rozptylu uvnitř tříd. Je vypočten podle vzorce

$$F = \frac{D}{V} = \frac{\frac{1}{\sum_{k=1}^K P_k^2} \sum_{k=1}^K \sum_{j=1}^K P_k P_j (\mu_k - \mu_j)^2}{\sum_{k=1}^K P_k V_k} \quad [3.11]$$

kde D vyjadřuje variabilitu mezi třídami, V variabilitu uvnitř tříd, μ_i , V_i střední hodnotu a rozptyl třídy i a P_i poměr mezi počtem vzorků ve třídě i vůči celkovému počtu vzorků.

3.4.8.2.2 Metoda minimalizace klasifikační chyby a korelačního koeficientu (*probability of error + average correlation coefficient*)

Tato metoda spočívá v minimalizaci pravděpodobnosti klasifikační chyby a průměrného korelačního koeficientu mezi vybranými texturními příznaky. Probíhá iteračně, v každém cyklu je vybrán jeden příznak. První příznak je vybrán tak, aby minimalizoval klasifikační chybu (POE) pro všechny třídy takto:

$$f^1 = f_j : \min_j [POE(f_j)] \quad [3.12]$$

kde $POE(f_j)$ je pravděpodobnost chyby klasifikace příznakem f_j . Tato pravděpodobnost je definována jako poměr správně klasifikovaných objektů vůči celkovému počtu objektů. Další příznak je vybrán minimalizací vzorce

$$f^2 = f_j : \min_j [POE(f_j) + |CC(f^1, f_j)|], \quad [3.13]$$

kde $|CC(f^1, f_j)|$ je absolutní hodnota korelačního koeficientu mezi již vybraným příznakem f^1 a vybíraným příznakem f_j . Další příznaky jsou přidávány analogicky s tím, že se počítá průměrný korelační koeficient mezi již vybranými příznaky a nově vybíraným příznakem (j vždy indexuje množinu zbývajících, dosud nevybraných příznaků).

3.4.8.2.3 Metoda invariantních příznaků

Výsledky předchozích studií provedených na našem pracovišti (56) ukázaly, že automatické techniky selekce příznaků někdy selhávají: Ke klasifikaci jsou vybrány příznaky s vysokou mírou variability v rámci identické textury. Tato variabilita je buď dána náhodnou fluktuací příznaku, nebo skutečnou heterogenitou textur v rámci texturní třídy, která však nemá diagnostický význam. Při klasifikaci těmito příznaky pak dochází k situaci, kdy jsou do více skupin rozděleny obrazy s identickou texturou a naopak rozdílné texturní třídy zůstávají v jedné skupině nerozděleny. Tento problém se projevuje především při výrazně rozdílném počtu subjektů v jednotlivých texturních třídách a při výskytu dat, která svými hodnotami výrazně vybočují (tzv. outlierů). Úspěšnost výběru texturních příznaků je též ovlivněna skutečností, že biologické struktury vykazují vysokou míru neuspořádanosti textury, a tím, že MR obrazy obecně vykazují poměrně nízký poměr signál/šum.

K optimalizaci výběru texturních příznaků byla na našem pracovišti navržena a testována technika invariantních texturních příznaků (56). Tato technika je založena na nalezení takových příznaků, které mají velmi vysokou míru reprodukovatelnosti v rámci jedné texturní třídy, ale signifikantně rozdílnou a zároveň vysoce reprodukovatelnou hodnotu vykazují na vzájemně odlišných texturních třídách. V prvním kroku analýzy jsou nalezeny příznaky s nejvyšší mírou reprodukovatelnosti a v dalším kroku jsou eliminovány ty příznaky, které nevykazují signifikantní rozdíly mezi jednotlivými texturními třídami. Výsledky naší studie ukazují, že tato metoda je velmi úspěšná při selekci relevantních texturních příznaků a je vhodná i v situacích, kdy není dopředu znám počet texturních tříd. Další možné metody výběru texturních příznaků (genetické algoritmy, kritéria rozdělení a odlehlých hodnot) byly úspěšně použity v klasifikaci USG obrazů v publikaci autorů Sucharda *et al.* (38).

3.4.8.3 Extrakce příznaků, projekce příznaků (*feature extraction, feature projection*)

Tyto techniky jsou založeny na transformaci vícedimenzionálního prostoru texturních příznaků do prostoru nově vytvořených příznaků (tzv. latentních proměnných) a na projekci texturních příznaků, do tohoto prostoru. Umožňují studovat vazbu a podobnost mezi texturními příznaky a mohou sloužit též k redukci jejich počtu. Používají se též ke hledání podobnosti mezi objekty (⁵⁹). Další vlastností těchto metodik je, že jsou vhodné k průzkumové analýze dat, tj. dají se užít k ověření normality výběru, k vyloučení autokorelace v datech a k detekci vybočujících bodů. Hlavním a nejvíce užívaným představitelem těchto metod je technika hlavních komponent. V naší studii bylo pro redukci počtu příznaků použito kombinací techniky invariantních příznaků a techniky hlavních komponent.

3.4.8.3.1 Analýza hlavních komponent (*principal component analysis*)

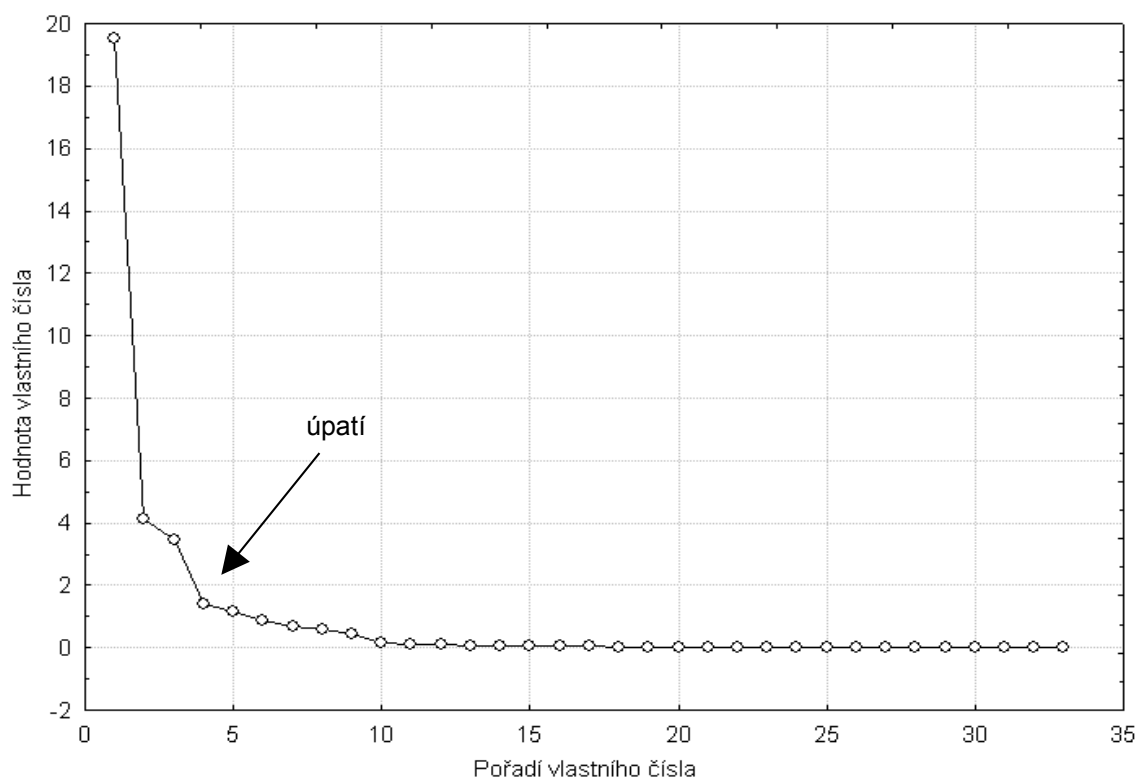
Cílem analýzy hlavních komponent (PCA) je především zjednodušení popisu skupiny vzájemně lineárně závislých čili korelovaných příznaků. To je dosaženo provedením transformace dat z původních proměnných $x_i; i = 1, \dots, m$ do menšího počtu latentních proměnných $y_j; j = 1, \dots, n$. Tyto nové proměnné mají vhodnější vlastnosti než původní proměnné: bývá jich výrazně méně, vystihují téměř celou proměnlivost původních proměnných a jsou vzájemně nekorelované – korelační koeficient mezi latentními proměnnými y_1, \dots, y_n je 0.

Latentní proměnné jsou u této metody nazvány hlavními komponentami a jsou to lineární kombinace původních proměnných: první hlavní komponenta y_1 popisuje největší část proměnlivosti čili rozptylu původních dat, druhá hlavní komponenta y_2 popisuje největší část rozptylu neobsaženého v y_1 atd. První hlavní komponenta vždy odpovídá nejdůležitější informaci v datech, významnost dalších komponent se postupně snižuje a „poslední“ komponenty obsahují pouze nepodstatnou informaci – šum. Matematicky řečeno, první hlavní komponenta je takovou lineární kombinací vstupních proměnných, která zahrnuje největší proměnlivost mezi všemi lineárními kombinacemi. Protože platí, že součet rozptylů všech hlavních komponent je roven součtu rozptylů vstupujících původních proměnných, můžeme z podílu rozptylů jednotlivých hlavních komponent usuzovat na část proměnlivosti vysvětlenou dotyčnou hlavní komponentou. Tento parametr vystihuje, jak velké procento informace soustředěné ve všech použitých původních proměnných dotyčná komponenta nese.

Na základě součtu podílů proměnlivosti prvních komponent pak můžeme posoudit, kolik komponent je potřeba k vysvětlení proměnlivosti původních dat (obvykle stačí 80-90%). Při zvyšování počtu komponent komplikujeme klasifikaci a vnášíme nepodstatnou (šumovou) informaci do klasifikace a metoda pozbývá svůj účel. Z celé teorie vyplývá, že kdybychom totiž chtěli nalézt komponenty, které vysvětlují 100% variabilitu dat, tak jejich počet by odpovídal počtu původních proměnných a celá analýza by pozbyla smyslu. Vzhledem ke skutečnosti, že mezi původními proměnnými většinou existují korelace, lze proměnné pomocí této metody transformovat tak, že většina informace se nachází v několika prvních hlavních komponentách. I při velkém počtu původních proměnných může být množství důležitých hlavních komponent velmi malé (2 až 5). Podrobný matematický postup analýzy je uveden v literatuře (59).

Jednoduše si princip PCA lze představit na datech obsahujících 3 proměnné. Data umístíme do prostoru a ustanovíme novou soustavu souřadnic. Směr první osy (první hlavní komponenty) stanovíme tak, aby průmět dat do této osy vykazoval co největší rozptyl. Druhou osu určíme tak, aby byla kolmá na první osu (tím zajistíme nulovou korelaci mezi proměnnými) a průmět dat do ní vykazoval znovu největší rozptyl. Poslední osa je pak kolmá k oběma již stanoveným osám. Tuto „prostorovou“ představu principu PCA pak lze zobecnit do n -rozměrného prostoru. Výsledek analýzy lze zobrazit v několika typech grafů hlavních komponent, uvádíme pouze nejdůležitější typy grafů:

a) Indexový graf úpatí vlastních čísel (*screeplot*, obr. 3.17). Tento sloupcový diagram ukazuje relativní velikost vlastních čísel pro jednotlivé indexy komponent. Pomáhá k určení optimálního počtu komponent k analýze. Ukazuje, jakou měrou přispívají jednotlivé komponenty do celkového rozptylu dat. Umožňuje tak diagnostikovat zlomový bod (úpatí) mezi užitečnými a již neúčinnými komponentami.



Obr. 3.17 Indexový graf úpatí vlastních čísel. Nalezení úpatí umožňuje stanovit optimální počet komponent pro analýzu – v tomto případě bychom pro analýzu použili první 4 hlavní komponenty.

b) Graf komponentních vah, zátěží (*plot components weights*, viz níže obr. 4.2). Pomocí tohoto grafu lze zobrazit váhu jednotlivých proměnných v hlavních komponentách – zjistit, do jaké míry jednotlivé vstupní proměnné do komponent přispívají. Na základě vzdáleností mezi proměnnými v grafu a úhlu jejich průvodičů se středem soustavy souřadnic můžeme usuzovat na vzájemnou kovarianci a korelaci vstupních proměnných. Krátká vzdálenost mezi dvěma proměnnými a podobný úhel průvodičů znamená vysokou korelaci a kovarianci příznaků. Takto lze nalézt skupinu proměnných, které spolu silně korelují a tedy nesou podobnou texturní informaci. V dalším kroku lze pak provést opakovanou PCA analýzu s použitím pouze jedné z těchto proměnných, což vede ke snížení šumu v datech. Srovnáním vstupních dat a tohoto grafu lze někdy hlavním komponentám přiřadit fyzikální, chemický nebo biologický význam. Tento graf umožňuje klasifikovat důležitost

jednotlivých vstupních proměnných: proměnné s vysokou mírou proměnlivosti v datech mají vysoké hodnoty komponentní váhy; v diagramu leží daleko od počátku. Naopak proměnné s nízkou mírou proměnlivosti a tím i nízkou vypovídací schopností leží blízko počátku soustavy souřadnic.

c) Rozptylový diagram komponentního skóre (*scatterplot*, viz níže obr. 4.3-4.9). Tento graf zobrazuje komponentní skóre čili hodnoty hlavních komponent u všech objektů. Pro vyhodnocování a zobrazení se většinou volí rovinný graf prvních dvou komponent (y_1 versus y_2), dle potřeby se přidávají k doplnění grafy dalších komponent, pokud další komponenty přispívají podstatnou měrou do variability dat (y_1 versus y_3 , y_2 versus y_3 , y_1 versus y_4 atd.). V rovině lze nalézt shluky vzájemně podobných objektů a dále objekty odlehle a silně odlišné od ostatních. Objekty blízko sebe jsou si podobné, objekty daleko od sebe jsou si nepodobné. Objekty osamělé jsou buď odlehle objekty silně nepodobné ostatním objektům, případně objekty zatížené určitou systematickou chybou při měření. Tímto způsobem lze objekty klasifikovat do tříd a skupin a eliminovat případně chybně získaná data. Vybrané komponenty lze také využít k testům vícerozměrné normality. Tento diagram se používá i v průzkumové analýze vícerozměrných dat.

Techniku PCA lze též užít ke klasifikaci objektů, ke kterým máme k dispozici velkou část vstupních proměnných. Tato metoda patří mezi „grafické“ metody, tj. neposkytuje odpověď na otázku, do které skupiny má být ten či onen subjekt zařazen; konečná klasifikace je úkolem operátora, který musí vytvořit grafické hranice mezi objekty a identifikovat případné seskupování dat v grafu. Podmínkou úspěšnosti analýzy je správné stanovení počtu hlavních komponent a eliminace odlehklých dat získaných se systematickou chybou.

3.4.8.4 Klasifikace analýzou textury

Proces klasifikace objektů do tříd je finálním krokem texturní analýzy. Spočívá ve hledání podobnosti a vzájemných vazeb v datech, seskupování dat a případné interpretaci výsledků. Klasifikační metody jsou postupy, pomocí kterých se jeden objekt zařadí buď do existující třídy (diskriminační analýza – tzv. *supervised* techniky), nebo se neuspořádaná skupina rozdělí do několika tříd či shluků (analýza shluků – *cluster analysis* – tzv. *unsupervised* techniky). Hlavní rozdíl mezi technikami je takový, že *supervised* techniky potřebují předem znát příslušnost objektů do tříd, aby se odvodilo klasifikační pravidlo (např. stanovení diskriminační funkce v případě diskriminační analýzy). Na základě příslušnosti objektů do jednotlivých tříd se odvozuje pravidlo umístění dosud nezařazených

objektů. *Supervised* techniky lze tedy použít pouze v případě jasně a úzce specificky vymezených texturních tříd. Pro objekt, který nepatří do žádné z předem identifikovaných tříd, klasifikace selhává, neboť tyto techniky neumožňují detekci objektů, které nepatří do žádné z tříd nebo vytvoření třídy nové. Zejména v medicíně většinou chybí přesná klasifikace subjektů podle diagnóz, skupiny bývají heterogenní, nejasně definované. V těchto případech je vhodné použít techniky, které nejsou založeny na apriorní klasifikaci s předem známým počtem tříd. Takovými technikami jsou buď projekční techniky (analýza hlavních komponent), nebo *unsupervised* klasifikační techniky.

3.4.8.4.1 *Supervised* techniky klasifikace - diskriminační analýza

Diskriminační analýza (DA) patří mezi metody zkoumání vztahu mezi skupinou p nezávislých znaků (diskriminátorů) a jednou kvalitativní závisle proměnnou – výstupem. Tento výstup představuje umístění objektu do dané třídy. Počet tříd je přesně znám, předpokládá se, jsou zřetelně odlišené a objekt patří do jedné z nich. Tato analýza vyžaduje tzv. trénovací skupinu, ve které je u každého objektu známo jeho zařazení do třídy. Úkolem analýzy je nalézt model, který umožní zařadit nové objekty do již existujících tříd. Matematický postup DA je do určité míry podobný PCA: geometricky vzato hledáme takovou projekci vícerozměrných dat, ve které jsou shluky subjektů patřících do stejných tříd od sebe navzájem co nejvíce odseparovány⁽⁶⁰⁾. Matematicky vzato hledáme takovou lineární kombinaci vstupních klasifikátorů p , ve které je minimalizována variace uvnitř tříd a maximalizována variace mezi třídami (kritérium Fisherova koeficientu, viz výše).

3.4.8.4.2 *Unsupervised* techniky klasifikace - analýza shluků

Tato metoda spočívá v uspořádávání dat do jednotlivých shluků na základě jejich vzájemné podobnosti v datech. Podobnost v datech je vyhodnocována různými kritérii – tzv. mírou korelace (výpočet Pearsonova korelačního koeficientu mezi jednotlivými objekty), mírou vzdálenosti (výpočet vzdálenosti mezi body ve vícedimenzionálním prostoru – je užíváno různých typů výpočtu – např. Eukleidovská, Manhattanská, Mahalanobisova vzdálenost) a mírou asociace (užívána pro nominální, případně ordinální data). Data jsou shlukována buď hierarchicky do stromové struktury (tzv. dendrogramy), nebo nehierarchicky do skupin. Tato metodika je velmi citlivá na přítomnost nevýznamných znaků a přítomnost odlehlých subjektů, které se silně odlišují od ostatních. Tato odlehlá data mohou reprezentovat výrazně patologické subjekty, ale též mohou vzniknout hrubou chybou měření nebo chybou při výběru reprezentativního vzorku. Přítomnost či nepřítomnost vybočujícího subjektu často vede k odlišným výsledkům

klasifikace. Proto je u této techniky velmi důležité správně vybírat relevantní příznaky a pečlivě posuzovat vybočující data.

3.5 Svalové lipidy a MR spektroskopie svalu

MR spektroskopie umožňuje jako jedna z mála technik neinvazivní stanovení zastoupení metabolitů v tkáních *in vivo*. Představuje tak nástroj umožňující studium biochemie buňky. Vzhledem ke své neinvazivnosti, relativní cenové dostupnosti a absenci škodlivých účinků na tkáň představuje vhodný nástroj ke klinickým studiím biochemických procesů ve tkáních.

Jednou z aplikací protonové MR spektroskopie je měření koncentrací lipidů ve svalových buňkách (intramyocelulárních lipidů – IMCL). Koncentrace IMCL je řádově menší, než koncentrace lipidů v adipocytech svalových sept (extramyocelulárních lipidů – EMCL), proto nejsou IMCL klasickým MR zobrazováním pozorovatelné. IMCL hrají velmi významnou roli v patogenezi diabetu 2. typu. MR spektroskopie umožňuje relativně snadno sledovat dynamický vývoj koncentrací lipidů v čase, provádět studie na velkých skupinách subjektů, a tak studovat nejrůznější vlivy na metabolismus lipidů.

3.5.1 Fyziologie a biochemie lipidů

Lipidy představují důležitou zásobu energie pro pracující kosterní sval. Vzhledem k většímu nároku na množství kyslíku na jeden kJ vyprodukované energie v porovnání se sacharidy ⁽⁶¹⁾ jsou lipidy využívány jako energetický zdroj především v klidu a v období dlouhodobé aerobní svalové námahy.

Chemickým složením jsou lipidy estery dlouhořetězcových (tzv. mastných) karboxylových kyselin s glycerolem. Na stavbě lipidů se podílí několik různých typů mastných kyselin. Jejich jednotlivé zastoupení závisí na řadě faktorů, jako je typ stravy nebo tkáň, ze které lipidy analyzujeme. Typ mastné kyseliny je většinou označován pomocí délky řetězce (počtu uhlíků) a počtu dvojných vazeb; např. kyselina značená 18:2 má řetězec skládající se z 18 uhlíků a 2 dvojných vazeb. Na základě chemické analýzy lidské kadaverózní bránice, provedené ve studii ⁽⁶²⁾, patří největší zastoupení (39%) kyselině 18:1 (kyselina olejová), dále 21% kyselině 16:0 (kyselina palmitová) a 15% kyselině 18:2 (kyselina linolová). Toto složení se však liší sval od svalu a může být ovlivněno způsobem, jakým byl vzorek získán (kadaverózní odběr, biopsie).

Lipidy se v organismu vyskytují v nejrůznějších kompartmentech, největší množství lipidů se nachází ve vakuolách adipocytů tukové tkáň. Lipidy se nacházejí v menším množství (měřitelném pomocí MR spektroskopie) i v játrech uvnitř hepatocytů ⁽⁶³⁾ a v malých kapénkách uvnitř vláken kosterního svalu ⁽⁶⁴⁾. V kosterním svalu

rozlišujeme lipidy nacházející se v adipocytech svalových sept (EMCL) a lipidy v kapénkách v cytoplasmě svalových buněk (IMCL, v patobiochemické literatuře značeny i jako intramyocelulární triglyceridy - IMTG). Koncentrace EMCL v adipocytech je o několik řádů vyšší než koncentrace IMCL v cytoplasmě svalových vláken. V posledních několika letech se pozornost zaměřila především na studium IMCL, protože mají úzký vztah k metabolismu glukosy a insulínu. Kompartment IMCL dále hraje důležitou úlohu v energetickém zásobování pracujícího svalu.

IMCL jsou uskladněny ve formě kapének v cytoplasmě vláken kosterního svalu v těsné blízkosti mitochondrií. Kapénky lipidů v cytoplasmě jsou pokryty na povrchu několika typy proteinů. V adipocytech je výrazně exprimován protein perilipin, ve svalu plní podobnou úlohu pravděpodobně protein ADRP (*adipose differentiation-related protein*)⁽⁶⁵⁾. Tyto proteiny se též podílejí na aktivaci lipolýzy.

Během svalové námahy je rozklad lipidů zajištěn enzymem hormon-senzitivní lipázou (HSL). HSL je neutrální lipáza, která štěpí první a druhý řetězec mastné kyseliny. Aktivita tohoto enzymu je regulována přímou kontrakcí svalu⁽⁶⁶⁾ a dále je regulována adrenalinem⁽⁶⁷⁾. Koncentrace HSL a IMCL též závisí na typu svalového vlákna – je vyšší v oxidativních (pomalých) vláknech.

Při štěpení IMCL jsou uvolněné mastné kyseliny v cytoplasmě navázány na koenzym A za vzniku acyl-koenzymu A (*long-chain fatty acyl coenzyme A* – LCACoA). Tato metabolicky aktivní forma lipidu hraje klíčovou úlohu při působení na metabolismus glukosy a insulínu.

LCACoA je pak přenášen do mitochondrií ke svému energetickému využití pomocí aminokyseliny karnitinu. Uvnitř mitochondrie dochází k uvolnění karnitinu a mastná kyselina je metabolizována procesem beta-oxidace. Produkty této biochemické kaskády je acetyl koenzym A a redukční ekvivalenty NADH a FADH₂. Acetyl koenzym A je dále metabolizován trikarboxylovou cestou za produkce dalších redukčních ekvivalentů. Redukční ekvivalenty jsou pak metabolizovány v dýchacím řetězci aerobní fosforylace, dochází k odebrání elektronů a jejich transportu přes kofaktory dýchacího řetězce, umístěné ve vnitřní mitochondriální membráně. Dále dochází ke vzniku protonového gradientu na membráně, jehož energie je využita k syntéze ATP.

3.5.2 Insulinová rezistence

Insulinová rezistence je stav, kdy dochází ke snížení účinku insulínu v periferní tkáni, tj. především ke snížení vychytávání glukosy z krevního řečiště do buněk. Insulinová

rezistence není sama o sobě onemocněním, přibližně jedna třetina jinak zdravé populace vykazuje příznaky insulinové rezistence. Nicméně tento stav je spojen se zvýšeným rizikem vývoje patologických změn metabolismu, především vývoje diabetu mellitu 2. typu. Tento v populaci poměrně častý stav úzce souvisí s tzv. Reavenovým metabolickým syndromem X ⁽⁶⁸⁾, který je charakterizován hyperlipidemií, sníženou hladinou HDL-cholesterolu, hyperglykemií, obezitou a insulinovou rezistencí. Tento epidemiologický pojem spojuje hlavní rizikové faktory vedoucí k vývoji kardiovaskulárních chorob, diabetu mellitu a dalších onemocnění.

Tradiční „glukocentrický“ pohled na insulinovou rezistenci a diabetes bývá v poslední době nahrazován „lipocentrickým“ modelem. Nové studie prokazují, že insulinová rezistence je úzce spojena s intracelulární akumulací LCACoA. Tento fakt je dáván do souvislosti s poruchou funkce mitochondrií, která vede ke snížené metabolické kapacitě pro oxidaci lipidů. Fyziologicky dochází ke snížení této kapacity ve stáří. U mladších subjektů, kteří vykazují insulinovou rezistenci nebo u nichž již došlo k plnému rozvinutí diabetu mellitu 2. typu, se pravděpodobně jedná o genetický defekt ⁽⁶⁹⁾. Bylo prokázáno, že zvýšení oxidativní kapacity lipidů v mitochondriích lze navodit pravidelnou fyzickou aktivitou. Spolu se zvýšením oxidativní kapacity pak dochází i ke zvýšení insulinové senzitivity díky poklesu účinku LCACoA na metabolismus glukosy. Vzhledem k tomu, že LCACoA je přímým metabolitem IMCL, lze sledováním metabolismu IMCL přispět k poznání, jakou roli hrají lipidy v patogenetických mechanismech insulinové rezistence. Hypotézu omezené oxidativní kapacity lipidů při insulinové rezistenci potvrzují poslední studie využívající ¹H MR spektroskopii ke stanovení koncentrací IMCL ⁽⁷⁰⁾.

3.5.3 Vztah LCACoA a insulinové rezistence

LCACoA ovlivňuje metabolismus insulinu několika hlavními mechanismy ⁽⁷¹⁾:

1. Inhibice hexokinázy

Tento klíčový enzym, fosforylující glukosu a inicializující tak její postupnou přeměnu na pyruvát a acetyl koenzym A, je allosterickým mechanismem inhibován působením LCACoA. Inhibice má rychlou odezvu a její síla je závislá na koncentraci LCACoA. Tento mechanismus díky svému okamžitému účinku a rychlému ústupu nehraje důležitou úlohu při vývoji chronické insulinové rezistence ve svalech.

2. Vliv na protein-kinázu C (PKC)

PKC je protein, účastní se fosforylace-defosforylace (a tedy aktivace/deaktivace) řady signalizačních enzymů. Existuje řada subtypů tohoto proteinu s rozdílnou funkcí a s rozdílnou vazbou k specifickým signalizačním proteinům. Existují důkazy, že LCACoA má přímý účinek na aktivitu PKC, dále že může působit na PKC i nepřímo tím, že ovlivní syntézu specifických diglyceridů (např. diacylglycerol), které patří k známým aktivátorům PKC.

3. Vliv na syntézu ceramidů

Ceramidy (látky patřící do skupiny složených lipidů) patří k signálním molekulám, u kterých byl prokázán inhibiční vliv na insulinovou signální kaskádu (opět ovlivněním specifických protein-kináz a též přímým ovlivněním glukozové membránové transportní molekuly GLUT4). LCACoA je přímým prekurzorem v syntéze ceramidu *de novo* a je prokázáno, že hromadění LCACoA může vést ke zvýšené syntéze ceramidů.

4. Ovlivnění glukosového transportního proteinu GLUT4

GLUT4 se v inaktivním stavu nachází ve vezikulách endoplasmatického retikula. Při insulinové stimulaci dochází k jeho translokaci na cytoplasmatickou membránu, kde se rozhodující měrou podílí na transferu glukosy přes membránu do intracelulárního prostředí. Studie prokázaly, že LCACoA hraje určitou roli při této membránové translokaci, i když prozatím nebylo prokázáno, zdali má tento fakt nějaký patofyziologický význam.

5. Ovlivnění genové exprese

Je prokázáno, že zvýšené hladiny lipidů ovlivňují expresi specifických enzymů, které se účastní lipidového metabolismu v adipocytech a v jaterní tkáni. Lze očekávat přítomnost podobných mechanismů i v kosterním svalu.

3.5.4 ¹H MR spektroskopie svalu – přehled dosavadních výsledků

3.5.4.1 Metodické studie

V počátcích MR spektroskopie *in vivo* byla pozornost při studiu svalového metabolismu zaměřena především k použití ³¹P spektroskopie, která umožňuje kvantifikovat látky spojené s energetickým metabolismem svalu (ATP, fosfokreatin). Změna nastala poté, co bylo zjištěno, že v ¹H MR spektru kosterního svalu lze rozlišit

signál patřící lipidům uvnitř svalové buňky (IMCL) a lipidům adipocytů svalových sept (EMCL) (⁷²).

Důležitou prací byla studie autorů Kreis *et al.* (⁷³), kteří prokázali, že tvar signálů spektra kosterního svalu závisí na orientaci svalových vláken vůči magnetickému poli. Tento efekt je způsoben jak dipól-dipólovými interakcemi, tak anizotropickou magnetickou susceptibilitou (tzv. *bulk magnetic susceptibility* – BMS). Tito autoři též prokázali existenci do té doby nepopsaných píků X1-X4 ve spektru kosterního svalu. Částečnou identifikaci těchto píků pak provedli stejní autoři s pomocí technik 2D spektroskopie (⁷⁴) a ověřili i klinickým pokusem (⁷⁵). Podrobnou studii, která se zabývala optimální separací a kvantifikací IMCL a EMCL, provedli autoři Boesch *et al.* (⁷⁶). V této důležité studii byla experimentálně potvrzena závislost signálů EMCL a IMCL na orientaci svalových vláken vůči magnetickému poli. Studie potvrdila správnost teoretického modelu dříve publikovaného ve studii autorů Chu *et al.* (⁷⁷). Ověření tohoto modelu *in vitro* provedli autoři Sczcepianiak *et al.* měřením spekter sojového oleje a intralipidu (⁷⁸). Technika MR spektroskopie pro kvantifikaci IMCL byla ve studiích porovnána s jinými používanými technikami – histologickými a biochemickými. Např. autoři Howald *et al.* (⁶⁴) prokázali těsnou korelaci mezi koncentrací IMCL měřenou MR spektroskopicky a elektron-mikroskopicky ($r = 0,93$; $p = 0,001$). Přehled jednotlivých technik stanovení koncentrace IMCL a jejich porovnání je možno nalézt např. v přehledovém článku (⁷⁹).

Bylo provedeno několik studií využívajících techniku spektroskopického zobrazování k mapování rozložení IMCL v jednotlivých svalech lýtky (⁸⁰) a k mapování směrové orientace vláken v lýkových svalech (⁸¹). Od té doby bylo publikováno několik experimentálních studií navrhuje zlepšení separace EMCL a IMCL, včetně technik využívajících mapování magnetického pole (⁸²).

3.5.4.2 Klinické studie

Větší pozornost získaly techniky MR spektroskopie poté, co byla zjištěna negativní korelace mezi koncentrací IMCL a velikostí insulinové senzitivity (^{83, 84}). Od té doby byla provedena řada studií, které pomohly v porozumění vztahu lipidů a insulinové senzitivity. Byly též provedeny velké studie na heterogenních skupinách subjektů, které korelaci IMCL a insulinové senzitivity neprokazovaly (⁸⁵). Postupně bylo zjišťováno, že na koncentrace IMCL má vliv řada dalších faktorů, jako např. věk, genetická predispozice, množství tělesného tuku (⁸⁶), typ svalu, ze kterého se vyšetřuje, a úroveň fyzické

trénovanosti subjektu. Výsledky ukázaly, že přímou korelaci koncentrace IMCL a insulinové senzitivity lze pozorovat jen v rámci úzce charakterizovaných skupin subjektů.

Dále bylo prokázáno, že zvýšení hladiny IMCL ve svalu je první pozorovanou metabolickou odpovědí svalu na fyzický trénink⁽⁸⁷⁾. U trénovaných subjektů byly naměřené hladiny IMCL v klidu dokonce vyšší než u diabetiků⁽⁸⁸⁾. Z provedených studií, sledujících vývoj hladin IMCL během svalové námahy, bylo zjištěno, že na rozdíl od insulin-rezistentních subjektů může být IMCL při námaze u trénovaných subjektů plně spotřebován (79). Zvýšení hladiny IMCL u trénovaných subjektů je tedy (na rozdíl od diabetiků) provázeno zvýšením oxidativní kapacity IMCL. Vzhledem k tomu, že IMCL slouží jako zdroj energie u aerobní námahy, je akumulace IMCL u trénovaných logicky vysvětlitelná, neboť ukazuje adaptaci svalové buňky na námahu akumulací energetického substrátu, kterým jsou IMCL.

Patofyziologické objasnění problému utilizace IMCL a insulinové rezistence podali autoři Petersen *et al.*, kteří zjistili, že zvýšené hladiny IMCL a insulinová rezistence kosterního svalu u mladých potomků diabetiků 2. typu je způsobena defektem v mitochondriální oxidativní fosforylaci lipidů (70). Vzhledem k tomu, že v této vyšetřované skupině byli přítomni pouze mladí, nesportující a neobézní lidé, lze vyloučit jiné faktory, které též mohou ovlivnit hladinu IMCL. Fakt, že IMCL tvoří významný energetický substrát pro pracující sval, je poměrně novým poznatkem.

Mechanismy regulace syntézy a utilizace IMCL nejsou ještě zdaleka objasněny. Nálezy z posledních let ukazují, že další výzkum metabolismu IMCL je třeba zaměřit na dynamické studie, které budou sledovat mechanismy regulace syntézy a utilizace IMCL a povedou k pochopení významu ostatních (nutričních, genetických) faktorů, které ovlivňují insulinovou rezistenci. Dalším polem výzkumu v této oblasti je studium vlivu specifických farmak na kapacitu utilizace IMCL v mitochondriích. Cílem těchto snah je nalezení způsobu, jak normalizovat insulinovou senzitivitu u subjektů, které jsou potenciálně rizikovou skupinou pro pozdější vývin diabetu 2. typu.

3.5.5 Popis ¹H svalového spektra

¹H MR spektrum kosterního svalu má tvar, který významnou měrou závisí na mnoha faktorech, jako je např. typ vyšetřovaného svalu, časový odstup od posledního jídla, úroveň fyzické námahy vyšetřovaného subjektu před měřením a typ MR sekvence použité pro měření. Významným faktem, který ovlivňuje tvar spektra, je orientace svalových vláken vůči vektoru magnetické indukce \mathbf{B}_0 . V následující stati popíšeme tvar spektra svalu

m. tibialis anterior, naměřeného při orientaci svalových vláken paralelně vůči vektoru magnetické indukce. V případě *m. tibialis anterior* tato orientace odpovídá přibližně orientaci dolní končetiny rovnoběžně s osou otvoru magnetu, což je poloha, která byla použita v našich studiích. Popíšeme zde spektrum naměřené s krátkým a dlouhým TE. Přehled chemických posunů pozorovaných píků spektra dlouhého a krátkého TE je uveden v tabulce 3.1.

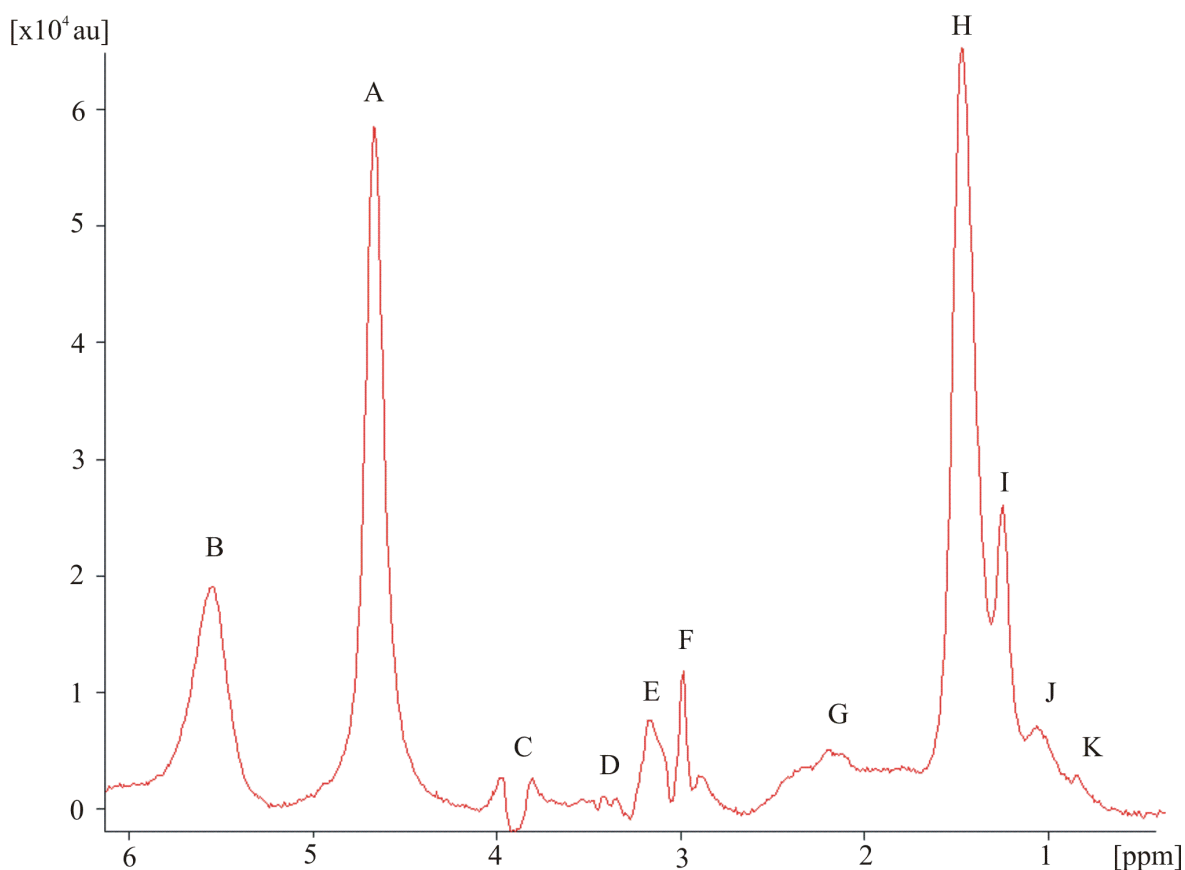
Tabulka 3.1 Přehled píků pozorovatelných při 3 T při dlouhém TE (270 ms) a krátkém TE (30 ms).

Chem. posun δ [ppm] TE = 30 ms	Chem. posun δ [ppm] TE = 270 ms	Metabolit
5,5	5,5	–HC=CH–
4,7	4,7	voda
4,06	4,06	kreatin CH ₂
3,79	3,79	kreatin CH ₂
-	3,6	?
3,46	-	X3 (taurin?)
-	3,45	?
3,4	-	X3 (taurin?)
-	3,32	?
3,2	3,2	TMA, X3, kreatin CH ₃ (boční satelit)
3,0	3,0	kreatin CH ₃
2,8	-	kreatin CH ₃ (boční satelit)
2,7-1,5	2,7-1,5*	–CO–CH ₂ – a –CH=CH–CH ₂ –
2,13	2,13	acetylkarnitin (acetylová skupina)
1,49	1,49	EMCL_CH ₂
1,28	1,28	IMCL_CH ₂
1,07	1,07	EMCL_CH ₃
0,885	0,885	IMCL_CH ₃

* minimální intenzita

3.5.5.1 Spektrum krátkého TE

Typické spektrum krátkého TE je zobrazeno na obr. 3.18. Významným píkem spektra krátkého TE je pík vody, který se nachází v oblasti $\delta = 4,7$ ppm. Oproti jiným tkáním (např. mozku) je jeho intenzita výrazně nižší. Proto lze spektra kosterního svalu naměřit bez potlačení vody, aniž by to způsobilo problém s kvantifikací metabolitů. Někteří autoři používají pík vody jako interní standard pro kvantifikaci (62).



Obr. 3.18 Typické spektrum *m. tibialis anterior* měřené při 3 T s TE = 30 ms. A: voda; B: $-\text{HC}=\text{CH}-$ skupina lipidů; C: dublet CH_2 skupiny kreatinu; D: oblast komplexu píků X3; E: signál skupiny TMA; F: CH_3 skupina kreatinu; G: signál $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ skupin lipidů; H: CH_2 skupina EMCL (EMCL- CH_2); I: CH_2 skupina IMCL (IMCL- CH_2); J: CH_3 skupina EMCL (EMCL- CH_3); K: CH_3 skupina IMCL (IMCL- CH_3).

V oblasti o chemickém posunu δ přibližně 5,5 ppm pozorujeme široký pík, který patří signálům dvojných vazeb $-\text{HC}=\text{CH}-$ skupin. Na 3,93 ppm se nachází CH_2 pík kreatinu. Díky efektu dipól-dipólové interakce je tento pík při paralelní orientaci svalových vláken rozštěpen na dvě části s frekvenčním rozdílem 17 Hz, což při 1,5 T odpovídá chemickým posunům 3,79 a 4,06 ppm. V oblasti 3,4 ppm se nachází pík, který byl autory původně označen X3. Na spektrech naměřených při $B_0 = 3$ T někdy pozorujeme štěpení tohoto píku na dva překrývající se píky, lokalizované na 3,40 a 3,46 ppm. Tento signál patří pravděpodobně taurinu. 2D spektroskopická měření provedená autory Kreis *et al.* (74) prokazují, že tento pík je součástí multipletu, který má střed v oblasti 3,33 ppm. Část tohoto multipletu se překrývá s píkem TMA v oblasti 3,2 ppm. Toto štěpení taurinového multipletu vzniká též díky efektu dipolární interakce. V oblasti 3,2 ppm nacházíme pík trimethylaminové (TMA) skupiny cholinu a karnitinu. Na 3,0 ppm se nalézá pík CH_3 skupiny kreatinu, který je díky dipolární interakci rozštěpen na triplet s bočními píky

lokalizovanými na 3,2 (zde je překryv s TMA) a 2,8 ppm. (tento pík byl dříve značen jako X4). V rozsahu přibližně 1,5-2,7 ppm pozorujeme při měření krátkým TE velmi široký a intenzivní komplex signálů komplikovaného tvaru spektrální čáry, který patří směsi $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ skupin lipidových řetězců. Tyto signály mají krátký relaxační čas a jsou tedy ve spektrech měřených s dlouhým TE přítomny jen v minimální míře. V oblasti 2,13 ppm nacházíme u některých subjektů úzký pík (singlet), který byl na základě výsledků studie autorů Kreis *et al.* identifikován jako acetylová skupina acetylkarnitinu (⁸⁹). Intenzita tohoto píku silně závisí na aktuální svalové fyzické zátěži. Jeho intenzita roste i určitou krátkou dobu po skončení námahy (cca 2 minuty) a v případě středně těžké námahy dochází k návratu do klidového stavu do 30 minut. V případě těžké námahy dochází k výrazně vyššímu nárůstu intenzity píku a doba návratu k bazálním hodnotám je výrazně delší (i více než 60 minut). U většiny subjektů tento pík v klidovém stádiu vymizí a není pozorovatelný, nicméně u některých subjektů je tento pík přítomen i v klidu. Jeho rezonance nevykazuje dipolární interakci a tudíž není závislá na orientaci svalového vlákna. U spekter měřených s krátkým TE tento pík vyčnívá přibližně v polovině šířky signálu $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ skupin. Z obr. 4.11a,b je zřejmé, že při nižší intenzitě je tento pík překryt signálem $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ skupin a není na krátkém TE pozorovatelný.

Hlavními píky, které jsou významné pro klinické využití ¹H MR spektroskopie, jsou píky EMCL a IMCL. Tento komplex se skládá ze čtyř hlavních signálů: CH₂ skupiny EMCL (EMCL_CH₂) s centrem na 1,49 ppm, CH₂ skupiny IMCL (IMCL_CH₂) s centrem na 1,28 ppm, CH₃ skupiny EMCL (EMCL_CH₃) s centrem na 1,07 ppm a CH₃ skupiny IMCL (IMCL_CH₃) s centrem na 0,885 ppm. Pozice těchto píků je výrazně ovlivněna orientací svalových vláken vůči magnetickému poli. Tento efekt není způsoben dipól-dipólovou interakcí, ale anizotropickou susceptibilitou (viz dále). Zejména píky IMCL_CH₃ a EMCL_CH₃ jsou při použití krátkého TE velmi široké a překrývají se. Tato skutečnost velmi ztěžuje kvantifikaci CH₃ skupiny lipidů ze spekter naměřených s krátkým TE.

3.5.5.2 Spektrum dlouhého TE

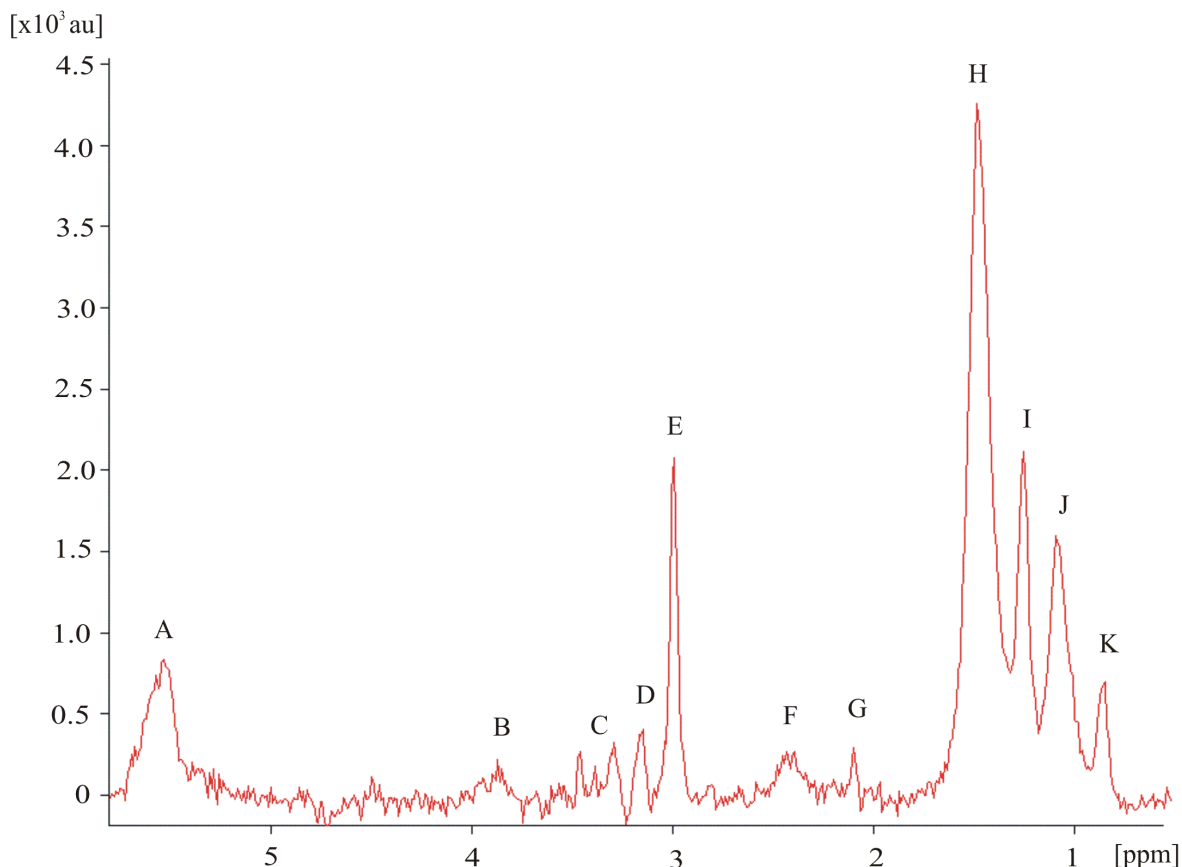
Spektrum dlouhého TE (TE = 270 ms) má odlišnou charakteristiku, především díky skutečnosti, že signály, mající krátký T₂ relaxační čas, jsou přítomny pouze v minimální míře (obr. 3.19). Obecně má spektrum výrazně horší poměr signál/šum. Pro dosažení uspokojivé kvality spektra je tedy nutno měřit s více akvizicemi. Výhodou dlouhého TE je,

že odfiltrováním širokých signálů můžeme některé píky lépe pozorovat a lépe fitovat. Na 4,7 ppm pozorujeme opět signál vody (pokud je měřeno bez potlačení vody), jehož výška je srovnatelná s výškou signálů lipidového komplexu. Signál -HC=CH- skupin na 5,5 ppm je výrazně nižší, při 1,5 T někdy až nepozorovatelný. Signál CH_2 skupiny kreatinu v oblasti 4,0 ppm je díky kratšímu T2 času přítomen v minimální míře a spíše zaniká v šumu. Oblast X3 píků má odlišnou charakteristiku při 1,5 a 3 T: Při 1,5 T tato oblast opět zaniká v šumu, při 3 T jsme schopni pozorovat tři píky: Na 3,6 ppm pozorujeme širší pík, dále pík nízké intenzity přibližně na 3,45 ppm a konečně většinou užší a poměrně intenzivní pík v oblasti 3,32 ppm.

Rozdíl v charakteru spektra při krátkém a dlouhém TE je pravděpodobně způsoben spin-spinovou interakcí metabolitů v oblasti 3,2-3,6 ppm, především taurinu. Tato interakce způsobuje variaci fáze píků a tedy i tvaru spektra v závislosti na použitém TE. Podrobné studium spektra svalové tkáně na vyšších polích při delším TE však nebylo prozatím provedeno.

V oblasti 3,2 ppm pozorujeme při dlouhém TE signál TMA skupiny, který má nižší intenzitu ve srovnání s krátkým TE. Dominujícím signálem je úzký signál CH_3 skupiny kreatinu v oblasti 3,0 ppm. Štěpení signálu kreatinu nebývá na dlouhém TE pozorovatelné, signál X4 na 2,8 ppm není přítomen. Lipidové signály skupin směsi $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ a $\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$ jsou přítomny v mnohem menší míře, pozorujeme je pouze jako nevýrazné fluktuace základní čáry. Díky nepřítomnosti signálů $\text{-CO-CH}_2\text{-}$ a $\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$ skupin pozorujeme mnohem častěji úzký signál acetylkarnitinu na 2,13 ppm.

Hlavní komponentou spektra měřeného s dlouhým TE je komplex píků CH_2 a CH_3 skupin EMCL a IMCL. Chemické posuny δ jednotlivých lipidových skupin jsou totožné jako na krátkém TE: 1,49; 1,28; 1,07 a 0,885 ppm. Odlišný je však charakter píků – píky mají oproti krátkému TE zřetelně menší pološířku (jsou užší). Tento efekt pozorujeme především u CH_3 signálů. Závislost pološířky píků lipidů na použitém TE lze vysvětlit vícesložkovou (multikompartmentovou) relaxací signálů IMCL – tedy skutečností, že do jednotlivých EMCL a IMCL signálů přispívá více složek, které mají rozdílný relaxační čas T2. Při použití krátkého TE do signálu přispívá pak jak složka s krátkým T2 (která má větší pološířku píku), tak složka s dlouhým T2. Při dlouhém TE však v signále převládá pouze složka s dlouhým T2. Tato složka má menší pološířku a tedy jednotlivé píky EMCL a IMCL jsou ve spektru měřeném s dlouhým TE lépe odseparovatelné, protože se méně překrývají.



Obr. 3.19 Typické spektrum *m. tibialis anterior* měřené při 3 T s TE = 270 ms. A: $-\text{HC}=\text{CH}-$ skupina lipidů; B: oblast CH_2 skupiny kreatinu; C: oblast komplexu píků X3; D: signál skupiny TMA; E: CH_3 skupina kreatinu; F: signál $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ skupin lipidů; G: acetylkarnitin; H: CH_2 skupina EMCL (EMCL_ CH_2); I: CH_2 skupina IMCL (IMCL_ CH_2); J: CH_3 skupina EMCL (EMCL_ CH_3); K: CH_3 skupina IMCL (IMCL_ CH_3).

Jestliže přijmeme hypotézu, že jednotlivé signály IMCL a EMCL se skládají z více složek s rozdílnými T2 relaxačními časy, znamená to, že se tyto látky nacházejí v buňkách ve více prostředích (kompartmentech) s rozdílnými fyzikálními vlastnostmi. Cytologicko-biochemická identifikace těchto kompartmentů však prozatím nebyla provedena. Lze pouze spekulovat, že by se mohlo jednat např. o lipidy shromážděné v tukových kapénkách v cytoplasmě a o lipidy aktuálně metabolizované v mitochondriích. K přesnější korelaci spektroskopických a biochemických nálezů by bylo třeba detailně prozkoumat fyzikální vlastnosti těchto komponent signálů (zvláště pro složku s krátkým T2 a složku s dlouhým T2) a též se pokusit o numerické stanovení T2 relaxačních časů těchto složek. Taková studie doposud provedena nebyla, T2 relaxační časy EMCL a IMCL byly vyhodnocovány vždy pouze pomocí jednokompartimentového modelu (72), tedy s předpokladem, že existuje pouze jeden kompartment EMCL a jeden kompartment IMCL.

3.5.6 Teorie *bulk magnetic susceptibility* – separace EMCL a IMCL ve spektru

V této části krátce vysvětlíme, na jakém principu dochází k oddělení signálů IMCL a EMCL ve spektru. Je potřeba zdůraznit, že rozdílný chemický posun IMCL a EMCL složek není způsoben rozdílným chemickým složením EMCL a IMCL. Lokální variace magnetického pole není způsobena rozdílným stíněním elektronů v chemických vazbách, nýbrž je založena na lokálních rozdílech magnetické susceptibility, která je podmíněna typickou mikroskopickou strukturou svalové tkáně.

Každá látka, pokud je umístěna do magnetického pole, určitým způsobem s tímto magnetickým polem interaguje. Veličina magnetická susceptibilita (relativní susceptibilita) χ je fyzikální konstantou, která vyjadřuje, jakým způsobem látka reaguje na vnější magnetické pole.

Jednoduše můžeme zapsat změnu lokální magnetické indukce B_i jako funkci statické susceptibility χ_i a magnetické indukce magnetu B_0 takto:

$$B_i = (1 + \chi_i)B_0 \quad [3.14]$$

Lokální efektivní magnetická indukce B_i však není ovlivněna pouze chemickým složením látky, přítomné ve studovaném kompartmentu, ale též chemickým složením a prostorovým rozložením jeho okolí. Proto je zaveden složitější model, nazývaný *bulk magnetic susceptibility* (BMS), který tyto vlastnosti reflektuje (77). Tento model rozděluje magnetickou susceptibilitu na dvě složky: homogenní složku D a nehomogenní složku I . Veličina D závisí na magnetické susceptibilitě látky uvnitř kompartmentu χ_i , susceptibilitě látky, která se nachází v jeho okolí χ_e , dále závisí na tvaru stěny kompartmentu a její orientaci vůči hlavnímu magnetickému poli B_0 . Veličina I představuje nehomogenní komponentu BMS a závisí nejen na výše uvedených faktorech, ale i na prostorové lokalizaci studovaného jádra vůči stěnám kompartmentu a na B_0 . Výslednou magnetickou indukci B_i pak můžeme napsat jako

$$B_i = (1 + D_i)B_0 + I_i \quad [3.15]$$

Hodnoty D a I však jsou analyticky řešitelné pouze pro kompartmenty s velmi jednoduchým (symetrickým) tvarem a pouze pro určité orientace vůči B_0 . Ukázalo se, že pro modelování BMS efektu pro IMCL (lipidové kapénky s kulovitým tvarem) nejlépe vyhovuje model koule. Pro kouli bylo zjištěno, že platí přibližně

$$D = \frac{\chi_e}{3} \text{ a } I_i = 0, \quad [3.16]$$

kde χ_e je magnetická susceptibilita látky vně koule. V tomto případě χ_e odpovídá magnetické susceptibilitě vody χ_v , neboť lipidová kapénka je obklopena cytoplasmatickou tekutinou, obsahující převážně vodu. Proto můžeme psát závislost lokální magnetické indukce pro IMCL jako

$$B_{i,IMCL} = \left(1 + \frac{\chi_v}{3}\right) B_0. \quad [3.17]$$

χ_v , má hodnotu $-9,05 \cdot 10^{-6}$. Z rovnice je vidět, že chemický posun této rezonance nezávisí na orientaci vůči magnetickému poli. Též je vidět, že lokální magnetická indukce IMCL závisí pouze na susceptibilitě okolního solventu, tedy že na základě tohoto modelu je rezonanční frekvence IMCL shodná s frekvencí lipidů volně suspendovaných ve vodě.

Vlastnostem EMCL nejlépe vyhovuje model nekonečně dlouhého koaxiálního válce, tedy válce s určitou tloušťkou stěny. To přibližně odpovídá uložení EMCL v mezisvalových septech, kde tuková tkáň obklopuje cylindricky tvarované svalové snopce. (Typická cylindrická struktura svalové tkáně je znázorněna na obr. 3.8.) Hodnota lokální magnetické indukce pro EMCL v tomto případě závisí na orientaci cylindru vůči magnetickému poli a není jednoduše analyticky řešitelná pro každý úhel orientace. Pro anulární kompartment cylindru, který je uložen rovnoběžně s vektorem magnetické indukce, platí

$$D = \frac{\chi_3}{3}, \quad I = 0, \quad [3.18]$$

kde χ_3 označuje magnetickou susceptibilitu anulárního kompartmentu – v případě svalové tkáně to jsou lipidy v mezisvalových septech (EMCL). Výsledná magnetická indukce $B_{i,EMCL}$ je tedy dána vztahem

$$B_{i,EMCL} = \left(1 + \frac{\chi_l}{3}\right) B_0. \quad [3.19]$$

Hodnota lokální magnetické indukce je tedy shodná s hodnotou lokální indukce masy tukové tkáně, která není obklopena jiným kompartmentem. χ_l má hodnotu $-8,44 \cdot 10^{-6}$. V případě paralelní orientace vláken vůči magnetickému poli \mathbf{B}_0 tedy EMCL rezonují na

stejně frekvenci jako prostá tuková tkáň např. podkožního tuku. Tento model souhlasí s experimentálními výsledky.

Pro cylindr s orientací jinou než paralelní je situace výrazně komplikovanější. Pro kolmou orientaci cylindru platí pro EMCL přibližně

$$D = \frac{\chi_v}{2} - \frac{\chi_l}{6} \text{ a } I \approx \frac{\cos 2\theta}{r^2} \quad [3.20]$$

kde r je vzdálenost jádra od osy cylindru a θ je úhel orientace cylindru vůči magnetickému poli. Z těchto vztahů vyplývá, že maximální rozdíl v chemických posunech EMCL a IMCL je v případě paralelní orientace vláken a činí 0,21 ppm, což odpovídá experimentálním výsledkům. Dále z něj vyplývá, že v případě, že měřený voxel obsahuje směs vláken s různou orientací vůči magnetickému poli, má pík EMCL komplikovaný (obecně širší) tvar čáry.

3.5.7 Zpracování spekter – technika LCModel

LCModel je technika automatického zpracování spekter, původně publikována v (⁹⁰), nyní komerčně dostupná. Tato technika modeluje spektra jako lineární kombinaci signálů jednotlivých metabolitů, které lze ve tkáni očekávat. Tyto jednotlivé signály, tvořící takzvanou bázi, jsou předem získány naměřením roztoků metabolitů *in vitro*.

Technika LCModel je iterativní a pracuje ve více krocích. V první části proběhne tzv. *preliminary analysis*, kde je určeno počáteční nastavení fázové korekce, nastavení základní čáry (*baseline*) a tvaru spektrální čáry. Základní čára je aproximována spline funkcí. Optimalizace tvaru spektrální čáry modelového spektra probíhá konvolucí *in vitro* báze spekter s příslušnou funkcí, která nejlépe aproximuje tvar čar v *in vivo* spektru. Pro optimální funkčnost techniky je vyžadována řádově menší pološířka báze spekter v porovnání s vyhodnocovanými spektry *in vivo*. V druhé části pak probíhá iterativní proces fitování naměřených spekter lineární kombinací již upravených báze spekter. Na základě znalosti přesné koncentrace měřené sloučeniny *in vitro* a nastavení přístroje během měření (zejména zisku analogově-digitálního převodníku, objemu voxelu a napětí RF pulsů při excitaci) lze při zpracování spektra vypočítat koncentrace jednotlivých metabolitů.

Novou funkcí LCModelu od verze 6.0 je možnost přidání plně simulovaných píků do spektrální báze. Tyto signály jsou automaticky simulovány uvnitř LCModelu na základě informací o chemickém posunu a pološířce píku. Pro chemický posun a pološířku je nutno

zadat jak očekávanou hodnotu exp_fwhm , tak její směrodatnou odchylku SD_fwhm (tedy míru variability vstupního parametru v iteračním procesu). Pro stabilizaci analýzy a pro nastavení typu spektrální křivky je navíc nutno zadat minimální dovolenou hodnotu pološířky (min_fwhm). Jednotlivé spektrální komponenty jsou pak simulovány gaussovským tvarem křivky o pološířce rovnající se min_fwhm , která je pak exponenciálně (lorentzovsky) rozšířena na finální hodnotu v iteračním procesu.

LCModel patří mezi „*black box*“ fitovací rutiny, neboť neumožňuje zásah operátora do iteračního procesu. Možnosti ovlivnění fitovaných parametrů jsou minimální, v případě naměřených básových spekter prakticky nulové. Nicméně tento software je velmi dobře optimalizován pro použití na *in vivo* spektrech a je na našem pracovišti rutinně využíván pro zpracování 1H MR spekter mozku (⁹¹).

4 Experimentální část

V této části uvedeme tři ucelené studie kosterního svalu, které využívají technik magnetické rezonance. Tyto studie jsme provedli na našem pracovišti a jejich cílem bylo vytvořit a ověřit techniky objektivního hodnocení morfologického a metabolického stavu svalu pomocí dostupných technik magnetické rezonance. Výsledky studií byly publikovány v odborné literatuře a na kongresech.

4.1 Klasifikace T1 obrazů lýtkových svalů technikami analýzy textury

4.1.1 Cíl studie

Cílem této studie bylo navržení a praktické ověření analýzy textury (TA) pro klasifikaci MR obrazů lýtkových svalů u zdravých subjektů a subjektů s myopatickým onemocněním. Druhým cílem bylo porovnání výsledků klasifikace metodou TA s hodnocením stupně patologického postižení svalu, které provedl radiolog.

4.1.2 Metodika

4.1.2.1 MR vyšetření

MR vyšetření bylo provedeno na celotělovém MR tomografu Siemens Vision, pracujícím při magnetické indukci 1,5 T, s použitím standardní cirkulárně polarizované hlavové cívky. MR zobrazení lýtkových svalů bylo provedeno na noze, která byla více zasažena motorickým deficitem, v případě oboustranných obtíží bylo vyšetřeno pravé lýtko. Použili jsme standardní T1 váženou sekvenci spinového echa s následujícími parametry: TR/TE = 500/12 ms, 1 akvizice, tloušťka řezu 6 mm, transversální orientace, FOV = 200x200 mm, matice 256x256, vzdálenost mezi jednotlivými řezy 6 mm. Pro účely radiologického posouzení byly navíc naměřeny T2 vážené obrazy metodou turbo spinového echa s parametry TR/TE = 5400/99 ms, turbo faktor = 11, FOV = 200x200 mm, matice = 198x256. Pozice řezů a ostatní parametry zobrazování byly shodné s T1 váženou sekvencí. Výše uvedené parametry sekvencí byly zachovány pro všechny subjekty během celé studie.

4.1.2.2 Subjekty

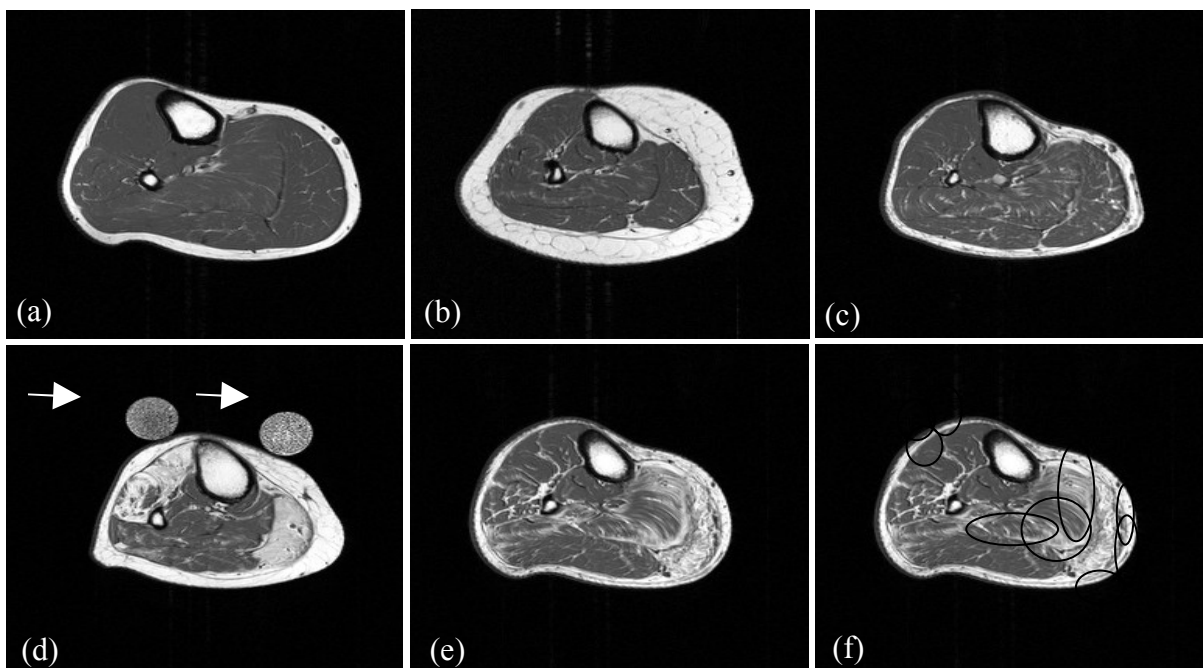
Celkově jsme vyšetřili 93 subjektů, které byly rozděleny do následujících skupin podle jejich klinického stavu:

1. Kontrolní skupina – ConC – 20 subjektů bez jakýchkoliv svalových obtíží a bez anamnestické zátěže jak osobní, tak rodinné; věk 33 ± 13 let.
2. Skupina zdravých potomků hypertonických rodičů – ConH – 7 subjektů bez svalových obtíží, pouze s rodinnou anamnézou hypertenze; věk 31 ± 3 let.
3. Diabetici bez známek syndromu diabetické nohy - DiaP – 5 subjektů; věk 58 ± 5 let.
4. Pacienti, indikováni k MR vyšetření z důvodů svalových obtíží různého původu – DifP – 61 subjektů; věk 38 ± 20 let.

MR snímky všech pacientů ze skupiny DifP nezávisle na sobě vyhodnotili 3 radiologové a rozřídili je podle stupně svalového postižení do čtyřech skupin:

DifP1 – MR obraz bez jakékoliv známky patologie; DifP2 – lehké patologické nebo nespecifické změny v MR obraze (např. pouze zesílení tloušťky podkožního tuku značící svalovou atrofii, mírné zmnožení mezisvalového tuku); DifP3 – MR obraz s jasnými známkami patologie (jasná atrofie svalů, zmnožení tukové tkáně ve svalech); DifP4 – těžké patologické změny se závažnou tukovou degenerací a pokročilým vymizením svalové hmoty na úkor tukové tkáně.

K hodnocení bylo použito T1 i T2 vážených obrazů, tři radiologové provedli vyšetření nezávisle na sobě bez znalostí klinických dat pacienta. Porovnání výsledků radiologické klasifikace ukázalo, že ve většině případů zařadili radiologové pacienta do stejné skupiny (v devíti případech došlo ke shodě nálezu pouze u dvou radiologů, v ostatních případech byl výsledek klasifikace shodný u všech tří radiologů). Tato radiologická klasifikace pak byla použita pro další statistické zpracování a porovnání s výsledky TA. Dva subjekty ze skupiny DifP4 jsme měřili dvakrát, vždy s přibližně ročním odstupem od prvního vyšetření (viz dále). Typické příklady MR obrazů rozdílných kategorií DifP jsou zobrazeny na obr. 4.1. Všechny subjekty byly informovány o cíli studie a protokolu vyšetření a daly informovaný souhlas. Protokol vyšetření byl schválen etickou komisí.



Obr. 4.1 Příklady T1 vážených transverzálních obrazů lýtkových svalů, které byly použity pro analýzu textury. Jednotlivé obrazy jsou vždy typickou ukázkou třídy svalového postižení, jak byly klasifikovány radiologem: **(a)** DifP1 - zdraví dobrovolníci a pacienti s normálním nálezem; **(b)** DifP2 - pacienti s mírnými patologickými nebo hraničně patologickými změnami; **(c)** DifP3 - pacienti s patologickým nálezem tukové degenerace; **(d)**, **(e)** DifP4 - pacienti s těžkým nálezem tukové degenerace a svalové dystrofie; **(f)** ukázka výběru jednotlivých ROI pro analýzu textury - vybrány byly vždy 3 ROI z *m. tibialis anterior*, *m. soleus* a *caput mediale muscui gastrocnemii*. Na obr. **(d)** jsou šipkou vyznačeny fantomy z polystyren agaru (PSAG), které sloužily jako referenční textura při kontrole stability MR tomografu během studie.

4.1.2.3 Texturní analýza dat

K výpočtu texturních příznaků jsme použili program MaZda⁽⁹²⁾. Tento program nám vypočetl 282 různých typů texturních příznaků: a) statistických příznaků 1. řádu, odvozených od obrazového histogramu; b) statistických příznaků 2. řádu odvozených od kookurenční matice, gradientní matice a *run-length* matice; c) příznaků odvozených z autoregresního modelu. Texturní příznaky byly vypočteny nezávisle ze tří typů svalů lýtky: *m. tibialis anterior* (MTA), *m. soleus* (MS) a *caput mediale m. gastrocnemii* (MG), a to následujícím způsobem. U každého subjektu byly vybrány 3 sousední řezy a v každém řezu byly pro každý ze tří typů svalů nakresleny tři překrývající se oblasti zájmu (*region of interest* – ROI), ze kterých byly vypočteny texturní příznaky. Pro každého pacienta jsme tedy získali texturní příznaky z 27 ROI, 9 ROI pro každý typ svalu. Průměrná velikost ROI všech subjektů byla 560 ± 230 pixelů. Abychom do výpočtu nezanесли systematickou chybu

danou malým počtem pixelů, snažili jsme se, aby velikost ROI byla minimálně 300 pixelů. Tento limit se nepodařilo splnit u některých dětských pacientů, kteří mají svaly malé.

Pro selekci texturních příznaků (*feature selection* – viz teoretický úvod) jsme zvolili techniku invariantních příznaků. Detailní popis této metodiky lze nalézt v (56). Za invariantní příznak jsme považovali texturní příznak s vysokou hodnotou reprodukovatelnosti v rámci kontrolní skupiny ConC. *Cut-off* hodnotu reprodukovatelnosti

jsme stanovili na 8%. Reprodukovanost r byla vypočtena jako $r = \frac{c}{\bar{x}}$, kde $c = 2a \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right)$

je interval spolehlivosti a \bar{x} je průměrná hodnota texturního příznaku v rámci celé skupiny ConC. Proměnná a je 99-tý kvantil standardizovaného normálního rozdělení, jehož hodnota pro hladinu významnosti $p = 0,01$ činí 2,58⁽⁹³⁾. Abychom vyloučili invariantní příznaky, které nenesou důležitou informaci ke klasifikaci obrazů, porovnali jsme hodnoty invariantních texturních příznaků u kontrol a u tří náhodně vybraných pacientů ze skupiny DifP4 s rozsáhlým svalovým postižením a velkými klinickými obtížemi. Pro zjištění míry vzájemné korelace mezi vybranými příznaky byla na příznacích provedena PCA s výpočtem grafu komponentních vah. Ze skupiny silně vzájemně korelujících příznaků byl vybrán pro konečnou klasifikaci vždy jen jeden zástupce skupiny.

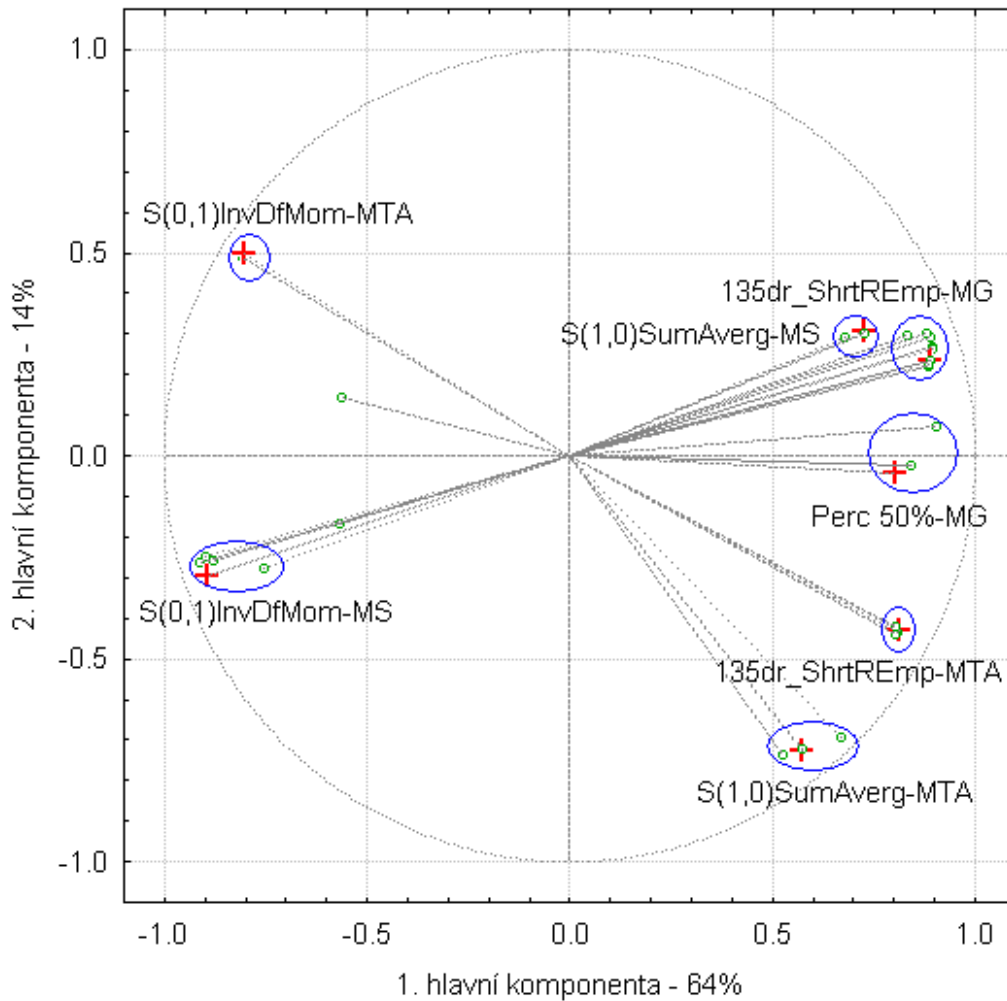
Klasifikaci subjektů na základě vybraných texturních příznaků jsme provedli pomocí techniky PCA s použitím programu Statistica⁽⁹⁴⁾. Pro účely klasifikace jsme použili průměrnou hodnotu texturních příznaků ze všech 9 ROI pro každý typ svalu. Abychom zajistili stabilitu měřících podmínek během celé doby, kdy bylo prováděno měření subjektů, měřili jsme spolu s pacientem 2 typy fantomů z polystyren–agaru (PSAG) (56) a na získaných obrazech jsme též provedli TA. Analýza PSAG fantomů neprokázala žádné významné změny v texturních příznacích během celého období měření.

4.1.3 Výsledky

4.1.3.1 Výběr texturních příznaků (*feature reduction*)

S pomocí programu MaZda jsme vypočetli sérii 282 texturních příznaků u všech subjektů. Vzhledem k velkému množství dat (93 subjektů, 27 ROI pro každý subjekt, 282 texturních příznaků pro každý ROI) jsme museli provést selekci texturních příznaků, tj. vybrat jen ty nejvýznamnější texturní příznaky, které nejlépe popisují rozdílnost v postižení svalu. Toto jsme provedli pomocí techniky invariantních příznaků. Na kontrolní skupině subjektů jsme našli příznaky s reprodukovatelností lepší než 8%. Z této

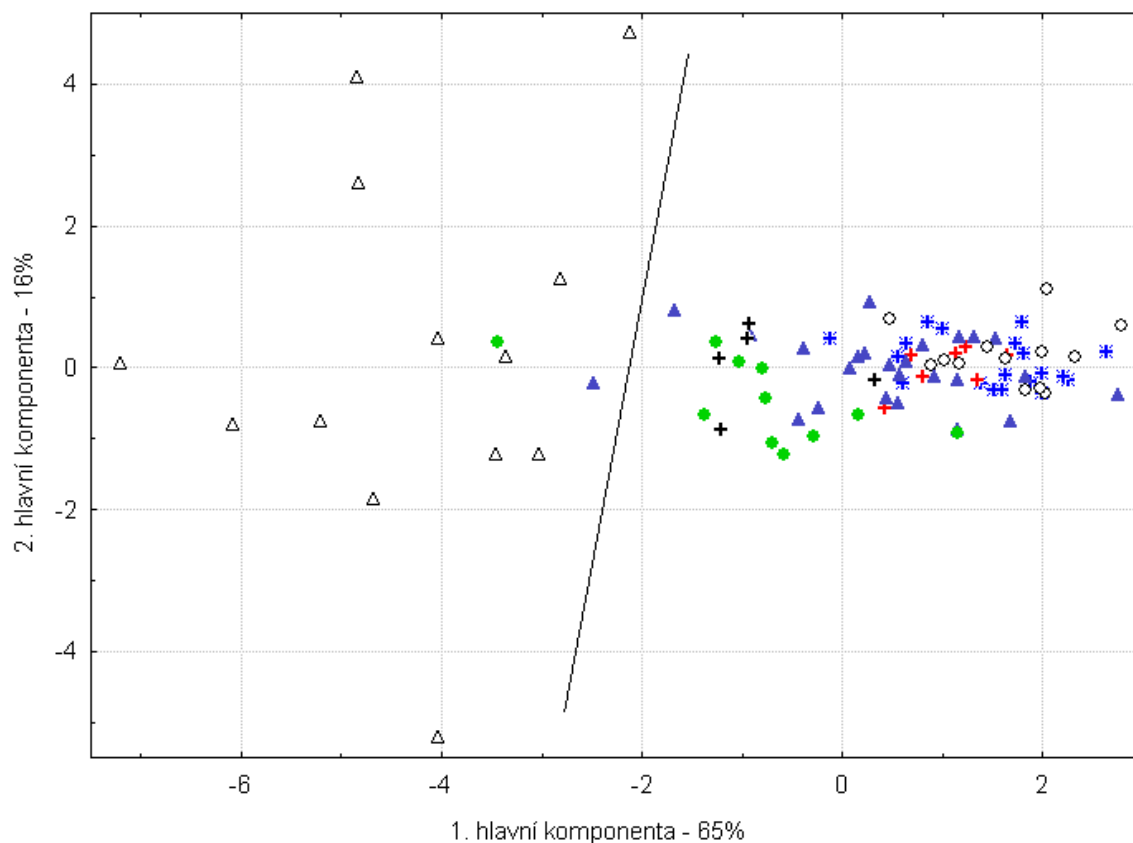
skupiny příznaků jsme pro další klasifikaci vybrali ty, u nichž byla zjištěna signifikantní odlišnost mezi skupinou ConC a vybranými pacienty z DifP4 skupiny. Toto porovnávání jsme prováděli pomocí Studentova t-testu pro každého ze tří vybraných pacientů z DifP4 skupiny zvlášť. Tímto způsobem jsme získali do užšího výběru 11 texturních příznaků pro 3 typy svalů, celkem tedy 33 příznaků. Průměrný rozdíl v hodnotách příznaků mezi kontrolami a DifP4 pacienty byl pro všechny tři typy svalů 41%, pro MTA 35%, pro MS 28% a pro MG 59%. Průměrná reprodukovatelnost texturních příznaků na jednotlivých vybraných DifP4 pacientech byla 9% s maximem 36%. Všechny vybrané texturní příznaky byly texturními příznaky statistickými. V posledním kroku selekce příznaků byla na všech 93 subjektech a 33 příznacích provedena PCA. Na obr. 4.2 je výsledný PCA graf komponentních vah – zátěží (*plot components weights*) ⁽⁹⁵⁾, který ukazuje, do jaké míry přispívají jednotlivé texturní příznaky do variability prvních dvou hlavních komponent. Je vidět, že texturní příznaky jsou uspořádány do sedmi skupin, v rámci kterých přinášejí podobnou informaci. Z každé skupiny jsme pak vybrali jen jeden příznak jako reprezentativní tak, abychom celkem měli alespoň dva příznaky pro každý typ svalu. Tímto postupem jsme nakonec získali následujících sedm příznaků, které pak byly použity ke klasifikaci subjektů: $S(0,1)InvDfMom$, $S(1,0)SumAverg$ a $45DrFraction$ z MTA; $S(0,1)InvDfMom$ a $S(1,0)SumAverg$ z MS; $Perc50\%$ a $135dgrShrtREmp$ z MG (vzorce pro výpočet příznaků a jejich vysvětlení viz příloha).



Obr. 4.2 Výsledek projekce 33 invariantních texturních příznaků (*feature projection*) pomocí analýzy hlavních komponent. Projekce je provedena do dvou prvních hlavních komponent. Je vidět, že se texturní příznaky seskupují přibližně do sedmi skupin. K reprezentativnímu popsání textury stačí vybrat z každé skupiny jeden příznak. MTA: *m. tibialis anterior*; MS: *m. soleus*; MG: *caput mediale musculi gastrocnemii*.

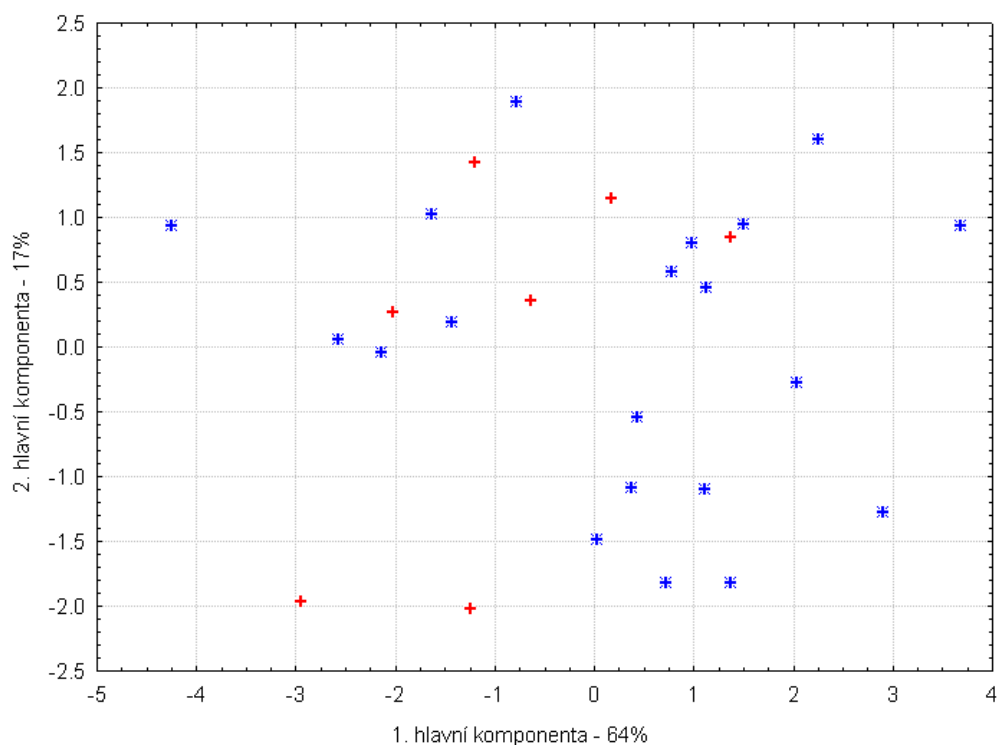
4.1.3.2 Klasifikace subjektů

Pro klasifikaci subjektů na základě vybraných sedmi příznaků jsme opět použili PCA, která nám umožňuje transformovat informaci ze sedmi texturních příznaků do menšího množství hlavních komponent. To umožňuje jednodušší vizualizaci texturní informace a klasifikaci subjektů na základě jejich umístění v grafu. Na obr. 4.3 vidíme rozptylový diagram komponentního skóre (*scatterplot*), tj. projekci dat subjektů do prvních dvou hlavních komponent spočtených ze sedmi vybraných reprezentativních texturních příznaků.

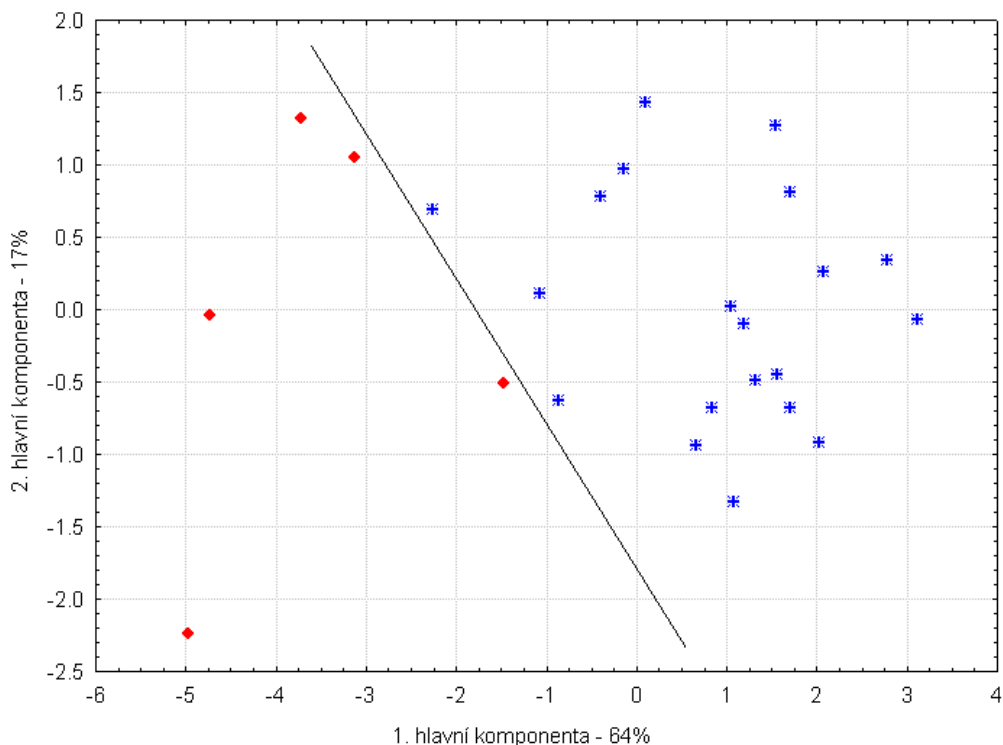


Obr. 4.3 Analýza hlavních komponent: rozptylový graf komponentního skóre pro všechny subjekty s užitím sedmi vybraných reprezentativních texturních příznaků. Subjekty jsou označeny symbolem podle příslušnosti do skupin: * ConC; + ConH; + DiaP; ○ DifP1; ▲ DifP2; ● DifP3; △ DifP4.

Z grafu můžeme hodnotit příbuznost subjektů podle textury, subjekty ležící blízko sebe v grafu mají podobné hodnoty hlavních komponent a tudíž podobnou texturu. Subjekty jsou označeny podle jejich rozdělení do skupin. Je vidět, že se subjekty geometricky zhruba rozlišují do dvou skupin, ale netvoří jednoznačné shluky, které by umožnily přesnější klasifikaci. Proto jsme provedli detailní PCA analýzu jednotlivých skupin subjektů samostatně. Výsledky jsou vyznačeny na obr. 4.4 a 4.5. Na obr. 4.4 je výsledek analýzy skupiny ConC a ConH. Je vidět, že mezi těmito skupinami není žádná separace – prvky se v grafu překrývají. Druhou analýzu jsme provedli na skupinách ConC a DiaP. Na obr. 4.5 je vidět jasná separace těchto skupin v PCA analýze. Provedený t-test prokázal, že tyto dvě skupiny jsou mezi sebou signifikantně odlišné na hladině významnosti $p < 0,001$ ve všech sedmi texturních příznacích.

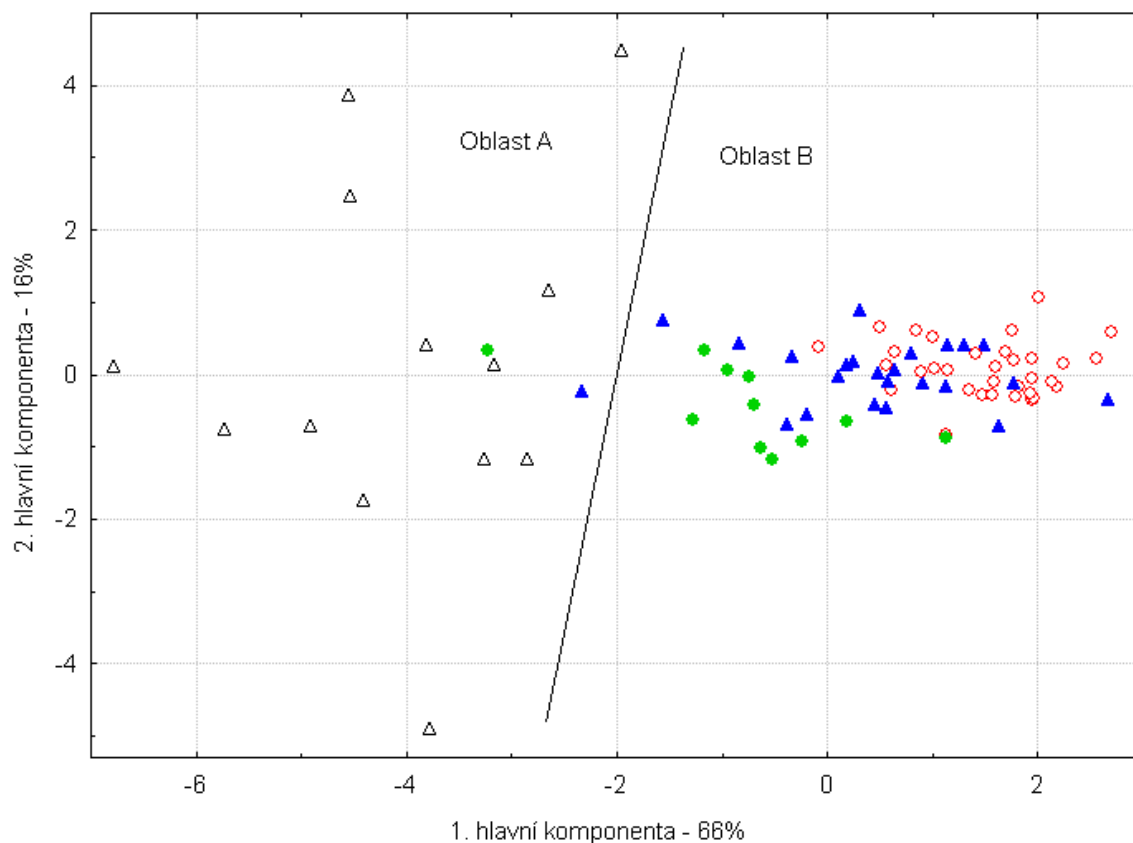


Obr. 4.4 Rozptylový graf komponentního skóre kontrolní skupiny (ConC) a hypertonické skupiny (ConH). Je vidět, že se subjekty prolínají, skupiny nelze od sebe oddělit. * ConC; + ConH.



Obr. 4.5 Rozptylový graf komponentního skóre kontrolní skupiny (ConC) a diabetické skupiny (DiaP). Je patrná rozdílnost textury mezi skupinami, lze je od sebe v grafu oddělit. * ConC; ♦ DiaP.

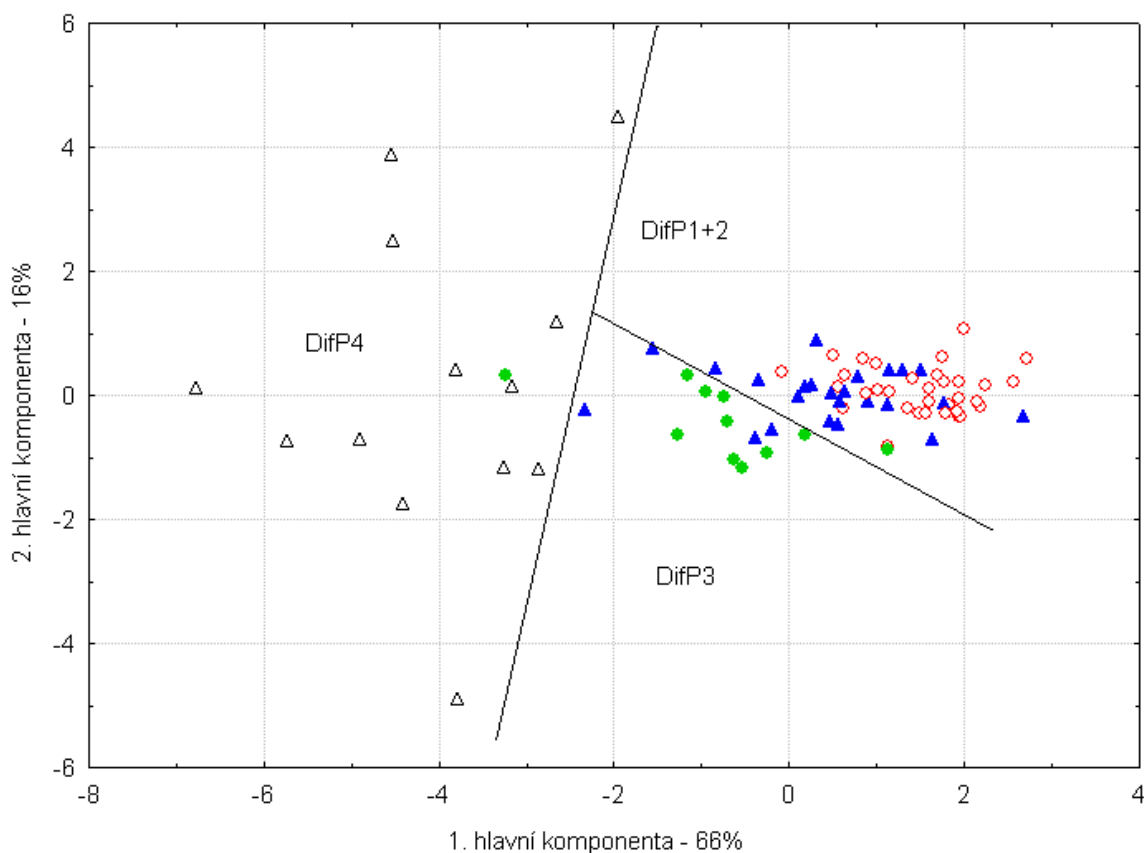
V třetí analýze jsme testovali korelaci radiologického hodnocení obrazu a texturní charakteristiky. Abychom získali větší množství dat k analýze, skupinu ConC jsme též vyhodnotili standardním radiologickým hodnocením a podle výsledku klasifikované subjekty přiřadili do DifP skupin: 19 zdravých kontrol připadlo do skupiny DifP1 a jedna kontrola byla přiřazena do skupiny DifP2. Výsledek této analýzy je vyznačen na obr. 4.6.



Obr. 4.6 Rozptylový graf komponentního skóre subjektů klasifikovaných radiologem. Je vidět, že se skupiny prolínají, data lze rozdělit pouze na oblast A (obsahující subjekty DifP4) a oblast B (obsahující subjekty DifP1-DifP3). ○ DifP1; ▲ DifP2; ● DifP3; △ DifP4.

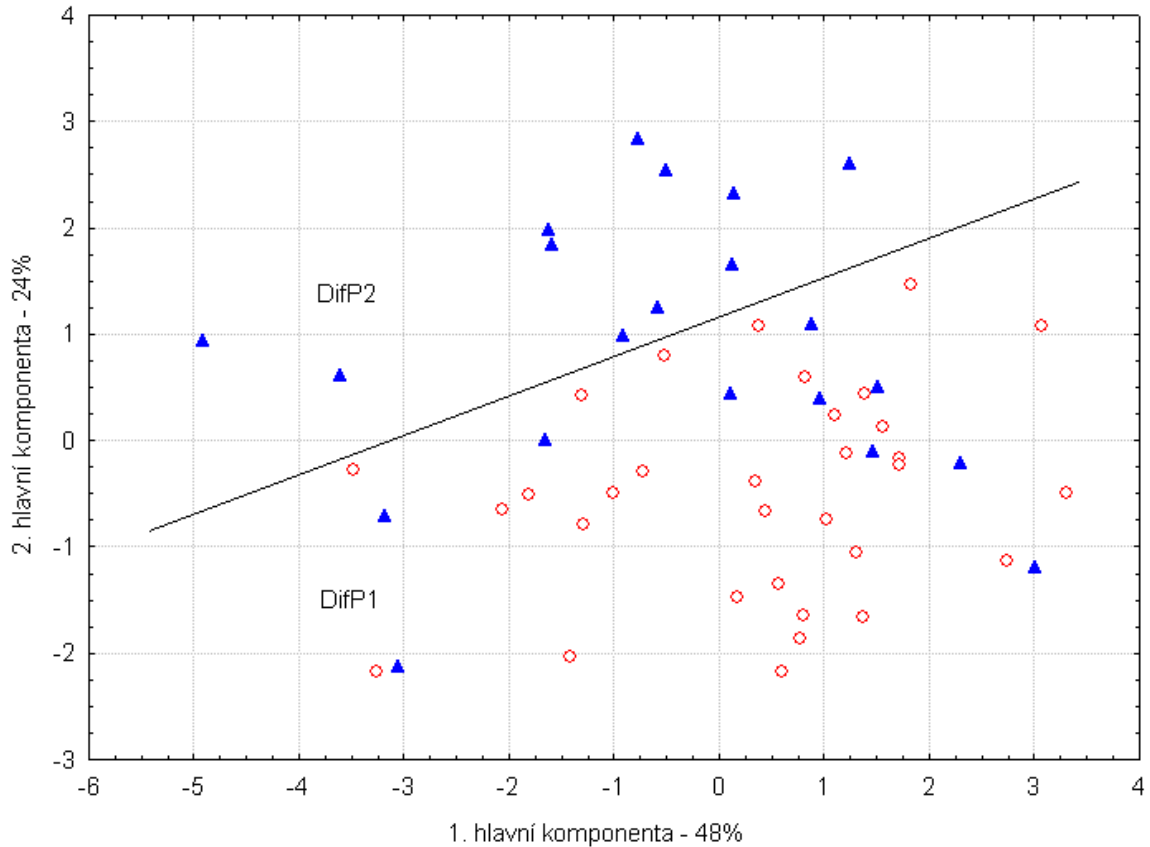
Je vidět, že pouze na základě umístění subjektů v grafu (bez použití informace o jejich klasifikaci do DifP skupin) je možno celou skupinu subjektů rozdělit pouze do dvou oblastí, které jsou označeny A a B. Oblast A obsahuje pacienty zařazené do DifP4 skupiny a v oblasti B jsou pacienti ze skupin DifP1-DifP3. Podrobnější seskupování subjektů pouze na základě jejich umístění v grafu nelze provést. Proto jsme použili informaci o radiologické klasifikaci subjektů a vytvořili jsme hranice mezi skupinami DifP tak, aby byla chyba klasifikace subjektů co nejmenší. Grafickou hranicí byla vždy přímka nebo polopřímka. Chybu klasifikace jsme stanovili jako procentuální podíl chybně

klasifikovaných subjektů vůči celkovému počtu subjektů v ohraničené oblasti. Výsledek je zobrazen na obr. 4.7.



Obr. 4.7 Rozptylový graf komponentního skóre s naznačenou hranicí mezi skupinami DifP1+2 a DifP3. Tato hranice byla stanovena proložení polopřímky na základě příslušnosti jednotlivých subjektů do skupin tak, aby počet subjektů nacházejících se v nesprávném výseku grafu byl co nejnižší. Hranice mezi skupinami DifP1 a DifP2 nemohla být vytvořena díky výraznému překryvu mezi skupinami. ○ DifP1; ▲ DifP2; ● DifP3; △ DifP4.

V oblasti DifP4 se nachází 13 subjektů DifP4 a jeden subjekt z DifP3 skupiny (chyba klasifikace 7%). Oblast DifP3 obsahuje 9 subjektů ze skupiny DifP3 a 4 subjekty ze skupiny DifP2 (chyba klasifikace 30%). Vzhledem k velkému počtu zbývajících subjektů a velkému překryvu jsme provedli samostatnou analýzu hlavních komponent subjektů umístěných v oblasti DifP1+DifP2 (obr. 4.8). Oblast DifP2 obsahuje 11 subjektů ze skupiny DifP2 a neobsahuje žádný chybně klasifikovaný subjekt (chyba klasifikace 0%). V oblasti DifP1 se nachází 32 subjektů DifP1, 10 subjektů DifP2 a jeden subjekt DifP3 (chyba klasifikace 26%). Celkově bylo dosaženo shody mezi radiologickou klasifikací a rozdělením subjektů na základě techniky PCA v 80% případech.



Obr. 4.8 Samostatná PCA analýza skupiny DifP1 a DifP2. Velký překryv mezi těmito skupinami způsobuje vysokou klasifikační chybu. ○ DifP1; ▲ DifP2.

4.1.4 Diskuze

Jedním z cílů této studie bylo zjistit, jestli existují nějaké texturní příznaky, které korelují s radiologickým hodnocením, a zda lze analýzu textury použít ke klasifikaci MR obrazů lýtky. Prokázali jsme, že s použitím výše uvedené metodiky selekce texturních příznaků a klasifikace pomocí PCA lze klasifikovat svaly s výsledkem korelujícím s radiologickým hodnocením (obr. 4.7, 4.8). Celková shoda klasifikace pomocí TA a radiologické klasifikace je na skupině 93 subjektů 80%. Tento výsledek je lepší než výsledek podobné studie provedené autory Herlidou *et al.* (35), jimiž zjištěná shoda těchto dvou metod byla přibližně 56%. V uvedené studii však měl radiolog k dispozici pouze výřez ze svalové tkáně, neviděl celý řez lýtkem včetně podkožního tuku. Bylo zjištěno, že podstatným faktorem v radiologickém hodnocení je celkový vzhled obrázku, množství podkožního tuku, orientace svalových sept, poměr objemů jednotlivých svalů atd. Poměrně velká variabilita v hodnocení obrazů mezi jednotlivými radiology, pozorovaná ve výše zmíněné studii, je dle našeho názoru způsobena především absencí možnosti posoudit obraz obvyklým způsobem.

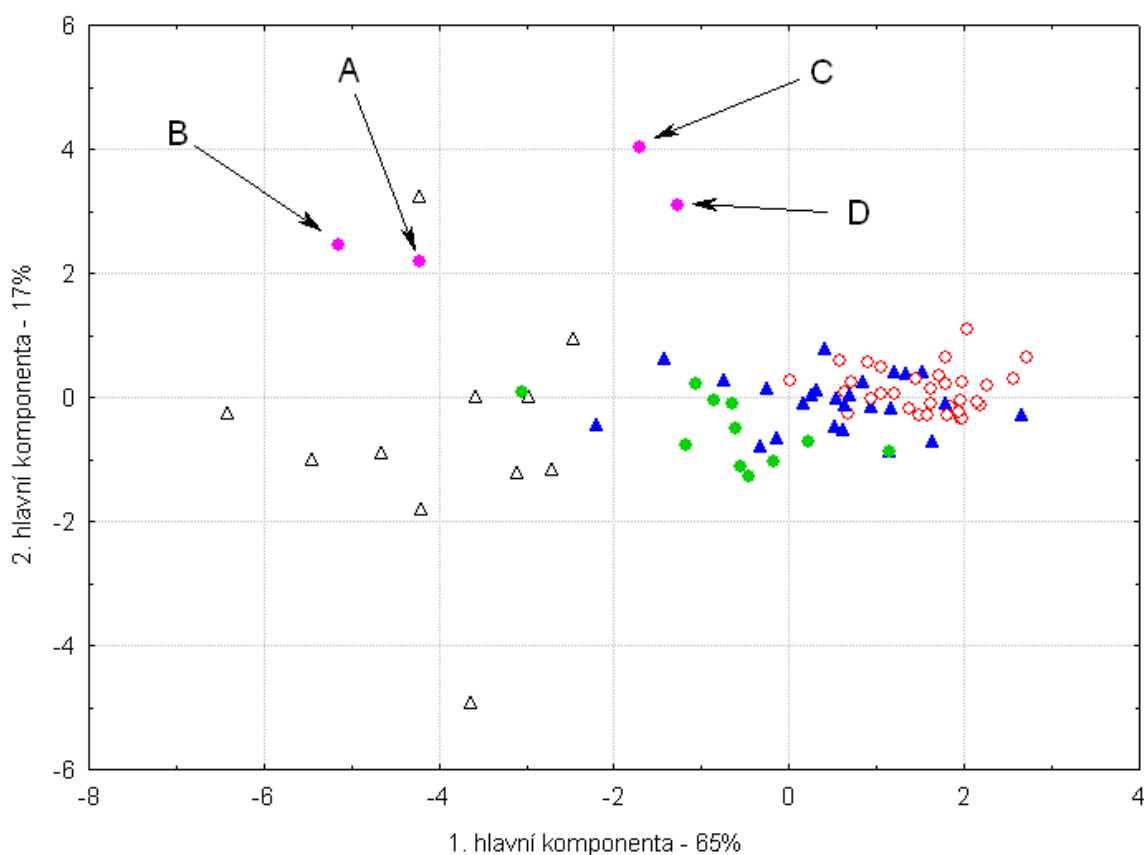
Skupina pacientů klasifikovaných radiologem jako DifP1 byla v analýze textury umístěna do oblasti zdravých kontrol (obr. 4.6). Tento výsledek ukazuje, že jak radiologicky, tak pomocí TA nejsou v MR obrazech žádné známky patologie. To je i v souladu s předchozí MR spektroskopickou studií (⁹⁶), kde bylo zjištěno, že někteří pacienti se subjektivními obtížemi svalových bolestí a poruchami svalové funkce nemusí mít signifikantní změny v ³¹P MR spektrech v porovnání se zdravými kontrolami.

Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v texturní charakteristice mezi skupinou kontrol (ConC) a diabetickými pacienty (DifP, viz obr. 4.5). Tento výsledek je v souladu s již dříve zjištěnými patologickými změnami v MR obrazech u pacientů s diabetickou neuropatií dolních končetin (^{97, 98, 99}). Nicméně vzhledem k tomu, že skupina diabetiků se od skupiny kontrol významně lišila ve věku subjektů, nelze vyloučit, že pozorované změny spíše souvisejí s fyziologickými změnami svalu a mezisvalové tukové tkáně u starších osob s nižší svalovou aktivitou.

Mezi kvantitativní parametry používané v oboru magnetické rezonance, charakterizující vlastnosti tkání, patří T1, T2 relaxační časy, difúzní koeficient, atd. Ke kvantitativnímu popisu vlastností tkáně však lze užít i některých texturních příznaků. Abychom ověřili možnost využití texturních příznaků k dlouhodobému sledování pacientů, vyhodnotili jsme 2 pacienty, kteří byli vyšetřeni dvakrát přibližně s odstupem jednoho roku. První pacient trpěl facioskapuloperoneálním typem myopatie a byl znovu vyšetřen po absolvování terapie karnitinem. Na základě texturní analýzy bylo vidět, že se pacient po jednom roce nachází dále od kontrolních dat než při předchozím vyšetření (obr. 4.9), což ukazuje větší deviaci texturní charakteristiky jeho svalů. Tento výsledek je v souladu s radiologickým hodnocením, které stanovilo progresi tukové degenerace svalů. V naší analýze jsme pozorovali největší změnu v těchto texturních příznacích: v MTA to byl příznak $S(1,0)SumAverg$ (změna 20%); v MS $S(0,1)InvDfMom$ (změna 20%) a v MG $Perc50\%$ (změna 11%).

V případě druhého pacienta, který trpěl dystrofií, analýza textury T1 obrazu prokázala přiblížení texturní charakteristiky kontrolním hodnotám. V tomto případě však nedošlo ke shodě s radiologickým hodnocením, radiologický závěr byla progresse onemocnění. Tento radiologický závěr však byl proveden na základě inspekce T2 vážených obrazů, v T1 vážených obrazech nebyla pozorována žádná změna. Tento výsledek ukazuje, že k získání komplexnější informace o svalovém postižení by bylo vhodné provádět texturní analýzu jak z T1, tak i z T2 vážených obrazů, neboť v tomto

případě se pravděpodobná progresse onemocnění projevila pouze změnou T2 váženého obrazu.



Obr. 4.9 Ukázka sledování časového vývoje textury svalu (opakovaně měření pacienti ze skupiny DifP4). A: první měření pacienta č. 1; B: kontrolní měření po jednom roce; C: první měření pacienta č. 2; D: kontrolní měření po jednom roce; ○ DifP1; ▲ DifP2; ● DifP3; △ DifP4; ● opakovaně vyšetření pacienti.

4.1.5 Závěr

Výsledky této studie prokazují dobrou korelaci TA a radiologického hodnocení MR obrazů. Ověřili jsme, že vícerozměrné statistické techniky (PCA) umožňují využít komplexní texturní informaci k hodnocení stupně patologického postižení svalů. Prokázali jsme, že analýzu textury ve spojení s PCA lze úspěšně použít ke klasifikaci patologického postižení lýtkových svalů.

4.2 Kvantifikace intramyocelulárních lipidů z MR spekter měřených při 1,5 T a 3 T a vyhodnocených pomocí techniky LCModel

4.2.1 Úvod

Protonová spektroskopie se v posledních letech začala využívat k vyšetřování metabolismu kosterního svalu, a to zejména díky možnosti studia intramyocelulárních lipidů (IMCL). První studií, kde byly kompletně identifikovány signály lipidové části protonového spektra, byla práce autorů Schick *et al.* (72). Od té doby byla provedena řada metodických a klinických studií, které prokázaly souvislost mezi hladinami IMCL a úrovní insulinové senzitivity (83,¹⁰⁰,¹⁰¹). V těchto studiích byla pro měření spekter v naprosté většině případů použita technika krátkého TE (10-50 ms) a pro kvantifikaci IMCL byl použit signál CH₂ skupiny rezonující na chemickém posunu přibližně 1,5 ppm. Intenzita signálu IMCL byla většinou vztažena k intenzitě píku kreatinu jakožto interního standardu.

Nevýhodou techniky krátkého TE je však přítomnost rezonancí s velkou pološířkou, které pocházejí z lipidových složek s krátkým relaxačním časem T₂. Takovéto spektrum pak obsahuje velké množství navzájem se překrývajících rezonancí s nejasným tvarem čáry a neumožňuje přesnou nezávislou kvantifikaci hlavních lipidových složek. Tyto široké signály jsou přítomny ve spektru především v oblasti 2,1 ppm, ale též v oblasti 0,8-1,0 ppm.

První technika využívající automatické zpracování protonových spekter svalu a vyhodnocení koncentrací EMCL a IMCL byla publikována autory Boesch *et al.* (76). V této studii bylo použito fitovací techniky TDFDFIT (¹⁰²) (*time domain, frequency domain fitting*). Tato technika analyzuje signál ve dvou krocích. V časové doméně jsou vypočteny základní parametry fitované křivky. Tyto parametry jsou pak použity jako počáteční podmínky při fitování spektra ve frekvenční doméně. Pro získání čistých modelových spekter IMCL a EMCL byla použita technika diferenčních spekter: Byla naměřena skupina spekter s různým zastoupením EMCL a IMCL, po správném naškálování byla spektra od sebe navzájem odečtena, a tak byla získána spektra čistých EMCL a IMCL. Ve výše uvedené studii byla prakticky ověřena závislost chemického posunu EMCL na orientaci svalových vláken vůči magnetickému poli a podáno objasnění tohoto jevu na základě BMS efektu. K měření spekter byla použita sekvence s krátkým TE (20 ms), získaná spektra tedy obsahovala široké signály z oblasti 1,5-2,5 ppm. Signály CH₂ a CH₃ skupiny nebyly ve spektrech dostatečně odděleny, proto nebylo možno fitovat CH₂ a

CH₃ skupiny lipidů nezávisle – v technice použité ve výše uvedené studii je poměr CH₂ a CH₃ skupin lipidů při fitování fixně stanoven.

Nová verze 6.1 analytického softwaru LCModel⁽¹⁰³⁾ poskytuje plně simulovanou bázi modelových spekter pro kvantifikaci IMCL a EMCL, pomocí které je možno nezávisle vyhodnocovat CH₂ a CH₃ skupiny. Tato modelová báze spekter byla optimalizována pro zpracování spekter naměřených pomocí krátkého TE. Chyba vyhodnocení CH₃ koncentrací je u těchto spekter vysoká díky velkému překryvu píků, tuto skutečnost zmiňuje i autor softwaru v jeho manuálu. Dosud jediné použití LCModelu ke kvantifikaci IMCL bylo publikováno autory Torriani *et al.*⁽¹⁰⁴⁾, kde byla studována reprodukovatelnost kvantifikace IMCL při vyhodnocení softwarem LCModel a jMRUI⁽¹⁰⁵⁾. Vzhledem k použití krátkého TE (25 ms) bylo ke kvantifikaci a stanovení reprodukovatelnosti užito pouze CH₂ signálů.

Již ve studii (72) bylo zjištěno, že lepšího oddělení CH₂ a CH₃ složek lipidů ve spektru lze dosáhnout při použití dlouhého TE. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena tím, že CH₂ komponenty IMCL a EMCL se skládají z více složek s rozdílnými T₂ relaxačními časy. Lepší oddělení jednotlivých složek se dosáhne při delším TE, neboť složky s kratším T₂ a větší pološířkou jsou při dlouhém TE již relaxovány a nepřispívají do signálu. Ačkoliv autoři Misra *et al.* a Jagannathan *et al.*^(106, 107) ve svých studiích též zmínili, že lepšího oddělení lipidových píků lze dosáhnout použitím dlouhého TE, dle našich poznatků zatím nebyla provedena žádná studie, která by přímo kvantifikovala CH₂ a CH₃ komponenty lipidů nezávisle.

Autoři Szczepaniak *et al.* (62) se zabývají problematikou vlivu složení lipidových řetězců na přesnost kvantifikace IMCL. Konstatují, že velikost CH₂ signálu lipidů je ovlivněna délkou řetězce a počtem dvojných vazeb, a proto přesnější technikou stanovení koncentrace IMCL je kvantifikace pomocí CH₃ signálů. Autoři však uzavírají, že na běžně dostupných přístrojích s magnetickou indukcí 1,5 T není možno provést nezávislou a samostatnou kvantifikaci CH₃ signálů IMCL.

Jednou z možností, jak zlepšit kvalitu spektra, je měření při vyšších hodnotách magnetické indukce B_0 . Tyto techniky umožní získat spektrum s vyšším poměrem signál/šum a s lepším oddělením spektrálních píků (zejména IMCL a EMCL) díky většímu rozdílu v chemických posunech. Nevýhodou technik vyššího B_0 je zvýšení lokální nehomogenity pole, což vede ke zkrácení T₂* relaxačního času. Navíc dochází i ke zkrácení T₂ a prodloužení T₁ relaxačního času. Důsledkem těchto jevů je rozšíření píků ve spektru a též saturace signálu, která si vynucuje prodloužení TR při měření. Z těchto

důvodů je nutné prokázat, jaký je skutečný přínos vyšších B_0 na kvalitu spekter a přesnost měření EMCL a IMCL.

Naše studie se zabývá možností uplatnění techniky dlouhého TE k lepšímu oddělení lipidových složek ve spektru a možností použití techniky LCModel k nezávislé kvantifikaci CH_2 a CH_3 signálů IMCL. Provedli jsme porovnání různých spektrálních bází pro zpracování dat technikou LCModel. Dále jsme ověřili opakovatelnost stanovení IMCL touto metodikou. Porovnali jsme přesnost výsledků a kvalitu spekter naměřených za podmínek magnetické indukce 1,5 T a 3 T.

4.2.2 Metodika

Celý experiment se skládal ze dvou nezávislých protokolů měření na přístrojích s magnetickou indukcí 1,5 T a 3 T, které budou popsány samostatně.

4.2.2.1 Měření na 1,5 T tomografu

Celkově jsme na 1,5 T tomografu měřili 26 subjektů (10 zdravých kontrol a 16 pacientů s diabetem). U všech subjektů byla stanovena míra nadváhy (*body mass index* – BMI) jakožto důležitý parametr figurující v kvantifikaci lipidů a insulinové senzitivity. Tento parametr je vypočten jako

$$\text{BMI} = \text{Váha}/(\text{výška v metrech})^2 \quad [4.1]$$

Subjekty s nedostatečnou separací EMCL/IMCL signálů ve spektru byly vyřazeny z další studie. Špatná kvalita spekter byla způsobena nejčastěji masivní převahou EMCL signálu ve spektru, což způsobilo překryv signálu IMCL a nemožnost jeho fitování. Tato situace bývá nejčastěji pozorována při obezitě nebo v počátečních stádiích tukové degenerace svalu. V těchto situacích jsme se pokoušeli zmenšit objem VOI, abychom se efektivněji vyhnuli svalovým septům, která obsahují tukovou tkáň, nicméně v některých případech ani toto opatření nevedlo k uspokojivému snížení EMCL signálu, případně došlo k neúnosnému snížení poměru signál/šum.

Kvalitní data se nám podařilo získat u 8 zdravých dobrovolníků ve věku 32 ± 8 let (BMI $25,0 \pm 1,7 \text{ kg/m}^2$) a u 11 pacientů s diabetem mellitem 2. typu (věk 52 ± 6 let, BMI $30,9 \pm 2,3 \text{ kg/m}^2$). Ve skupině diabetických pacientů byl jeden léčen dietou, 7 pacientů bralo perorální antidiabetika (PAD) a tři z pacientů brali pravidelně insulin. Průměrné trvání diabetu bylo 12 ± 7 let. U zdravých dobrovolníků byla normální gluková tolerance potvrzena orálním glukosovým tolerančním testem. U všech zdravých dobrovolníků

a u 5 diabetických pacientů byla přímo naměřena insulinová senzitivita pomocí euglykemického (5 mmol/l) hyperinsulinemického clampu, který trval 5 hodin a byl proveden pomocí metodiky, popsané v publikaci autorů DeFronzo *et al.* (¹⁰⁸). Účinek insulinu (insulinová senzitivita) byl hodnocen dle dvou parametrů: spotřeba glukosy během hyperinsulinového euglykemického clampu (parametr M) a metabolická clearance glukosy (parametr MCR). Všechna MR měření byla provedena na lačno. Všichni dobrovolníci a pacienti byli seznámeni s účelem a postupem vyšetření a dali s experimentem písemný informovaný souhlas. Celý protokol byl schválen etickou komisí.

Měření jsme provedli na klinickém MR přístroji Siemens Magnetom Vision, pracujícím při magnetické indukci $B_0 = 1,5$ T. Měření protonovou spektroskopií byla provedena z pravého lýtka ze svalu *m. tibialis anterior*. K měření byla použita standardní cirkulárně polarizovaná hlavová cívka. K správnému oddělení IMCL a EMCL ve spektru je důležité, aby svalová vlákna byla orientována paralelně ke směru magnetické indukce. Paralelní uspořádání vláken bylo ověřeno na úvodním obrázku (scoutu) a v případě nevyhovující orientace bylo provedeno nové umístění lýtka pacienta v přístroji tak, aby bylo dosaženo co nejpresnější paralelní orientace. K přesné lokalizaci místa měření spekter byly nejprve naměřeny T1 vážené obrazy v transverzální orientaci napříč lýtkem. Měření jsme provedli s následujícími parametry měřící sekvence: TR/TE = 500/12 ms, 1 akvizice, FOV 200 mm, matice 256x256, tloušťka řezu 6 mm.

Voxel spektroskopického měření byl umístěn do *m. tibialis anterior* tak, aby obsahoval co nejméně tukových sept a cév. Zároveň byl umístěn v dostatečné vzdálenosti od podkožního tuku. Toto opatření má za cíl snížit obsah EMCL ve voxelu na minimum, neboť tyto lipidy mají řádově vyšší koncentrace a tudíž jejich kontaminace ve spektru může způsobit překrytí signálů IMCL a znemožnit přesnou kvantifikaci. Nastavení lokální homogenity pole B_0 pomocí technik globálního a lokálního shimu (¹⁰⁹) bylo provedeno automatickou technikou dodanou výrobcem přístroje. Pološířka nepotlačeného signálu vody, indikující kvalitu homogenity pole, se pohybovala kolem hodnoty 12 Hz. Pro naměření lokalizovaných protonových spekter z vybrané oblasti jsme použili lokalizační techniku PRESS (¹¹⁰) s následujícími parametry měření: TR/TE = 2000/270 ms, spektrální šířka pásma 1000 Hz. Potlačení signálu vody jsme provedli jedním chemicky selektivním (*chemical shift selective* - CHESS) pulsem, který byl nastaven na frekvenci vody. Ve většině případů jsme nejprve naměřili orientační spektrum s menším množstvím akvizic, abychom se přesvědčili o kvalitě naměřeného spektra, tj. o kvalitě separace EMCL a IMCL signálů. Podle výsledku orientačního spektra byla optimalizována velikost voxelu,

případně provedena nová lokalizace a opakovaný shim. Objem voxelu se pohyboval v rozmezí 2,9-12,0 ml. Finální spektra jsme většinou měřili s 256 akvizicemi (což odpovídá akvizičnímu času přibližně 8 minut), v několika případech, kdy byla velikost voxelu menší, bylo použito 384 akvizic (12 minut) kvůli kompenzaci poměru signál/šum. U velmi kvalitních spekter (malé množství EMCL, které dovolilo měřit z velkého objemu) bylo 128 akvizic (4 minuty) dostačující.

Pro vyhodnocení opakovatelnosti měření jsme u 7 subjektů provedli v jednom sezení 3 následná opakovaná měření se stejnými parametry měřící sekvence, shimu a stejnou lokalizací voxelu (bez vytažení subjektu z magnetu). Opakované měření jsme prováděli bez vytažení pacienta z magnetu. Celkové trvání protokolu (včetně opakovaných měření pro reprodukovatelnost) bylo přibližně 50 minut. bychom porovnali výsledky měření a vyhodnocení za podmínek dlouhého a krátkého TE, naměřili jsme 4 subjekty též krátkým TE pomocí lokalizační techniky STEAM. Parametry měření byly následující: TR/TE/TM = 2000/10/15 ms, 128 nebo 256 akvizic, objem voxelu 3,4-6,8 ml. Potlačení vody jsme docílili aplikací 3 následných CHES pulzů s pološířkou 60Hz.

4.2.2.2 Měření na 3 T tomografu

V této části studie jsme naměřili 6 zdravých dobrovolníků ve věku 30±5 let. Tito dobrovolníci nepodstoupili žádná laboratorní vyšetření, protože výsledky sloužily pouze k porovnání kvality spekter naměřených při 1,5 T a 3 T, ne k porovnání intenzit intramyocelulárních lipidů u insulin-senzitivních a insulin-rezistentních subjektů. Měření jsme provedli na spolupracujícím pracovišti Experimentálního MR centrálního nervového systému univerzity Tuebingen na klinickém MR přístroji Siemens Magnetom Trio, který pracuje při magnetické indukci 3 T. Měření byla provedena ve speciální končetinové cívice designu ptačí klece (*birdcage*). Parametry spektroskopické lokalizované single voxel PRESS sekvence byly nastaveny tak, aby byly co nejvíce podobné parametrům použitým na 1,5 T tomografu. Jediný parametr, který jsme museli změnit, byla spektrální šířka pásma – byla zvýšena na 1200 Hz, aby díky lepšímu spektrálnímu rozlišení při 3 T nepřesáhly signály okraj spektra. Nastavení homogenity pole bylo provedeno automaticky s použitím komerčně dostupného protokolu, založeného na mapování homogenity pole. Objem měřeného voxelu byl mezi 5,1-12,6 ml. U všech subjektů jsme provedli měření třikrát za sebou (bez vytažení subjektu z magnetu) pro určení opakovatelnosti. Pro porovnání spekter měřených krátkým a dlouhým TE na 3 T jsme navíc u 3 subjektů naměřili spektra technikou PRESS s TR/TE = 2000/30 ms, 64 akvizic.

Celkové trvání měřicího protokolu bylo přibližně 40 minut. Subjekty byly informovány o účelu a principu vyšetření a podepsaly informovaný souhlas.

4.2.2.3 Vyhodnocení spekter

Pro vyhodnocení spekter naměřených metodou dlouhého TE jsme použili techniku LCModel s dvěma typy bází:

1. Technika LCModel verze 6.1 s komerčně dostupnouází *muscle-1*.

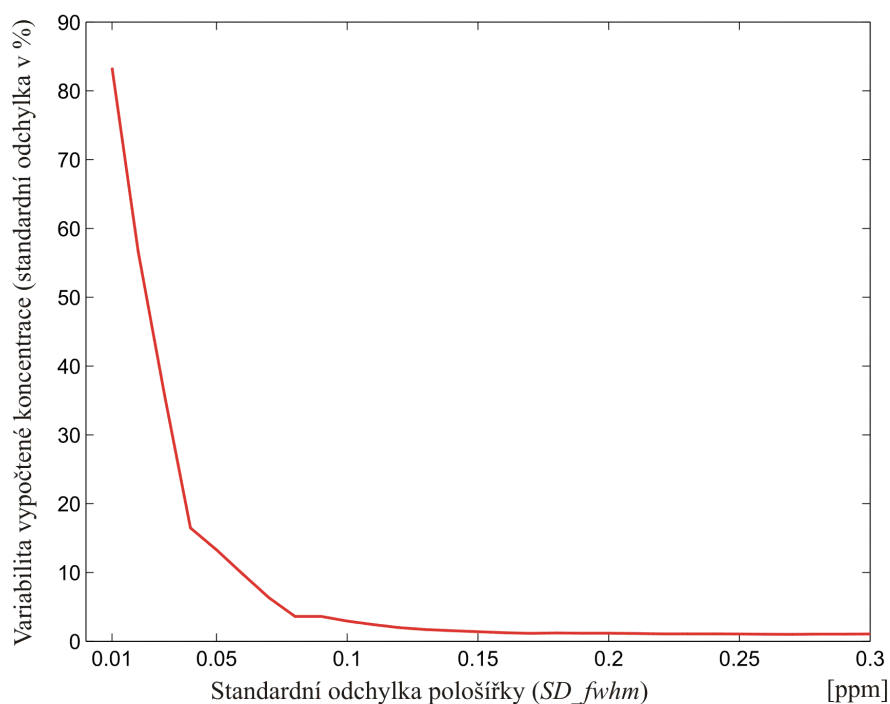
Tato báze byla vyvinuta autorem softwaru a optimalizována pro použití na spektrech naměřených krátkým TE. Je tvořena plně simulovanými píky. Vzhledem k variabilnímu tvaru spektrální čáry lipidů při krátkém TE je fitování CH₂ píků EMCL a IMCL provedeno vždy směsí 4 píků. Nastavení parametrů fitu bylo též výrobcem optimalizováno pro použití na svalových spektrech, avšak detailní informace, jaká konkrétní nastavení byla provedena, nebyla výrobcem poskytnuta. Tuto bázi jsme ve spolupráci s autorem softwaru mírně upravili pro použití na spektrech naměřených dlouhým TE tak, že byl přidán do báze dodatečný úzký pík nacházející se na 2,1 ppm (tento pík bude podrobněji diskutován níže).

2. Vytvořili jsme vlastní (*home-made*) bázi pro vyhodnocení spekter.

Tato báze byla vytvořena jako směs *in vitro* naměřených píků cholinu a kreatinu a simulovaných píků EMCL_CH₂, IMCL_CH₂, EMCL_CH₃ a IMCL_CH₃. Podle instrukcí v manuálu k softwaru LCModel (103) jsme namíchali roztoky sloučenin cholinu a kreatinu, spolu s markery TSPS (kyselina 3-(trimethylsilyl)-1-propan-sulfonová) a kyselinou mravenčí. Signály těchto markerů slouží jednak jako reference pro určení pozice 0 ppm ve spektru, dále slouží k automatické fázové korekci bázevého spektra a konečně jsou užity pro škálování koncentrací mezi jednotlivými bázevémi spektremi. Pro dlouhodobou stabilitu fantomu jako prevence biologické degradace roztoku bylo přidáno malé množství NaN₃. Z technických důvodů byl při 3 T měřen pouze roztok kreatinu. Signály lipidů byly plně simulovány LCModelem. Chemické posuny δ jednotlivých lipidových píků byly nastaveny podle publikace (76) následovně: EMCL_CH₂ – 1,49 ppm; IMCL_CH₂ – 1,28 ppm; EMCL_CH₃ – 1,07 ppm; IMCL_CH₃ – 0,885 ppm. I když jsme použili k měření dlouhého TE, spektra stále obsahovala nyní již málo intenzivní, ale přesto patrné komponenty s krátkým T₂ relaxačním časem. Objevily se při 1,5 T jako nízký,

velmi široký pík v oblasti chemického posunu přibližně 2,1 ppm a při 3 T jako dva široké píky v oblasti 2,1 a 2,5 ppm. Pro zlepšení přesnosti fitu jsme tyto komponenty též zahrnuli do simulované báze, ale nezabývali jsme se studiem jejich intenzit. Dále jsme pozorovali u několika subjektů (při 1,5 T i při 3 T) úzký pík v oblasti 2,1 ppm. Tento pík (pravděpodobně acetylová skupina acetylkarnitinu, viz níže) jsme též zahrnuli do simulované báze. Variabilita chemického posunu jednotlivých bázevých píků byla nastavena podle toho, jak kvalitně jsou píky ve spektru odděleny. Díky lepší kvalitě spekter byla u spekter měřených při 3 T dovolena větší variabilita v porovnání se spektry měřenými při 1,5 T.

Další parametry, které je třeba zadat jako počáteční a omezující podmínky pro každý simulovaný pík, jsou minimální a očekávaná pološířka píku a směrodatná odchylka pološířky píku, charakterizující míru variability modelu (*min_fwhm*, *exp_fwhm*, *SD_fwhm*). Abychom získali co nejlepší nastavení těchto parametrů pro simulovaná spektra, provedli jsme následující experiment. Spektrum dobré kvality bylo opakovaně zpracováno LCModelem s měnícím se nastavením *exp_fwhm* a *SD_fwhm*. Pro každé *SD_fwhm* jsme měnili *exp_fwhm* a sledovali jsme variabilitu výsledných vypočtených koncentrací (obr. 4.10).



Obr. 4.10 Ukázka postupu optimálního nastavení parametrů simulovaných píků v *home-made* bázi pro zpracování spekter: závislost variability vypočtené koncentrace IMCL-CH₃ na standardní odchylce pološířky (*SD_fwhm*) jakožto parametru simulovaného píku pro výpočet koncentrace rutinou LCModel. Nalezením prahu v grafu byla stanovena optimální hodnota *SD_fwhm*.

Při příliš nízkých SD_fwhm výsledná koncentrace výrazně závisela na nastavení exp_fwhm . Následným zvyšováním SD_fwhm jsme nastavili optimální prahovou hodnotu, kdy výsledné koncentrace již nezávisely na exp_fwhm a zároveň byla zachována stabilita modelu. Následně byly parametry exp_fwhm a min_fwhm nastaveny na základě manuálního fitování všech spekter pomocí standardního spektroskopického softwaru Siemens Numaris (¹¹¹) a jMRUI (105). Data nebyla při vyhodnocování apodizována, aby byla zachována informace o pološírce signálů. Konečné optimalizované nastavení parametrů simulovaných píků je zobrazeno v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Konečné nastavení parametrů simulovaných píků v *home-made* bázi pro výpočet koncentrací rutinou LCModel. Narrow_2,1: acetylkarnitin; Broad_2,1, Broad_2,4: vodíky –CO–CH₂– a –CH=CH–CH₂– skupiny lipidů; δ : chemický posun; SD: standardní odchylka.

		δ [ppm]	SD δ [ppm]	min_fwhm [ppm]	exp_fwhm [ppm]	SD_fwhm [ppm]
1,5 T	EMCL_CH ₂	1,49	0,05	0,1	0,16	0,1
	IMCL_CH ₂	1,28	0,05	0,07	0,11	0,1
	EMCL_CH ₃	1,07	0,05	0,06	0,126	0,1
	IMCL_CH ₃	0,885	0,05	0,05	0,1	0,1
	Narrow_2,1	2,1	0,05	0,05	0,1	0,1
	Broad_2,1	2,1	0,1	0,2	0,4	0,5
3 T	EMCL_CH ₂	1,49	0,1	0,08	0,15	0,15
	IMCL_CH ₂	1,28	0,1	0,03	0,07	0,15
	EMCL_CH ₃	1,07	0,1	0,08	0,15	0,15
	IMCL_CH ₃	0,885	0,1	0,03	0,08	0,15
	Narrow_2,1	2,1	0,05	0,05	0,1	0,1
	Broad_2,1	2,1	0,1	0,1	0,2	0,15
	Broad_2,4	2,4	0,1	0,1	0,2	0,15

Analýza spektra byla provedena v rozsahu $\delta = 0,2-3,8$ ppm u *home-made* báze a 0,2-3,7 ppm u *muscle-1* báze. Fitování CH₂ signálu kreatinu na 3,9 ppm nebylo prováděno ani v jedné z bází, neboť v obou skupinách kreatinu se projevuje efekt dipolární interakce, jenž se vyznačuje rozštěpením píků ve spektru (¹¹²). Efekt štěpení závisí na orientaci svalového vlákna vůči magnetickému poli. Signál CH₂ skupiny kreatinu na 3,9 ppm je díky efektu dipolární interakce rozštěpen na dublet, zatímco signál CH₃ skupiny na 3,0 ppm je rozštěpen na triplet s nezměněným chemickým posunem centrálního píku. Efekt štěpení CH₃ skupiny je navíc slabší. Dalším důvodem, proč bylo upuštěno od fitování CH₂ signálu kreatinu je rozdíl mezi T2 relaxačním časem CH₂ a CH₃ signálů *in vivo* a *in vitro*. Díky

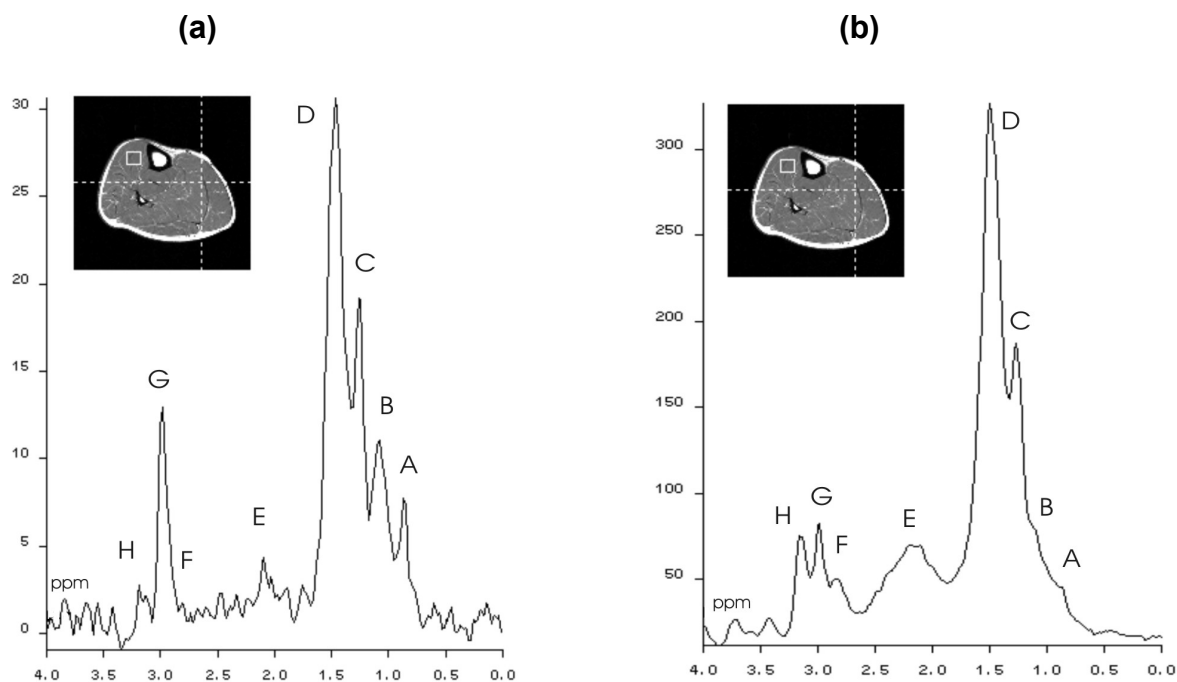
kratší hodnotě T2 je CH₂ signál při měřeních s dlouhým TE téměř relaxován a ve spektru je pak patrný pouze signál CH₃. Z důvodů přesnosti kvantifikace koncentrace kreatinu není signál „problematického“ CH₂ píku fitován. Možná nepřesnost stanovení koncentrace, která je dána zanedbáním vlivu dipolární interakce u CH₃ signálu kreatinu v *home-made* bázi, nemá významný vliv na hlavní cíl studie - určení koncentrací IMCL a EMCL.

K omezení fluktuace základní čáry jsme v LCModelu použili „přepínač“ VITRO = T (103), neboť při dlouhém TE jsme neočekávali ve spektru žádné další signály s krátkým T2 relaxačním časem a toto nastavení dávalo stabilnější výsledky. Spektra, u kterých nebylo dosaženo uspokojivé separace EMCL a IMCL (buď díky špatné homogenitě pole, nebo díky kontaminaci vysokým signálem EMCL), jsme vyřadili z další analýzy. Vypočtené intenzity píků jsme korigovali na počet protonů v daných chemických skupinách, aby získané hodnoty odpovídaly koncentracím CH₂ a CH₃ skupin v arbitrárních jednotkách. Tyto koncentrace jsme normalizovali vůči koncentraci kreatinu jakožto relativně stabilního interního standardu.

Ke statistickému porovnání kontrol a pacientů jsme použili deskriptivní statistiky a standardních F-testů a t-testů. Pro porovnání výsledků fitu s použitím obou bází u kontrol a pacientů jsme použili analýzu rozptylu s analýzou kontrastu (ANOVA). Opakovatelnosti výsledků vyhodnocení spekter naměřených na 1,5 T a 3 T tomografu jsme vyhodnotili též s použitím analýzy rozptylu.

4.2.3 Výsledky

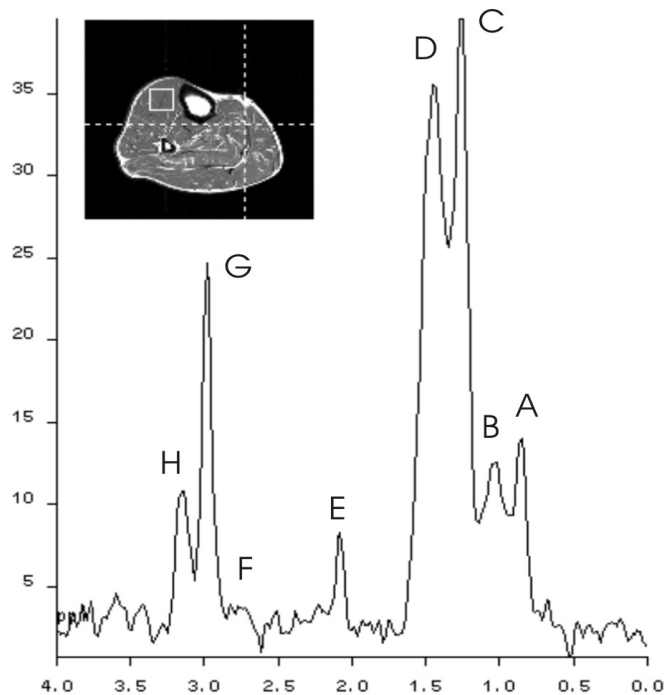
Insulinová rezistence byla potvrzena u všech pacientů: spotřeba glukosy (M: 6,30±0,85 vs. 8,7±1,4 mg.kg⁻¹.min⁻¹; $p < 0,01$) a metabolická clearance glukosy (MCR: 6,7±1,7 vs. 10,2±2,2 ml.kg⁻¹.min⁻¹; $p < 0,001$) byly signifikantně nižší u diabetiků v porovnání se zdravými kontrolami.



Obr. 4.11 (a) Typické spektrum *m. tibialis anterior* měřené při $B_0 = 1,5$ T s dlouhým TE = 270 ms. Je vidět, že se píky od sebe separují lépe než v případě krátkého TE. A: IMCL-CH₃; B: EMCL-CH₃; C: IMCL-CH₂; D: EMCL-CH₂; E: acetylkarnitin; F,G: kreatin; H: trimethylaminová skupina cholinu/karnitinu. **(b)** Typické spektrum *m. tibialis anterior* měřené při $B_0 = 1,5$ T s krátkým TE = 10 ms. V porovnání se spektrem měřeným s dlouhým TE je patrný lepší poměr signál/šum, horší separace píků a kontaminace širokými píky s komplikovaným tvarem čáry z oblasti kolem 2,1 ppm. A: IMCL-CH₃; B: EMCL-CH₃; C: IMCL-CH₂; D: EMCL-CH₂; E: široké signály –CH=CH–CH₂– a –CO–CH₂– skupin; F,G: kreatin; H: trimethylaminová skupina cholinu/karnitinu.

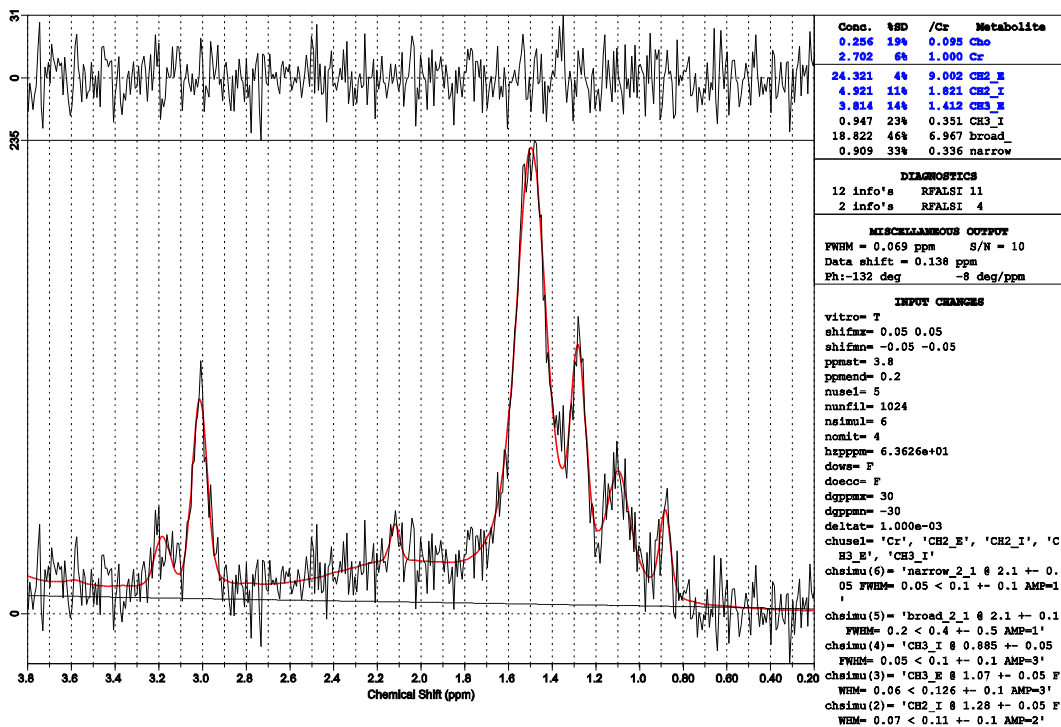
Ukázka spektra dobré kvality, naměřeného při $B_0 = 1,5$ T s použitím PRESS sekvence s TE = 270 ms, je zobrazena na obr. 4.11a. Pro porovnání je na obr. 4.11b zobrazeno spektrum ze stejného voxelu naměřené s krátkým TE. Vidíme, že v případě krátkého TE je oddělení signálů EMCL-CH₃ a IMCL-CH₃ výrazně horší. Při dlouhém TE pozorujeme ve spektru v oblasti 0,2-3,8 ppm menší množství signálů. V oblasti 3 ppm vidíme úzký pík, který přísluší CH₃ skupině kreatinu. V oblasti 0,8-1,6 ppm vidíme komplex poměrně dobře rozlišených lipidových signálů. Široká komponenta, která odpovídá lipidům s krátkým T2 relaxačním časem a která ve spektru naměřeném s krátkým TE dominuje v oblasti kolem 2,1 ppm, je ve spektru měřeném s dlouhým TE minimalizována a přispívá pouze jako základní čára (*baseline*).

U třech pacientů a jednoho zdravého dobrovolníka jsme pozorovali nápadný úzký pík v oblasti cca 2,1 ppm (obr. 4.12). Tento pík můžeme na základě studie autorů Kreis *et al.* (89) přiřadit acetylové skupině acetylkarnitinu.

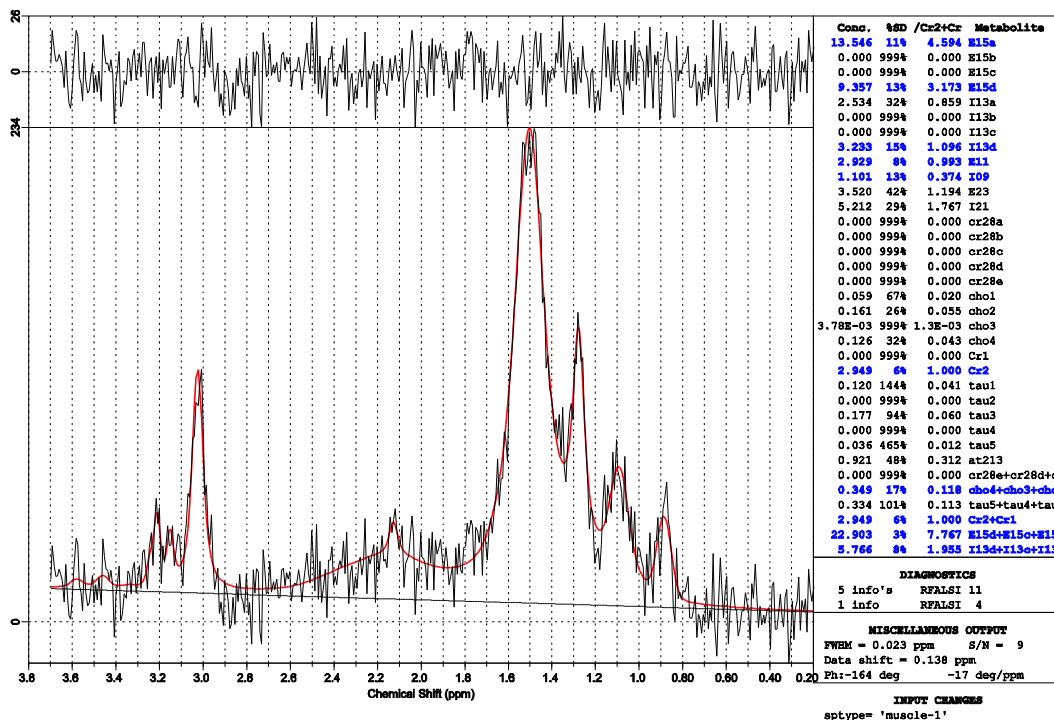


Obr. 4.12 Spektrum z *m. tibialis anterior* měřené při $B_0 = 1,5$ T s TE = 270 ms. V oblasti $\delta = 2,1$ ppm je patrný výrazný pík acetylkarnitinu (označen jako E). Vysvětlivky značek viz obr. 4.11.

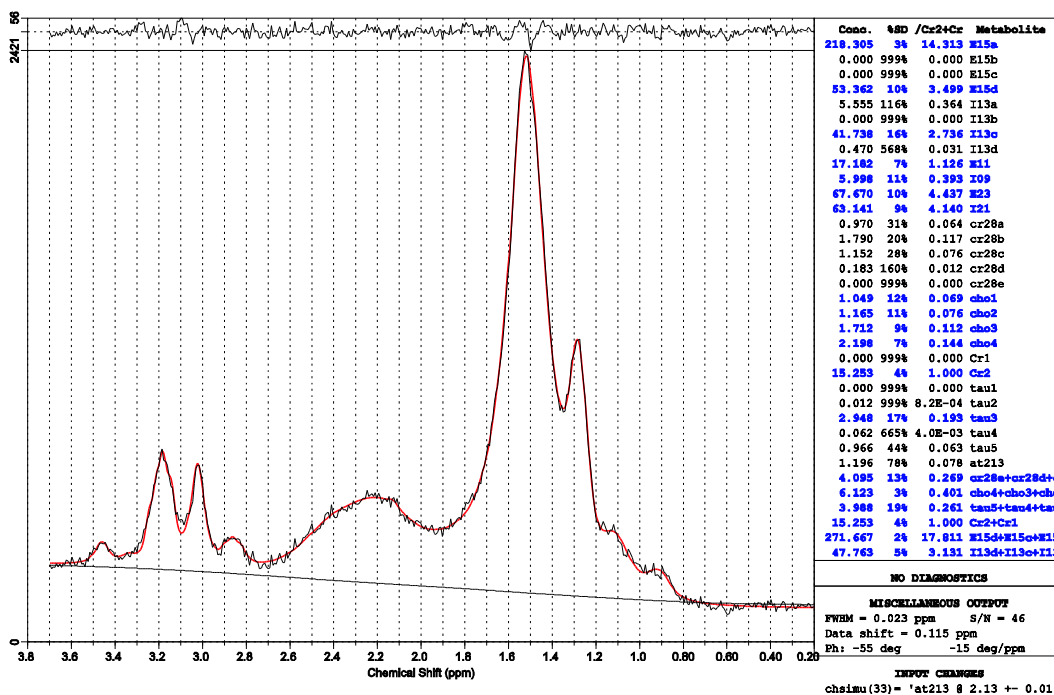
Typický výsledek analýzy spekter měřených při $B_0 = 1,5$ T a zpracovaných programem LCModel je uveden na obr. 4.13-4.15.



Obr. 4.13 Typický výsledek analýzy spektra programem LCModel: Spektrum měřené při $B_0 = 1,5$ T s TE = 270 ms a zpracované s použitím báze *home-made*.



Obr. 4.14 Typický výsledek analýzy spektra programem LCModel: Spektrum měřené při $B_0 = 1,5$ T s TE = 270 ms a zpracované s použitím báze *muscle-1*.

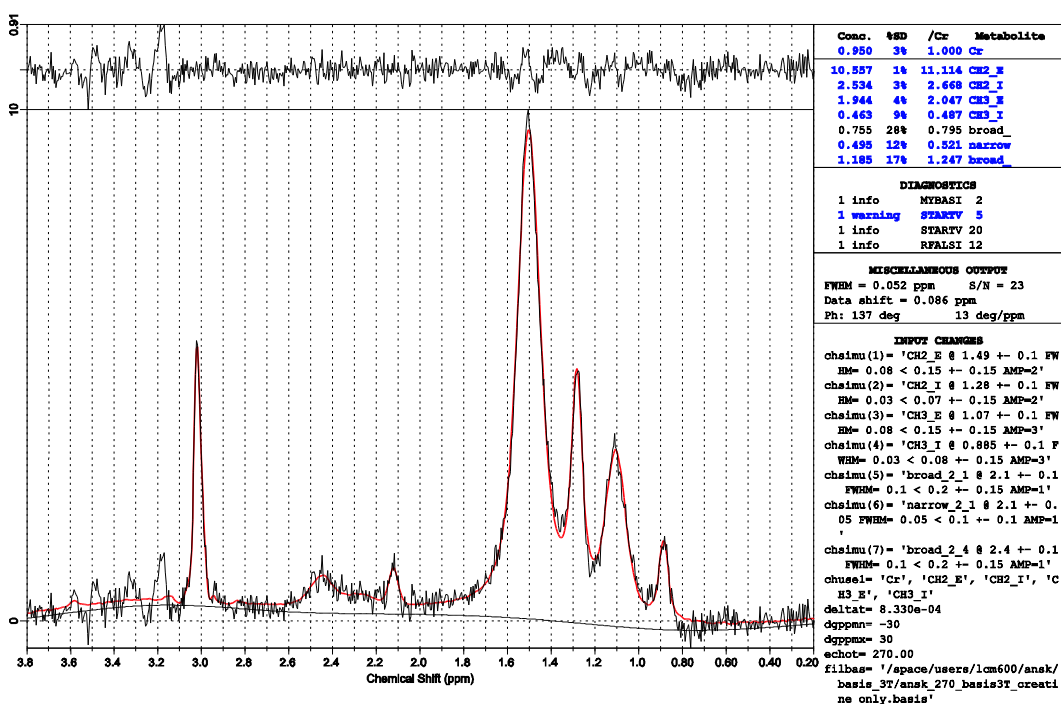


Obr. 4.15 Typický výsledek analýzy spektra programem LCModel: Spektrum měřené při $B_0 = 1,5$ T s TE = 10 ms a zpracované s použitím báze *muscle-1*.

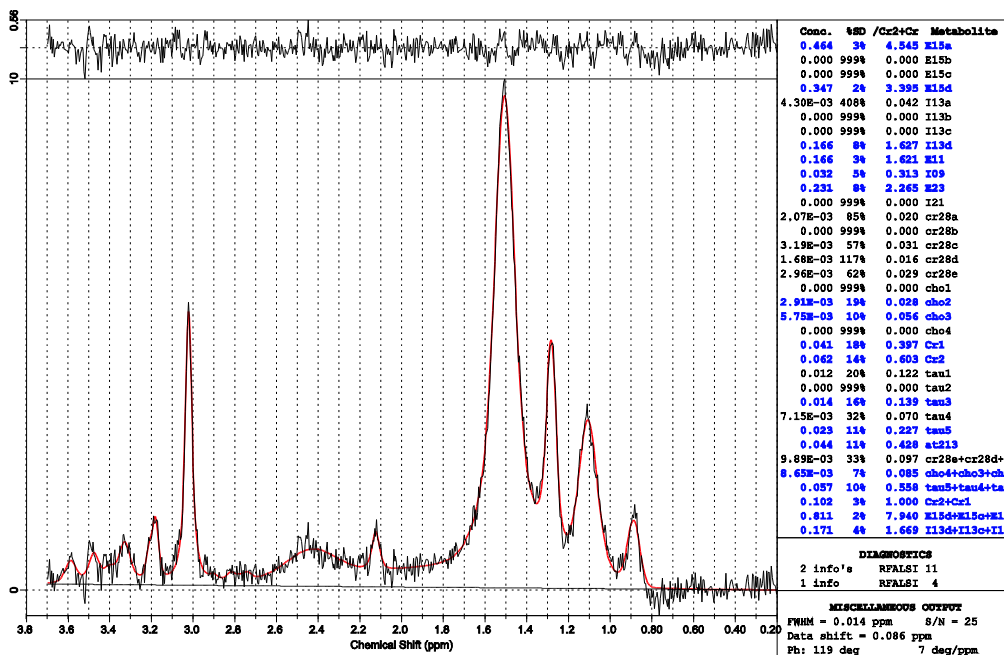
Tabulka 4.2 Opakovatelnost stanovení koncentrací metabolitů při $B_0 = 1,5$ T a $B_0 = 3$ T.

	1,5 T (n = 7)		3 T (n = 5)	
	<i>Home-made</i>	<i>Muscle-1</i>	<i>Home-made</i>	<i>Muscle-1</i>
IMCL_CH ₂	11%	10%	4%	4%
IMCL_CH ₃	18%	14%	7%	6%
IMCL_CH ₂ /IMCL_CH ₃	12%	10%	5%	5%

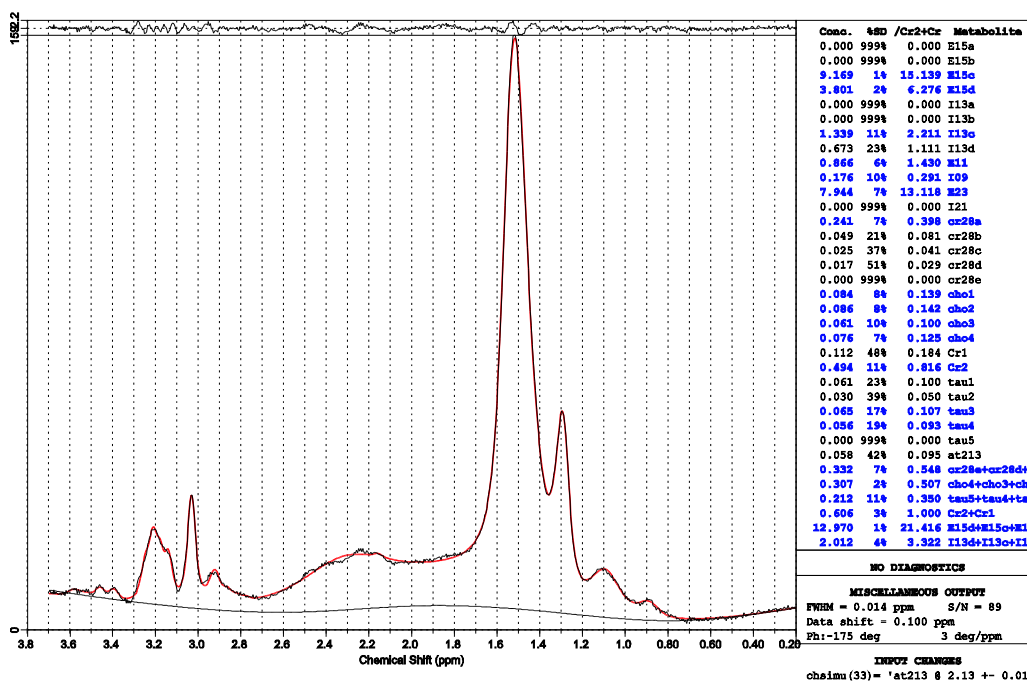
Opakovatelnost stanovení koncentrace IMCL (počet subjektů 7) vypočtená z výsledků získaných použitím *muscle-1* báze při 1,5 T byla o něco lepší než v případě *home-made* báze (tabulka 4.2). Analýza rozptylu však signifikanci rozdílu v rozptylech neprokázala. Porovnání hodnot poměrů IMCL_CH₂/Cr a IMCL_CH₃/Cr u kontrol naměřených při 1,5 T a 3 T neprokázalo signifikantní rozdíl výsledků. Porovnání hodnot naměřených při 1,5 T a 3 T dále prokázalo výrazně lepší (o cca 150 %) opakovatelnost při 3 T. Zlepšení přesnosti kvantifikace při 3 T je způsobeno jednak lepším oddělením píků ve spektru, jednak lepším poměrem signál/šum. Na obr. 4.16 a 4.17 je vidět typické spektrum naměřené při 3 T a zpracované LCModelem. Pro porovnání opět uvádíme na obr. 4.18 spektrum získané technikou krátkého TE u identického subjektu z identického voxelu. Stejně jako při 1,5 T vidíme výrazně lepší poměr signál/šum, avšak horší separaci píků.



Obr. 4.16 Typický výsledek analýzy spektra programem LCModel: Spektrum měřené při $B_0 = 3$ T s TE = 270 ms a zpracované s použitím báze *home-made*. V porovnání s výsledky při $B_0 = 1,5$ T je chyba fitu (značená jako %SD u seznamu koncentrací) výrazně nižší.



Obr. 4.17 Typický výsledek analýzy spektra programem LCModel: Spektrum měřené při $B_0 = 3$ T s TE = 270 ms a zpracované s použitím báze *muscle-1*.



Obr. 4.18 Typický výsledek analýzy spektra programem LCModel: Spektrum měřené při $B_0 = 3$ T s TE = 30 ms a zpracované s použitím báze *muscle-1*. Je vidět, že pík acetylkarnitinu (~ 2,1 ppm) je zcela překryt signály $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ skupin.

Výsledky porovnání insulin-rezistentních a insulin-senzitivních subjektů jsou zobrazeny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3 Porovnání koncentrací lipidů (normalizovaných vůči koncentraci kreatinu) u kontrol a pacientů měřených při $B_0 = 1,5$ T. Hodnoty jsou vyjádřeny jako střední hodnota \pm standardní odchylka. 1: IMCL_CH₂/Cr; 2: IMCL_CH₃/Cr; 3: (IMCL_CH₂+IMCL_CH₃)/Cr; 4: IMCL_CH₂/IMCL_CH₃; 5: EMCL_CH₂/EMCL_CH₃; p : hladina významnosti pro signifikantní rozdíl mezi skupinami ve Studentově t-testu; hodnoty označené [†] znamenají statisticky významný rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti $p = 0,05$.

Číslo metabolitu	<i>Home-made</i>			<i>Muscle-1</i>		
	Kontroly	Pacienti	p	Kontroly	Pacienti	p
1	2,7 \pm 1,2	4,2 \pm 1,8	0,05 [†]	2,8 \pm 1,4	4,2 \pm 1,7	0,07
2	0,38 \pm 0,17	0,73 \pm 0,37	0,02 [†]	0,45 \pm 0,23	0,76 \pm 0,31	0,03 [†]
3	3,0 \pm 1,3	5,0 \pm 2,2	0,04 [†]	3,2 \pm 1,7	4,9 \pm 2,0	0,06
4	7,5 \pm 2,2	5,94 \pm 0,83	0,06	6,37 \pm 0,87	5,71 \pm 0,87	0,12
5	7,3 \pm 2,6	6,4 \pm 1,8	0,35	7,3 \pm 1,3	6,8 \pm 1,1	0,35

Porovnání výsledků zpracovaných *home-made* bází u kontrol a diabetických pacientů (s použitím t-testů) prokázalo statisticky významný rozdíl jak mezi IMCL_CH₂/Cr ($p = 0,05$), tak mezi IMCL_CH₃/Cr ($p = 0,02$). V případě použití *muscle-1* báze byla separace kontrol a pacientů o něco horší: rozdíl v IMCL_CH₃/Cr byl statisticky významný ($p = 0,03$), avšak rozdíl v IMCL_CH₂/Cr byl statisticky nevýznamný ($p = 0,07$). S užitím analýzy rozptylu s analýzou kontrastu jsme prokázali, že není statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými bázemi. Zároveň tato analýza prokázala, že existuje statisticky významný rozdíl mezi skupinami kontrol a pacientů. Vzhledem k tomu, že takto vyvinutá metodika nám umožňuje vyhodnocovat koncentrace CH₂ a CH₃ skupin lipidů nezávisle, mohli jsme vyhodnotit a posoudit i parametr IMCL_CH₂/IMCL_CH₃, který nám podává informaci o složení lipidových řetězců. Velikost poměru CH₂ a CH₃ koncentrací závisí jak na délce řetězce, tak i na počtu dvojných vazeb. Hodnota tohoto parametru byla vyšší u zdravých kontrol, nicméně rozdíl nebyl statisticky významný. Po korekci koncentrací na T1 a T2 relaxační časy jsme u zdravých kontrol dospěli k hodnotě IMCL_CH₂/IMCL_CH₃ = 41:1 pro *home-made* bázi a 36:1 pro *muscle-1* bázi. V případě pacientů jsme získali poměr 36:1 pro *home-made* bázi a 32:1 s použitím *muscle-1* báze.

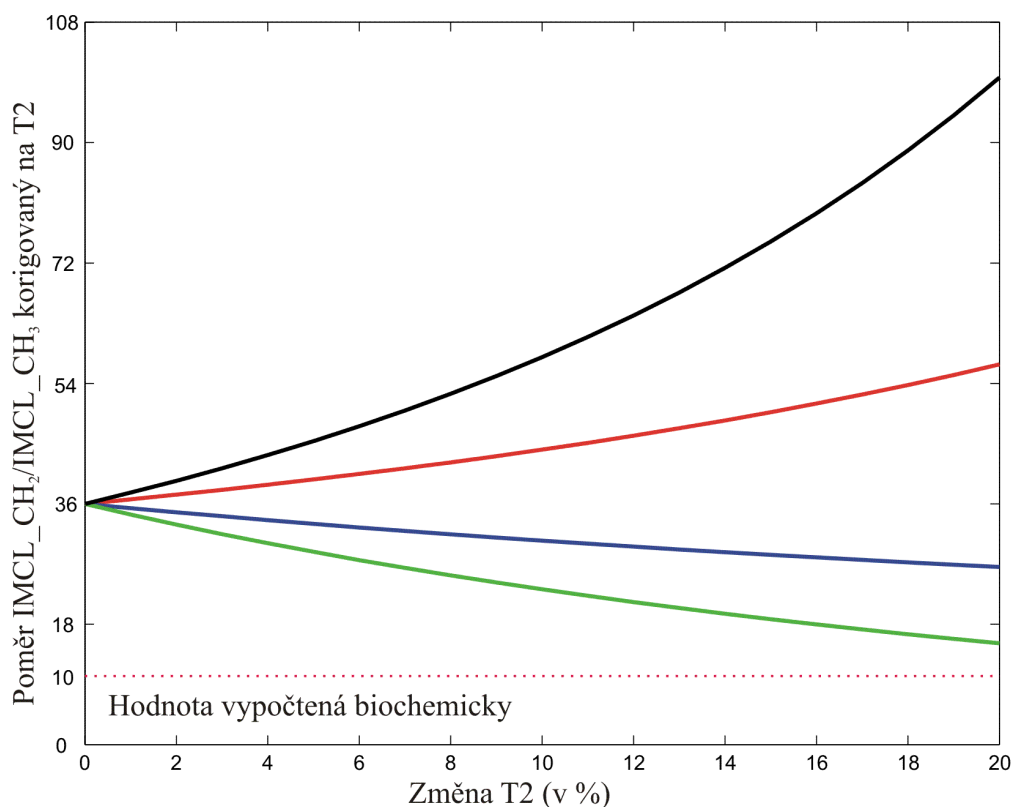
Jako vedlejší výsledek lipidové analýzy jsme udělali porovnání parametru EMCL_CH₂/EMCL_CH₃ u kontrol a pacientů. V tomto parametru jsme mezi kontrolami a pacienty nenalezli statisticky významný rozdíl.

4.2.4 Diskuze

Prokázali jsme, že použití dlouhého TE umožňuje lepší oddělení lipidových složek ve spektru. Důvodem tohoto jevu je potlačení širokých signálů, které pocházejí z metabolitů majících krátký T2 relaxační čas. Navíc dochází i k zeslabení intenzity signálu CH₂ skupiny vůči signálu CH₃ skupiny díky kratšímu T2 relaxačnímu času CH₂ skupiny v porovnání s CH₃ skupinou (72) (víceintenzivní CH₂ pík je potlačen větší měrou než méně intenzivní pík CH₃). To vytváří lepší podmínky pro fitování navzájem se překrývajících píků. Tato spektra lze zpracovat technikou LCMoDel a s poměrně dobrou opakovatelností lze stanovit koncentrace CH₂ a CH₃ skupin bez použití apriorní informace o jejich vzájemných poměrech.

Nezávislá kvantifikace CH₂ a CH₃ komponent IMCL nám nově umožnila detailnější pohled na složení IMCL *in vivo*, protože koncentrace CH₂ a CH₃ komponent závisí na délce lipidového řetězce a na počtu dvojných vazeb. Toto složení lipidů se v buňkách pravděpodobně neustále mění s úrovní syntézy a oxidace lipidů v závislosti na aktuální energetické spotřebě svalu. Není jasné, zdali jsou tyto změny ve složení lipidů za námahy či při různých metabolických onemocněních (jako je např. diabetes mellitus) pozorovatelné spektroskopicky, neboť acyl-CoA řetězce tvoří v buňce malé procentuální množství ve srovnání s celkovou tukovou zásobou. Je nicméně možné, že některé lipidové složky díky krátkému relaxačnímu času přispívají do signálu menší měrou.

Chemickou analýzou lidské bránice a psiho *m. tibialis anterior* byl změřen poměr koncentrací CH₂ a CH₃ v rozsahu 9-10. Naše výsledky ukazují na poměr koncentrací CH₂/CH₃ v rozsahu 32-41. Tento rozdíl ve výsledcích může mít několik příčin. Jako nejpravděpodobnější se jeví fakt, že i malá chyba ve stanovení T2 relaxačního času lipidů způsobí velkou chybu ve vypočtené koncentraci v případě, že absolutní koncentrace počítáme ze spekter získaných s použitím dlouhého TE (¹¹³). V jediné práci, která se zabývá kvantifikací T2 relaxačních časů IMCL_CH₃ *in vivo* (jejíž hodnoty T2 byly použity k výpočtu CH₂/CH₃ v naší studii), autoři píší, že vypočtená hodnota T2 je zkreslena díky výraznému vzájemnému překryvu píků, který neumožnil přesné stanovení (72). Zkreslení hodnoty vypočteného poměru koncentrací závisí jak na použitém TE, tak na správných hodnotách T2. Závislost vypočteného poměru IMCL_CH₂/IMCL_CH₃ na použitých hodnotách T2 a TE = 270 ms je zobrazena na obr. 4.19.



Obr. 4.19 Graf ilustrující závislost vypočteného poměru IMCL_CH₂/IMCL_CH₃ (po korekcích na T2 relaxační časy) na hodnotách T2 relaxačních časů použitých pro korekci (hodnoty T2 jsou vyjádřeny jako procentuální změna oproti výchozím hodnotám). Výchozí hodnoty T2 (IMCL_CH₂ = 85 ms, IMCL_CH₃ = 200 ms) jsou převzaty z výsledků studie (72). Závislost je vypočtena pro použitý TE = 270 ms. V grafu jsou barevně vyznačeny 4 závislosti pro následující změny T2: modrá - T2 IMCL_CH₂ i IMCL_CH₃ se zvyšuje; červená - T2 IMCL_CH₂ i IMCL_CH₃ se snižuje; zelená - T2 IMCL_CH₂ se zvyšuje zatímco T2 IMCL_CH₃ se snižuje; černá - T2 IMCL_CH₂ se snižuje zatímco T2 IMCL_CH₃ se zvyšuje. Ze závislosti je patrné, že pro získání hodnoty, která odpovídá biochemicky stanovenému poměru IMCL_CH₂/IMCL_CH₃ by nejlépe odpovídala situace nižšího T2 IMCL_CH₃ a vyššího T2 IMCL_CH₂.

V grafu na ose x je vyznačena změna hodnoty T2 (v procentech) od původní hodnoty T2, převzaté z publikace (72). Data jsou simulována tak, že dochází ke změně v T2 obou metabolitů zároveň. V grafu jsou zobrazeny 4 křivky, které odpovídají 4 různým situacím: oba T2 relaxační časy rostou, oba klesají, jeden roste a druhý klesá a obráceně. Z obr. 4.19 je jasně vidět, že nepřesnost stanovení T2 relaxačního času je významným zdrojem chyby při korekcích na absolutní koncentrace (nebo jejich poměry) za podmínek dlouhého TE. Aby poměry CH₂/CH₃ odpovídaly výsledkům biochemické analýzy, měl by být poměr T2 relaxačních časů CH₂/CH₃ o něco menší než publikované výsledky studie

autorů Schick *et al.* (72). Určení přesnějších hodnot relaxačních časů je tedy důležitým úkolem pro další studie.

Druhým faktorem, který ovlivňuje kvantifikaci IMCL-CH₂/IMCL-CH₃ je skutečnost, že mastné kyseliny jsou uvnitř buněk distribuovány do nejméně dvou cytologicky různých kompartmentů, v nichž mají rozdílné T2 relaxační časy. Vyhodnocení relaxačních časů by tedy mělo brát v potaz tuto skutečnost a fitování relaxační křivky by mělo být provedeno biexponenciálně. Protože byly T2 relaxační časy v publikaci (72) stanoveny monoexponenciálním fitem, zcela jistě trpí systematickou chybou. Úkol biexponenciálního fitování nás však staví před numerický problém, protože pro takový fit nemáme možnost získat dostatečně kvalitní data (nemáme možnost *in vivo* naměřit dostatečný počet experimentálních bodů a nemáme data s dostatečně dobrým poměrem signál/šum). Biochemický model distribuce IMCL v buňce a analýza příspěvků jednotlivých kompartmentů do celkového MR signálu při měnícím se TE by byla jistě důležitým počinem při řešení této problematiky. Dalším důvodem může být fakt, že spektroskopicky určená koncentrace IMCL-CH₃ skupiny je systematicky nižší než skutečná koncentrace, neboť -CH=CH-CH₂-CH₃ skupina rezonuje v oblasti 1,0 ppm, viz výsledky spektroskopické studie vysokého rozlišení tukové tkáně *in vitro* provedené autory Millis *et al.* (114). Tedy ne všechny CH₃ skupiny lipidů přispívají do IMCL-CH₃ signálu.

Vliv T2 relaxace u spekter měřených s dlouhým TE by naproti tomu mohl být užitečný v diagnostice: Pokud u insulin-rezistentních subjektů dochází k přesunům IMCL mezi intracelulárními kompartmenty, tyto biochemické změny by se mohly projevit ve změnách T2 relaxačních časů, jejichž efekt je zvýrazněn při dlouhých TE. Dosud však nebyla provedena žádná studie, která by se touto problematikou zabývala.

V další části studie jsme navzájem porovnávali výsledky vypočtené oběma bázemi. Každá z obou bází má své výhody i nevýhody. Plně simulovaná *muscle-1* báze je univerzální – lze použít pro spektra naměřená jak s krátkým, tak s dlouhým TE. Navíc efekt dipól-dipólové interakce kreatinu je při zpracování spekter touto bází lépe korigován. Její hlavní nevýhodou je, že není otevřená – výrobce nezveřejnil její interní nastavení počátečních a omezujících podmínek fitu. Tuto bázi též nelze volně modifikovat. Dále, vzhledem k tomu, že tato báze byla optimalizována na spektrech měřených s krátkým TE, výsledky na jiných TE mohou obsahovat systematickou chybu. Jako alternativu k této bází jsme zavedli naši vlastní *home-made* bázi, která byla optimalizována pro použití na spektrech měřených s dlouhým TE, je jednodušší (obsahuje méně signálů) a je volně modifikovatelná.

Při porovnání obou bází analýzou rozptylu jsme nenalezli signifikantní rozdíl mezi koncentracemi metabolitů vypočtených s použitím *home-made* a *muscle-1* báze. Je třeba však na tomto místě poznamenat, že naše metodika stanovení opakovatelnosti měření nezahrnuje vliv umístění voxelu a lokálního shimování, protože subjekt nebyl mezi jednotlivými měřeními vyjmut z magnetu. Na druhou stranu náš experiment opakovatelnosti postihuje nikoliv nevýznamný podíl na celkové chybě výsledku, totiž vliv šumu a fyziologického pohybu pacienta během měření. Dá se očekávat, že stanovení reprodukovatelnosti celého experimentu (tj. včetně umístění voxelu a lokální shim) by dalo o něco horší výsledky.

U několika subjektů (jak kontrol, tak pacientů) jsme v oblasti přibližně 2,1 ppm pozorovali úzký pík (obr. 4.12). Na základě výsledků studie autorů Kreis *et al.* (89), kteří pozorovali podobný pík úzkého tvaru v oblasti 2,13 ppm, můžeme tento pík přiřadit acetylové skupině acetylkarnitinu. Autoři pozorovali, že tento pík se objevuje u většiny subjektů ve spojení se svalovou námahou. Naše výsledky prokazují (obr. 4.11a,b), že tento pík můžeme lépe pozorovat u spekter měřených s dlouhým TE, protože za těchto podmínek není tento pík překryt širokými píky $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ skupin, které jinak dominují ve spektru měřeném s krátkým TE. Pro podrobnější studium tohoto metabolitu je tudíž vhodnější používat sekvenci s dlouhým TE.

Zjistili jsme, že rozdíl poměrů $\text{IMCL_CH}_3/\text{Cr}$ mezi skupinami kontrol a pacientů je statisticky signifikantní pro obě báze. Rozdíl v poměru $\text{IMCL_CH}_2/\text{Cr}$ mezi kontrolami a insulin rezistentními subjekty byl méně výrazný – statisticky významný rozdíl jsme našli pouze při použití *home-made* báze. Nalezli jsme jak v $\text{IMCL_CH}_2/\text{Cr}$, tak i v $\text{IMCL_CH}_3/\text{Cr}$ poměrně výraznou interindividuální variabilitu, která je pravděpodobně způsobena tím, že hladiny IMCL jsou ovlivněny i jinými faktory, např. obezitou nebo fyzickou trénovaností subjektu (86,87,88).

Již autoři Boesch *et al.* (76) zjistili, že závislost intenzity signálu na velikosti voxelu je pro signály EMCL a IMCL rozdílná. IMCL se vyznačuje přibližně lineární závislostí, kdežto intenzita signálu EMCL kolísá dle aktuálního množství mezsvalových sept, zahrnutých do měřeného voxelu. Díky vysoké koncentraci lipidů v adipocytech svalových sept má signál EMCL tendenci ve spektrech převažovat a překrývat signál IMCL. Velikost signálu EMCL se při měření snažíme minimalizovat pomocí vhodného umístění voxelu a vhodné volby jeho objemu. Jako nejlepší postup se nám osvědčilo naměření spektra s malým množstvím akvizic ze standardního objemu a dle intenzity EMCL ve spektru pak individuálně upravit definitivní velikost voxelu. Podmínkou pro

kvantifikaci IMCL s minimální chybou je dosažení řádově podobných intenzit signálů EMCL a IMCL při co nejlepšimu poměru signál/šum. U obéznějších pacientů nebo pacientů s tukovou degenerací svalu, kteří mají zvýšené množství mezisvalového tuku, se často dostáváme do situace, kdy nejsme schopni kvalitní spektra získat, protože signál EMCL je příliš vysoký a překrývá signál IMCL. Snaha o minimalizaci EMCL snížením velikosti voxelu pak vede k neúnosnému snížení poměru signál/šum.

Výše popsaný růst signálu EMCL u tukových degenerací svalu je též dle našeho názoru důvodem, proč autoři Jagannathan *et al.* (107) pozorovali dramatický nárůst signálu EMCL u pacientů s reziduální paralýzou po poliomyelitidě. Tehdy však tuto skutečnost mylně považovali za „vymizení“ signálu IMCL – absenci intramyocelulárních lipidů. V jejich spektru ve výše zmíněné publikaci je vidět výrazně zvýšený signál EMCL, který úplně překrývá signál IMCL. Zároveň je patrný dramatický nárůst poměru signál/šum na řádově desetinásobek až stonásobek, při kterém je i signál kreatinu na obrázku neviditelný, což je ovšem způsobeno použitou zobrazovací škálou při nárůstu poměru signál/šum. Nedošlo tedy k poklesu všech ostatních signálů, jak se autoři domnívají, ale k nárůstu EMCL při zmnožení tukových sept a svalové atrofii. Za těchto podmínek nelze koncentrace IMCL touto technikou spolehlivě vyhodnotit. Tato situace nastala i v naší studii u několika subjektů, které jsme museli ze studie vyřadit (viz výše).

Hlavní nevýhodou techniky dlouhého TE je výrazně horší SNR v porovnání s technikou krátkého TE. Díky tomu jsme nuceni měřit s použitím více akvizic, abychom získali spektrum s dostatečnou kvalitou. Problém nízkého SNR je nejvýraznější v situacích velké tukové degenerace svalu, kdy je nutno zmenšit objem voxelu, aby se snížila kontaminace signálem EMCL. Výsledky naší studie (především testy opakovatelnosti) prokazují, že měření při vyšších hodnotách B_0 dávají výrazně lepší výsledky (díky lepší hodnotě SNR i díky lepší separaci EMCL a IMCL). V dalších studiích bude nutno podrobněji prostudovat jednotlivé výhody a nevýhody technik krátkého a dlouhého TE, abychom našli optimální kompromis mezi lepším SNR a menším vlivem T2 relaxace (krátké TE) a lepší separací píků EMCL a IMCL (dlouhé TE). Dalším úkolem pro budoucí studie je naměření relaxačních časů CH_2 a CH_3 skupin IMCL.

4.2.5 Závěr

Podařilo se nám vyvinout a vyzkoušet protokol pro nezávislou kvantifikaci IMCL_ CH_2 a IMCL_ CH_3 komponent lipidů s použitím dlouhého TE k naměření spekter a

LCModelu k jejich kvantifikaci. Tato technika nám poprvé umožňuje studovat složení lipidových řetězců.

Hlavním problémem této metodiky zůstává nízký poměr signál/šum v měřených spektrech. Nicméně pokud nastavíme správně velikost a pozici voxelu, jsme schopni u většiny subjektů bez tukové degenerace svalu naměřit kvalitní spektra, která pak lze zpracovat automatickou metodou. Otestovali jsme tuto metodiku na skupině zdravých kontrol a na pacientech s insulinovou rezistencí a prokázali jsme, že subjekty s insulinovou rezistencí mají vyšší hodnoty IMCL než netrénovaní zdraví dobrovolníci. Též jsme prokázali, že výrazného zlepšení kvality výsledků dosáhneme při měření s vyšší indukcí magnetického pole.

4.3 Měření hladiny intramyocelulárních lipidů u subjektů s poruchou glukosové tolerance léčených telmisartanem

4.3.1 Úvod

Telmisartan patří do skupiny sartanů – látek, které působí jako blokátory receptoru pro angiotenzin II. Používají se především k léčbě hypertenze. Bylo prokázáno, že látky, které inhibují renin-angiotenzinový systém, mají kromě svého antihypertenzního účinku i další účinek: významně snižují riziko vzniku diabetu mellitu 2. typu (¹¹⁵). Mechanismů, které vysvětlují toto působení, je celá řada, zahrnují zlepšení insulinové sekrece i insulinové senzitivity. Zvýšení insulinové senzitivity lze vysvětlit několika mechanismy. Tyto látky mohou zvyšovat krevní oběh v kosterních svalech a tím působit zvýšení účinku insulinu v periferní tkáni, dále svým vlivem na iontovou rovnováhu nepřímo ovlivňují insulinový metabolismus. Též bylo prokázáno, že tyto látky působí přímo i na insulinovou intracelulární signální kaskádu, ovlivňují metabolismus glukosových membránových přenašečů GLUT4 a konečně působí i na metabolismus tukové tkáně.

Kromě těchto účinků, které ovlivňují insulinovou senzitivitu a které jsou obecné pro látky ovlivňující renin-angiotenzinový systém, vykazuje telmisartan jakožto lipofilní agens přímou interakci s PPAR γ receptory (*peroxisome proliferator-activated receptor*). V tomto účinku je podobný glitazonům – látkám patřícím do skupiny perorálních antidiabetik. Tyto látky stimulují proliferaci adipocytů a tím napomáhají redistribuci lipidů z krve a metabolicky aktivních tkání do tukových rezerv. Zároveň též ovlivňují velikost adipocytů a ovlivňují spalování lipidů (produkci tepla) v adipocytech. Pozitivní účinek těchto látek na lipidový metabolismus by bylo možné vhodně využít při léčbě hypertenze u obézních pacientů nebo u pacientů s insulinovou rezistencí. Přesné účinky telmisartanu na lipidový metabolismus a navržené mechanismy účinku této látky na insulinovou senzitivitu u lidí však musí být ověřeny klinickými studiemi. Výsledky studie (¹¹⁶) provedené na myším modelu prokázaly snížení koncentrace svalových lipidů při podávání telmisartanu. V této studii však nebylo vzhledem k použité metodice možné vyhodnotit samostatně koncentrace EMCL a IMCL. Pokud by telmisartan měl přímý efekt na koncentrace IMCL, mohl by tímto mechanismem zlepšovat insulinovou senzitivitu, což by mohlo mít terapeutický význam.

¹H MR spektroskopie je jediná technika, která umožňuje sledovat metabolismus intramyocelulárních lipidů *in vivo* neinvazivní metodou. Lze jí tedy využít jako nástroj při studiu mechanismů účinku telmisartanu u subjektů s insulinovou rezistencí.

Cílem naší studie bylo sledování vlivu telmisartanu na koncentrace IMCL u osob s poruchou glukosové tolerance během randomizované studie s podáváním telmisartanu.

4.3.2 Metody

10 subjektů s poruchou glukosové tolerance (PGT) se účastnilo randomizované dvojité slepé studie, která trvala po dobu celkem 8 týdnů. Studie se skládala ze 2 třítydenních období podávání farmaka mezi kterými bylo dvoutýdenní období *wash out*. Jako farmakum subjekty dostávaly buď telmisartan (160 mg denně), nebo placebo, přičemž v druhém období se farmaka vystřídala. Na konci obou období podávání farmaka byla u vyšetřovaných subjektů provedena následující vyšetření:

a) Hyperinsulinemický euglykemický clamp

Rychlost podávání insulinu byla $1 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, glykémie byla regulována na koncentraci $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, trvání clampu bylo 120 minut. Vyhodnocením parametrů clampu byly získány veličiny M (glucose disposal rate) a MCR (metabolická clearance glukosy), které odpovídají spotřebě glukosy vztažené na koncentraci insulinu v krevním řečišti (neboli insulinové senzitivitě).

b) Nepřímá kalorimetrie

S pomocí této techniky jsme byli schopni určit parametr FOX (*fat oxidation*), který odpovídá bazální rychlosti oxidace lipidů.

c) ^1H MR spektroskopie

Měření byla provedena na MR přístroji Siemens Magnetom Vision, pracujícím s magnetickou indukcí $B_0 = 1,5 \text{ T}$. Měřili jsme technikou jednoho voxelu (*single voxel*) ze svalu *m. tibialis anterior*. Použitá technika měření je detailně popsána v kapitole 4.1.2. Touto technikou jsme určili koncentrace CH_2 a CH_3 skupin EMCL a IMCL v laboratorních jednotkách.

d) Měření sérového adiponektinu

Tento peptid, který je syntetizován adipocyty do krevního řečiště, má řadu účinků na metabolismus glukosy a lipidů. Podporuje insulinovou senzitivitu. Jeho koncentrace bývají nižší u obézních subjektů. Váže se na řadu receptorů, úroveň exprese receptorů pro adiponektin na kosterních svalech na myších modelech negativně koreluje s insulinovou rezistencí.

4.3.3 Výsledky a diskuze

Výsledné poměry koncentrací metabolitů a jejich standardní odchylky měřené během podávání telmisartanu a placebo jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4 Poměry koncentrací metabolitů kosterního svalu měřené ^1H MR spektroskopii během podávání telmisartanu a placebo.

	Placebo	Telmisartan
IMCL CH_2/Cr	2,8±1,2	3,4±2,1
IMCL CH_3/Cr	0,52±0,24	0,65±0,40
IMCL $\text{CH}_2/\text{IMCL } \text{CH}_3$	5,54±0,82	5,5±1,2
EMCL CH_2/Cr	9,7±7,4	9,9±4,6
EMCL CH_3/Cr	4,7±3,0	4,3±2,6
EMCL $\text{CH}_2/\text{EMCL } \text{CH}_3$	6,4±1,5	6,7±1,5

Insulinová senzitivita, úroveň oxidace lipidů a koncentrace adiponektinu nebyla léčbou telmisartanem významně ovlivněna. Parametry EMCL/Cr a IMCL/Cr po podávání telmisartanu a placebo nebyly významně rozdílné (9,9±4,6 versus 9,7±7,4 u EMCL a 0,65±0,40 versus 0,52±0,24 u IMCL). Prokázali jsme negativní korelaci IMCL s MCR parametrem ($p < 0,05$) a koncentrací adiponektinu ($p < 0,05$). Dále jsme našli negativní korelaci mezi parametrem (IMCL+EMCL)/FOX a M ($p < 0,05$). Parametr (IMCL +EMCL)/FOX jakožto poměr sumy koncentrací lipidů v extramyocelulárním a intramyocelulárním kompartmentu vztažený k úrovni bazální lipidové metabolické spotřeby vyjadřuje relativní bazální oxidační kapacitu lipidů ve svalovém kompartmentu. Nález korelace (IMCL + EMCL)/FOX a M potvrzuje recentní nálezy, že spíše než koncentrace IMCL je významným markerem insulinové rezistence oxidační kapacita IMCL ve svalu.

Absence vlivu telmisartanu na koncentrace IMCL nemusí být v rozporu se studií (116) provedenou na myším modelu. Ve výše uvedené studii byla ke stanovení koncentrace lipidů použita biochemická technika s homogenizací odebraného vzorku svalové tkáně. Výsledná stanovená koncentrace svalových lipidů tedy odpovídá sumě koncentrací EMCL a IMCL. Koncentrace lipidů určená touto biochemickou technikou odpovídá především koncentraci EMCL, protože množství lipidů v mezisvalových septech je mnohem větší než koncentrace lipidů ve svalech. Koncentrace EMCL měřená spektroskopicky však výrazně závisí na množství svalových sept v měřeném voxelu. Vzhledem k tomu, že se při měření snažíme vybírat voxel tak, abychom zabrali co nejméně mezisvalových sept, nemuselo být případné snížení obsahu tuku v mezisvalových septech na signálech EMCL pozorovatelné.

Absence vlivu telmisartanu na koncentrace adiponektinu však výsledkům výše uvedené studie (116) neodpovídá a je těžko vysvětlitelná rozdílností laboratorních metodik. Možný pozitivní vliv telmisartanu na koncentrace ektopických lipidů byl publikován ⁽¹¹⁷⁾. Proto je výsledek naší studie do jisté míry v rozporu s očekáváním. V současné době na našem pracovišti probíhá obdobná, ale podrobnější studie s déletrvajícím intervalem podávání telmisartanu (6 týdnů) a vyšším počtem MR vyšetření (6 vyšetření během celého pokusu). Dokončení studie s déletrvajícím podáváním telmisartanu může pomoci otázku mechanismu účinku této látky vyjasnit.

4.3.4 Závěr

Neprokázali jsme, že telmisartan, podávaný po dobu 3 týdnů, významně ovlivnil množství EMCL a IMCL v *m. tibialis anterior* u subjektů s poruchou glukosové tolerance.

5 Souhrn dizertační práce, závěr

Magnetická rezonance je technika, která má všestranné použití. Od prvních aplikací pro zobrazování anatomie centrálního nervového systému našla v klinické praxi a výzkumu své místo i ve studiu srdce, jater, prostaty, svalu a dalších tkání. Kromě klasického zobrazování T1, T2 a proton-denzitními obrazy našly své uplatnění techniky spektroskopické, techniky difuzně váženého zobrazování, perfuzní techniky, angiografické a další. Cílem této dizertační práce bylo studium kosterního svalu pomocí technik MR spektroskopie a MR zobrazování.

V první studii popsané v experimentální části této dizertační práce bylo technik analýzy textury úspěšně použito při klasifikaci MR obrazů kosterních svalů pacientů a zdravých dobrovolníků. Prokázali jsme, že analýza textury může sloužit jako pomocný nástroj při klasifikaci stupně postižení kosterního svalu nemocných s myopatiemi. V této studii bylo využito klasické zobrazení T1 a T2 váženými obrazy, které je na našem pracovišti prováděno jako klinické vyšetření již několik let. Naše výzkumná skupina spolupracuje na společném evropském projektu COST B21, jehož hlavním cílem je studium aplikace technik analýzy textury na MR obrazech. Studie byla důležitou součástí tohoto mezinárodního projektu.

Druhá část dizertační práce se zabývala použitím techniky ^1H MR spektroskopie pro studium metabolismu kosterního svalu. Technika MR spektroskopie umožňuje studium metabolitu, který hraje významnou úlohu v patogenezi insulinové rezistence a diabetu mellitu 2. typu – intramyocelulárních lipidů (IMCL). Druhá část práce se zabývala především metodickým postupem měření a vyhodnocení koncentrací IMCL. Byla provedena optimalizace měřicí sekvence a zavedena nová technika zpracování dat, aby bylo dosaženo co nejlepší spolehlivosti stanovení koncentrací CH_2 a CH_3 skupin IMCL. Bylo zjištěno, že významné zlepšení kvality výsledků lze získat při měření na MR přístrojích s vyšší magnetickou indukcí.

Třetí část dizertační práce byla zaměřena na praktické využití optimalizované techniky MR spektroskopie v klinické studii, která měla za cíl ověřit potenciální biochemické mechanismy vlivu léčiva telmisartanu na insulinovou senzitivitu a koncentrace IMCL. Výsledky dvojité slepé studie vliv telmisartanu na koncentrace IMCL neprokázaly.

Magnetická rezonance představuje významný nástroj pro studium patologické fyziologie i patobiochemie svalové tkáně. Do budoucna lze očekávat další vývoj a využití

této techniky. Na poli výzkumu diabetu a insulinové rezistence bude technika MR spektroskopie hrát určitě i v budoucnu významnou roli.

Části této dizertační práce byly publikovány jako odborné články v impaktovaných časopisech (36,¹¹⁸).

6 Matematická příloha

Níže jsou uvedeny vzorce pro výpočet texturních příznaků. Z původně velkého počtu příznaků jsou vypsány vzorce těch, které byly vybrány jako klasifikátory ve výše uvedené studii TA svalů lýtka a byly vypočteny pomocí programu MaZda (bližší údaje lze nalézt v literatuře a v manuálu k programu MaZda) (23,39,92).

6.1 Příznaky kookurenční matice (Haralickovy příznaky)

Příklad výpočtu kookurenční matice je popsán v teoretické části. Tato matice je vždy počítána pro všechny páry pixelů v ROI, definovaných separačním vektorem, tj. ležící od sebe ve vzdálenosti d a ve směru θ . Tato matice je čtvercová, o velikosti rovné N_g což je rozsah diskretních hodnot intenzit, které pixely mohou dosahovat. Jestliže prvky této matice vydělíme celkovým počtem párů pixelů R , splňujících v ROI podmínku separačního vektoru, tak se tato matice stane maticí pravděpodobnosti $p_{d\theta}(i,j)$, že dva pixely vzdálenosti d a ve směru θ mají své intenzity rovné hodnotám i a j . V programu MaZda jsou počítány kookurenční matice pro separační vektor $d = 1,2,3,4$ a 5 a $\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ a 135° . Z této skupiny byly pro klasifikaci MR obrazů lýtka použity příznaky *SumAverg* a *InvDfMom*.

Sum average (SumAverg)

$$SumAverg = \sum_{k=2}^{2N_g} k p_{x+y}(k) \quad [6.1]$$

kde

$$p_{x+y}(k) = \frac{1}{R} \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{\substack{j=1 \\ k=i+j}}^{N_g} p(i,j) \quad k = 2,3,\dots,2N_g \quad [6.2]$$

Inverse difference moment (InvDfMom)

$$InvDfMom = \frac{1}{R} \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i,j) \quad [6.3]$$

6.2 Příznaky *run-length* matice

Nechť $p(i,j)$ je pravděpodobnost výskytu řetězce (*run*) o délce j a intenzitě i . Nechť je N_g diskrétní rozsah intenzit pixelů a N_r je celkový počet řetězců. Z této skupiny byl pro klasifikaci MR obrazů lýtka použit příznak *ShrtREmp*.

Short run emphasis inverse moments (ShrtREmp)

$$ShrtREmp = \frac{\sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_r} \frac{p(i,j)}{j^2}}{\sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_r} p(i,j)} \quad [6.4]$$

7 Publikace autora dizertační práce

7.1 Publikace autora týkající se tématu dizertační práce

Škoch A, Jiráček D, Vyhnánovská P, Dezortová M, Fendrych P, Rolencová E, Hájek M. Classification of calf muscle MR images by texture analysis. *Magn Reson Mater Phy*. 2004;16(6):259-267.

Škoch A, Jirů F, Dezortová M, Krušinová E, Kratochvílová S, Pelikánová T, Grodd W, Hájek M. Intramyocellular lipid quantification from ¹H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCMoDel technique. *J Magn Reson Imaging*. 2006;23(5):728-735.

7.2 Ostatní publikace

Dezortová M, Taimr P, **Škoch A**, Spicák J, Hájek M. Etiology and functional status of liver cirrhosis by ³¹P MR spectroscopy. *World J Gastroenterol*. 2005;11(44):6926-31.

Hájek M, Adamovičová M, Herynek V, **Škoch A**, Jirů F, Křepelová A, Dezortová M. MR relaxometry and ¹H MR spectroscopy for the determination of iron and metabolite concentrations in PKAN patients. *Eur Radiol*. 2005;15(5):1060-1068.

Jirů F, **Škoch A**, Klose U, Grodd W, Hájek M. Error images for spectroscopic imaging by LCMoDel using Cramer-Rao bounds. *Magn Reson Mater Phy*. 2006;19(1):1-14.

Krsek P, Hájek M, Dezortová M, Jirů F, **Škoch A**, Marusic P, Zamecník J, Kyncl M, Tichý M, Komárek V. ¹H MR spectroscopic imaging in patients with MRI-negative extratemporal epilepsy: Correlation with ictal onset zone and histopathology. *Eur Radiol*. (přijato k tisku)

Fojtíková D, Brázdil M, **Škoch A**, Jirů F, Horký J, Krupa P, Rektor I. Magnetic resonance spectroscopy of the thalamus in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. (v přípravě)

8 Literatura

- ¹ Weis J, Bořuta P. Úvod do magnetickej rezonancie. Goen, Bratislava 1998.
- ² Jírů F. Studie různých metabolických onemocnění mozku pomocí ¹H MR spektroskopie. Diplomová práce, Praha 2000.
- ³ Haacke E, Brown R, Thompson MR, Venkatesan R. Magnetic resonance imaging, physical principles and sequence design. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto 1999.
- ⁴ de Graaf RA. In vivo NMR spectroscopy, principles and techniques. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto 1998.
- ⁵ <http://www.spectroscopynow.com/>
- ⁶ <http://www.wikipedia.org>
- ⁷ Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 508:333-348.
- ⁸ Frahm J, Bruhn H, Gyngell ML, Merboldt KD, Hanicke W, Sauter R. Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo. *Magn Reson Med.* 1989; 9(1):79-93.
- ⁹ Romanovský A a kol. Obecná biologie. SPN, Praha 1985.
- ¹⁰ Dylevský I, Kubálková L, Navrátil L. Kineziologie, kineziterapie a fyzioterapie. Manus, Praha 2001.
- ¹¹ Mumenthaler M, Mattle H. Neurologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1997.
- ¹² Bulcke JAL, Baert AL. Clinical and radiological aspects of myopathies. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1982.
- ¹³ Lovitt S, Marden FA, Gundogdu B, Ostrowski ML. MRI in myopathy. *Neurol Clin.* 2004; 22(3):509-538.
- ¹⁴ Scott DL, Kingsley GH. Use of imaging to assess patients with muscle disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2004; 16(6):678-683.
- ¹⁵ Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(7-8):809-823.
- ¹⁶ Tourassi GD. Journey toward computer-aided diagnosis: role of image texture analysis. *Radiology.* 1999; 213(2):317-320.
- ¹⁷ Robinson PJ. Radiology's Achilles' heel: error and variation in the interpretation of the Rontgen image. *Br J Radiol.* 1997; 70(839):1085-1098.
- ¹⁸ Julesz B, Gilbert EN, Shepp LA, Frisch HL. Inability of humans to discriminate between visual textures that agree in second-order statistics-revisited. *Perception.* 1973; 2(4):391-405.
- ¹⁹ Cambridge Advanced Learner's dictionary. Cambridge University Press 2005.
- ²⁰ Slovník cizích slov. SPN, Praha 2004.
- ²¹ Tamura H, Mori S, Yamawaki T. Textural features corresponding to visual perception. *IEEE Trans Syst Man Cybern.* 1978; 8:460-473.
- ²² Lerski RA, Straughan K, Schad LR, Boyce D, Bluml S, Zuna I. MR image texture analysis--an approach to tissue characterization. *Magn Reson Imaging.* 1993; 11(6):873-887.
- ²³ Elliat P-A, Mahmoud-Ghoneim D, de Certaines JD. Texture analysis and metabolic magnetic resonance imaging. *Trends in Applied Spectroscopy.* 2002; 4:25-44.
- ²⁴ Haralick R., Shanmugam K., Dinstein I. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics.* 1973; SMC- 3(6):610-621.
- ²⁵ Schuster E, Knoflach P, Grabner G. Local texture analysis: an approach to differentiating liver tissue objectively. *J Clin Ultrasound.* 1988; 16(7):453-461.
- ²⁶ Smutek D, Sara R, Sucharda P, Tjahjadi T, Svec M. Image texture analysis of sonograms in chronic inflammations of thyroid gland. *Ultrasound Med Biol.* 2003; 29(11):1531-1543.
- ²⁷ Chen DR, Chang RF, Kuo WJ, Chen MC, Huang YL. Diagnosis of breast tumors with sonographic texture analysis using wavelet transform and neural networks. *Ultrasound Med Biol.* 2002; 28(10):1301-1310.
- ²⁸ Mohamed SS, Salama MM, Kamel M, El-Saadany EF, Rizkalla K, Chin J. Prostate cancer multi-feature analysis using trans-rectal ultrasound images. *Phys Med Biol.* 2005;

50(15):N175-185.

- ²⁹ Kerut EK, Given MB, McIlwain E, Allen G, Espinoza C, Giles TD. Echocardiographic texture analysis using the wavelet transform: differentiation of early heart muscle disease. *Ultrasound Med Biol*. 2000; 26(9):1445-1453.
- ³⁰ Kim DY, Park JW. Computer-aided detection of kidney tumor on abdominal computed tomography scans. *Acta Radiol*. 2004; 45(7):791-795.
- ³¹ Powell GF, Doi K, Katsuragawa S. Localization of inter-rib spaces for lung texture analysis and computer-aided diagnosis in digital chest images. *Med Phys*. 1988; 15(4):581-587.
- ³² Schad LR, Bluml S, Zuna I. MR tissue characterization of intracranial tumors by means of texture analysis. *Magn Reson Imaging*. 1993; 11(6):889-896.
- ³³ Bernasconi A, Antel SB, Collins DL, Bernasconi N, Olivier A, Dubeau F, Pike GB, Andermann F, Arnold DL. Texture analysis and morphological processing of magnetic resonance imaging assist detection of focal cortical dysplasia in extra-temporal partial epilepsy. *Ann Neurol*. 2001; 49(6):770-775.
- ³⁴ [Jirak D, Dezortova M, Taimr P, Hajek M](#). Texture analysis of human liver. *J Magn Reson Imaging*. 2002; 15(1):68-74.
- ³⁵ Herlidou S, Rolland Y, Bansard JY, Le Rumeur E, de Certaines JD. Comparison of automated and visual texture analysis in MRI: characterization of normal and diseased skeletal muscle. *Magn Reson Imaging*. 1999; 17(9):1393-1397.
- ³⁶ Skoch A, Jirak D, Vyhnanovska P, Dezortova M, Fendrych P, Rolencova E, Hajek M. Classification of calf muscle MR images by texture analysis. *Magn Reson Mater Phy*. 2004; 16(6):259-267.
- ³⁷ Castellano G, Bonilha L, Li LM, Cendes F. Texture analysis of medical images. *Clin Radiol*. 2004; 59(12):1061-1069.
- ³⁸ Sucharda P, Smutek D, Šára R. Analýza textury ultrasonogramů – nová kvalita v diagnostice tyreopatií? *Časopis lékařů českých*. 2004; 143(1):15-20.
- ³⁹ Materka A, Strzelecky M. Texture analysis methods - a review. *Technical University of Lodz 1998, COST B11 - technical report*. 1998; 11:873-887.; http://www.eletel.p.lodz.pl/cost/pdf_1.pdf
- ⁴⁰ Haralick R. Statistical and structural approaches to texture. *Proc. IEEE* 1979; 67(5):786-804.
- ⁴¹ Kayser K, Gabius HJ. The application of thermodynamic principles to histochemical and morphometric tissue research: principles and practical outline with focus on the glycosciences. *Cell Tissue Res*. 1999; 296(3):443-455.
- ⁴² Weyn B, Tjalma W, Van De Wouwer G, Van Daele A, Scheunders P, Jacob W, Van Marck E. Validation of nuclear texture, density, morphometry and tissue syntactic structure analysis as prognosticators of cervical carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol*. 2000; 22(5):373-382.
- ⁴³ Hájek M, Dezortová M, Materka A, Lerski R (eds). *Texture Analysis for Magnetic Resonance Imaging*. Med4publishing, Prague 2006.
- ⁴⁴ http://cmp.felk.cvut.cz/cmp/courses/dzo/resources/lecture_texture_sara.pdf
- ⁴⁵ Galloway M. Texture Analysis Using Gray Level Run Lengths. *Computer Graphics and Image Processing*. 1975; 4:172-179.
- ⁴⁶ Weszka J, Deya C and Rosenfeld A. A Comparative Study of Texture Measures for Terrain Classification. *IEEE Trans. System, Man and Cybernetics*. 1976; 6:269-285.
- ⁴⁷ Julesz B. Experiments in the Visual Perception of Texture. *Scientific American*. 1975; 232(4): 34-43.
- ⁴⁸ http://www.fit.vutbr.cz/~tisnovpa/fract/clanky/1.htm.cs#tth_sEc1.3.1
- ⁴⁹ Majumdar S, Lin J, Link T, Millard J, Augat P, Ouyang X, Newitt D, Gould R, Kothari M, Genant H. Fractal analysis of radiographs: assessment of trabecular bone structure and prediction of elastic modulus and strength. *Med Phys*. 1999; 26(7):1330-1340.
- ⁵⁰ Hu Y, Dennis T. Textured image segmentation by context enhanced clustering. *IEE Proc-Visual Image and Signal Processing*. 1994; 141(6):413-421.
- ⁵¹ Hassner M, Sklansky J. The use of Markov random fields as models of texture. In: Rosenfeld A. *Image Modelling*. Academic Press, 1981:185-198.

- ⁵² Derin H, Elliot H. Modeling and segmentation of noisy and textured images using Gibbs random fields. *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 1987; 9:1:39-55.
- ⁵³ Gregory JS, Stewart A, Undrill PE, Reid DM, Aspden RM. Identification of hip fracture patients from radiographs using Fourier analysis of the trabecular structure: a cross-sectional study. *BMC Med Imaging*. 2004; 4(1):4.
- ⁵⁴ Jafari-Khouzani K, Soltanian-Zadeh H. Rotation-invariant multiresolution texture analysis using radon and wavelet transforms. *IEEE Trans Image Process*. 2005; 14(6):783-795.
- ⁵⁵ Mahmoud-Ghoneim D, Toussaint G, Constans JM, de Certaines JD. Three dimensional texture analysis in MRI: a preliminary evaluation in gliomas. *Magn Reson Imaging*. 2003; 21(9): 983-987.
- ⁵⁶ Jiráček D, Dezortová M, Hájek M. Phantoms for texture analysis of MR images. Long-term and multi-center study. *Med Phys*. 2004; 31(3):616-622.
- ⁵⁷ Schuerman J. Pattern classification, John Wiley & Sons, 1996.
- ⁵⁸ Mucciardi A, Gose E. A comparison of seven techniques for choosing subsets of pattern recognition properties. *IEEE Trans Comput*. 1971; 20:1023-1031.
- ⁵⁹ Meloun M, Militký J: Statistická analýza experimentálních dat. Academia, Praha 2004.
- ⁶⁰ Massart DL. Chemometrics: a textbook. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1988.
- ⁶¹ Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. W.H. Freeman, New York 2006.
- ⁶² Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry JD, Stein DT. Measurement of intracellular triglyceride stores by H spectroscopy: validation in vivo. *Am J Physiol*. 1999; 276:E977-989.
- ⁶³ Thomas EL, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Dore CJ, Goldin RD, Bell JD, Taylor-Robinson SD. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut*. 2005; 54(1):122-127.
- ⁶⁴ Howald H, Boesch C, Kreis R, Matter S, Billeter R, Essen-Gustavsson B, Hoppeler H. Content of intramyocellular lipids derived by electron microscopy, biochemical assays, and (1)H-MR spectroscopy. *J Appl Physiol*. 2002; 92(6):2264-2272.
- ⁶⁵ Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10(1):51-58.
- ⁶⁶ Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Holm C, Galbo H. Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle. *Biochem J*. 2000; 351:207-214.
- ⁶⁷ Langfort J, Ploug T, Ihlemann J, Saldo M, Holm C, Galbo H. Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. *Biochem J*. 1999; 340:459-465.
- ⁶⁸ Reaven GM. The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem*. 2005; 51(6):931-938.
- ⁶⁹ Roden M. Muscle triglycerides and mitochondrial function: possible mechanisms for the development of type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29 Suppl 2:S111-115.
- ⁷⁰ Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004; 350(7):664-671.
- ⁷¹ Cooney GJ, Thompson AL, Furler SM, Ye J, Kraegen EW. Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 967:196-207.
- ⁷² Schick F, Eismann B, Jung WI, Bongers H, Bunse M, Lutz O. Comparison of localized proton NMR signals of skeletal muscle and fat tissue in vivo: two lipid compartments in muscle tissue. *Magn Reson Med*. 1993; 29:158-167.
- ⁷³ [Kreis R](#), [Boesch C](#). Liquid-crystal-like structures of human muscle demonstrated by in vivo observation of direct dipolar coupling in localized proton magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson B*. 1994; 104(2):189-192.
- ⁷⁴ [Kreis R](#), [Boesch C](#). Spatially localized, one- and two-dimensional NMR spectroscopy and in vivo application to human muscle. *J Magn Reson B*. 1996; 113(2):103-118.
- ⁷⁵ Kreis R, Koster M, Kamber M, Hoppeler H, Boesch C. Peak assignment in localized ¹H MR spectra of human muscle based on oral creatine supplementation. *Magn Reson Med*. 1997; 37(2): 159-163.

- ⁷⁶ Boesch C, Slotboom J, Hoppeler H, Kreis R. In vivo determination of intramyocellular lipids in human muscle by means of localized ¹H-MR-spectroscopy. *Magn Reson Med.* 1997; 37(4): 484-493.
- ⁷⁷ Chu SC, Xu Y, Balschi JA, Springer CS Jr. Bulk magnetic susceptibility shifts in NMR studies of compartmentalized samples: use of paramagnetic reagents. *Magn Reson Med.* 1990; 13(2): 239-262.
- ⁷⁸ Szczepaniak LS, Dobbins RL, Stein DT, McGarry JD. Bulk magnetic susceptibility effects on the assessment of intra- and extramyocellular lipids in vivo. *Magn Reson Med.* 2002; 47(3): 607-610.
- ⁷⁹ van Loon LJ. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2004; 97:1170-1187.
- ⁸⁰ Vermathen P, Kreis R, Boesch C. Distribution of intramyocellular lipids in human calf muscles as determined by MR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med.* 2004; 51(2):253-262.
- ⁸¹ Vermathen P, Boesch C, Kreis R. Mapping fiber orientation in human muscle by proton MR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med.* 2003; 49(3):424-432.
- ⁸² Steidle G, Machann J, Claussen CD, Schick F. Separation of intra- and extramyocellular lipid signals in proton MR spectra by determination of their magnetic field distribution. *J Magn Reson.* 2002;154(2):228-235.
- ⁸³ Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia.* 1999; 42(1):113-116. Erratum in: *Diabetologia.* 1999; 42(3):386. *Diabetologia.* 1999; 42(10):1269.
- ⁸⁴ Jacob S, Machann J, Rett K et al. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 1999; 48:1113-1119.
- ⁸⁵ Thamer C, Machann J, Bachmann O et al. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:1785-1791.
- ⁸⁶ Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism.* 2000; 49:467-472.
- ⁸⁷ Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P, Hesselink MK, van Engelshoven JM, Nicolay K, Saris WH, Kessels AG, Kooi ME. The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(4):1610-1616.
- ⁸⁸ Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 5755-5761.
- ⁸⁹ Kreis R, Jung B, Rotman S, Slotboom J, Boesch C. Non-invasive observation of acetylgroup buffering by ¹H-MR spectroscopy in exercising human muscle. *NMR Biomed.* 1999; 12:471-476.
- ⁹⁰ Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med.* 1993; 30:672-679.
- ⁹¹ Hajek M, Burian M, Dezortova M. Application of LCModel for quality control and quantitative in vivo ¹H MR spectroscopy by short echo time STEAM sequence. *Magn Reson Mater Phy.* 2000;10(1):6-17.
- ⁹² http://www.eletel.p.lodz.pl/cost/progr_mazda.html
- ⁹³ Meloun M, Militký J, Forina M. Chemometrics For Analytical Chemistry: Volume I and II: PC-Aided Statistical data Analysis. Prentice Hall PTR; USA 1992.
- ⁹⁴ <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>
- ⁹⁵ Meloun M, Militký J. Kompendium statistického zpracování dat Academia, Praha 2002.
- ⁹⁶ Hajek M, Grosmanova A, Horska 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; 3:499-506.

- ⁹⁷ [Andersen H, Gadeberg PC, Brock B, Jakobsen J](#). Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia*. 1997; 40(9):1062-1069.
- ⁹⁸ [Andersen H, Poulsen PL, Mogensen CE, Jakobsen J](#). Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. *Diabetes*. 1996; 45(4):440-445.
- ⁹⁹ [Bus SA, Yang QX, Wang JH, Smith MB, Wunderlich R, Cavanagh PR](#). Intrinsic muscle atrophy and toe deformity in the diabetic neuropathic foot: a magnetic resonance imaging study. *Diabetes Care*. 2002; 25(8):1444-1450.
- ¹⁰⁰ Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*. 1999; 48:1600-1606.
- ¹⁰¹ Kuhlmann J, Neumann-Haefelin C, Belz U, Kalisch J, Juretschke HP, Stein M, Kleinschmidt E, Kramer W, Herling AW. Intramyocellular lipid and insulin resistance: a longitudinal in vivo ¹H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*. 2003; 52:138-144.
- ¹⁰² Slotboom J, Boesch C, Kreis R. Versatile frequency domain fitting using time domain models and prior knowledge. *Magn Reson Med*. 1998; 39:899-911.
- ¹⁰³ <http://www.s-provencher.com/pages/lcm-manual.shtml>
- ¹⁰⁴ Torriani M, Thomas BJ, Halpern EF, Jensen ME, Rosenthal DI, Palmer WE. Intramyocellular lipid quantification: repeatability with ¹H MR spectroscopy. *Radiology*. 2005; 236(2):609-614.
- ¹⁰⁵ <http://www.mrui.uab.es/mrui>
- ¹⁰⁶ Misra A, Sinha S, Kumar M, Jagannathan NR, Pandey RM. Proton magnetic resonance spectroscopy study of soleus muscle in non-obese healthy and Type 2 diabetic Asian Northern Indian males: high intramyocellular lipid content correlates with excess body fat and abdominal obesity. *Diabet Med*. 2003; 20:361-367.
- ¹⁰⁷ Jagannathan NR, Wadhwa S. In vivo proton magnetic resonance spectroscopy (MRS) study of post polio residual paralysis (PPRP) patients. *Magn Reson Imaging*. 2002; 20:113-117.
- ¹⁰⁸ DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979; 237:E214-E223.
- ¹⁰⁹ Chmurny GN, Hoult DI. The ancient and honourable art of shimming. *Concepts in Magnetic Resonance*. 1990; 2:131-149.
- ¹¹⁰ Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci*. 1987; 508:333-348.
- ¹¹¹ Magnetom VISION Spectroscopy Guide, Siemens AG, Erlangen 1994.
- ¹¹² Boesch C, Kreis R. Dipolar coupling and ordering effects observed in magnetic resonance spectra of skeletal muscle. *NMR Biomed*. 2001; 14(2):140-148.
- ¹¹³ Jiru F, Dezortova M, Burian M, Hajek M. The role of relaxation time corrections for the evaluation of long and short echo time ¹H MR spectra of the hippocampus by NUMARIS and LCModel techniques. *Magn Reson Mater Phy*. 2003; 16(3):135-143.
- ¹¹⁴ Millis KK, Maas WE, Cory DG, Singer S. Gradient, high-resolution, magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy of human adipocyte tissue. *Magn Reson Med*. 1997; 38:399-403.
- ¹¹⁵ Scheen AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab*. 2004; 30(6): 498-505.
- ¹¹⁶ Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension*. 2006;48(1):51-57.
- ¹¹⁷ Sharma AM. Telmisartan: the ACE of ARBs? *Hypertension*. 2006;47(5):822-823.
- ¹¹⁸ Skoch A, Jiru F, Dezortova M, Krusinova E, Kratochvilova S, Pelikanova T, Grodd W, Hajek M. Intramyocellular lipid quantification from ¹H long echo time spectra at 1.5 and 3 T by means of the LCModel technique. *J Magn Reson Imaging*. 2006;23(5):728-735.