



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

FIXACE BIOLOGICKÝCH VZORKŮ

FIXATION OF THE BIOLOGICAL SAMPLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARTIN BRACHTL

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LUCIE GROSSOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Student: Bc. Martin Brachtl

ID: 125734

Ročník: 2

Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

Fixace biologických vzorků

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Vytvořte literární rešerši na téma možnosti fixace biologických vzorků pro MRI měření. 2) Vyberte vhodný biologický vzorek a proveďte jeho fixaci pomocí formaldehydu. 3) Proveďte sérii měření pro zjištění vlivu formaldehydu na relaxační vlastnosti daného biologického vzorku. 4) Proveďte fixaci biologického vzorku pomocí dalších několika roztoků. 5) Vyberte vhodnou pulsní sekvenci a proveďte sérii měření jednotlivých zafixovaných vzorků. 6) Na základě MRI měření navrhnete a zrealizujete systém hodnocení jednotlivých fixátorů. 7) Výsledky vyhodnotíte a provedete diskusi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] BERNSTEIN, Matt A, Kevin Franklin KING a Ziaohong Joe ZHOU. Handbook of MRI pulse sequences: principles and techniques. 2nd ed. Boston: AcademicPress, 2004, 1017 p. ISBN 01-209-2861-2.

[2] SUNG, Hsing Wen, et al. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. Journal of biomedical materials research, 1998, 42.4: 560-567.

Termín zadání: 9.2.2015

Termín odevzdání: 22.5.2015

Vedoucí práce: Ing. Lucie Grossová

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Cílem diplomové práce je seznámit se s možností fixace biologických vzorků. Vybrat a fixovat vhodnou tkáň pomocí formaldehydu a dalšího fixačního prostředku. V neposlední řadě provést měření pro zjištění vlivu formaldehydu a dalšího fixačního prostředku na relaxační vlastnosti daného biologického vzorku.

Myší mozky byly vybrány jako vhodná tkáň pro fixaci. Měření vlivu formaldehydu a dalšího fixačního prostředku na relaxační vlastnosti tkáně probíhalo na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky.

Klíčová slova

MRI, formaldehyd, fixace, imerzní metoda fixace, perfuzní metoda fixace, genipin

Abstract

The aim of thesis is acquaint with possibilities of fixation biological tissues. Choose a suitable tissue and fix it with formaldehyde and another fixator. Last but not least make measurements which determine effects of formaldehyde on the relaxation time of biological tissues.

Mice brains were chosen as a suitable for tissues fixation. Measuring effects of formaldehyde and another fixator to relaxation time carried out at the Institute of Scientific Instruments Academy of Sciences of the Czech Republic.

Keywords

MRI, formaldehyde, fixation, immerion fixation method, perfusion fixation method, genipin

BRACHTL, M. *Fixace biologických vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 59 s., 12 s. příloh. Diplomová práce. Vedoucí práce: Ing. Lucie Grossová.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Fixace biologických vzorků jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

(podpis autora)

Poděkování

Rád bych poděkoval celé mojí rodině, která mi dávala velkou psychickou podporu při celém studiu na vysoké škole.

Na tomto místě bych také rád poděkoval vedoucí diplomové práce Ing. Lucii Grossové, za to, jakou se mnou měla trpělivost v začátcích měření. Také za cenné rady a informace, které mi během dlouhých hodin měření poskytla.

V Brně dne

(podpis autora)

Obsah|

Seznam obrázků.....	vi
Seznam tabulek.....	viii
Úvod.....	1
1. Fyzikální princip magnetické rezonance.....	2
2. Radiofrekvenční budící pulz.....	5
2.1. Relaxační mechanismy	6
2.1.1. Spin – mřížková relaxace	6
2.1.2. Spin – spinová relaxace	7
2.2. Volně indukovaný signál	8
3. Pulsní sekvence	9
3.1. <i>Inversion Recovery</i>	9
3.2. <i>Saturation Recovery</i>	10
3.3. Spinové Echo	11
3.3.1. RARE sekvence.....	11
3.4. Gradientní echo.....	12
3.5. T ₁ a T ₂ relaxometrie	12
3.5.1. Základní principy relaxačních měření	12
4. Fixace	14
4.1. Fyzikální metody fixace.....	14
4.2. Chemické metody fixace	15
4.2.1. Faktory ovlivňující chemickou fixaci.....	15
4.2.2. Chemické látky užívané pro fixaci	16
4.2.3. Přírodní látky používané pro fixaci	20
5. Experimentální část.....	22
5.1. Výběr tkáně pro fixaci	22
5.1.1. Odebrání mozku a fixace tkáně	23
5.2. Vložení mozku do systému, snímkování	25

5.2.1. Získávání mapy obrazů pro zjištění relaxačního času T_1	29
5.3. Naměřená data – fixátor paraformaldehyd	31
5.3.1. Tabulky s naměřenými daty - fixátor paraformaldehyd	33
5.3.2. Zhodnocení naměřených dat - fixátor paraformaldehyd	35
5.4. Naměřená data - fixátor genipin	45
5.4.1. Tabulky s naměřenými daty - fixátor genipin	47
5.4.2. Zhodnocení naměřených dat - fixátor genipin.....	47
5.4.3. Možné příčiny špatné fixace.....	49
5.5. Programová část.....	50
5.5.1. Uživatelské prostředí	50
5.5.2. Funkce <i>Tjednicka.m</i>	52
Diskuze.....	55
Závěr	57
Seznam použité literatury	59
Seznam použitých zkratk	62
Seznam příloh	63
Příloha 1	64
Příloha 2	72

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Orientace os rotace bez působení vnějšího magnetického pole vlevo, vpravo pak ukázka dvou energetických stavů při působení vnějšího homogenního magnetického pole B_0 , převzato z [4].	3
Obrázek 2 - Proton ve vnějším magnetickém poli vykazující precesi, převzato z [5].	4
Obrázek 3 - Časový průběh T_1 relaxace – T_1 relaxační křivka, převzato z [1].	7
Obrázek 4 - Časový průběh vektoru magnetizace M_{xy} po aplikaci 90° RF pulzu, převzato z [1].	7
Obrázek 5 - Průběh volně indukovaného signálu, převzato z [3].	8
Obrázek 6 - Znázornění aplikace pulsů při metodě <i>Inversion Recovery</i> , převzato z [[16].	9
Obrázek 7 - Znázornění vektoru podélné magnetizace při metodách IR a SR, převzato z [[16].	10
Obrázek 8 - Sekvence SE s ukázkou aplikace 90° a 180° (refokuzacího) pulzů [[16].	11
Obrázek 9 - Strukturní vzorec glutaraldehydu, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	17
Obrázek 10 - Strukturní vzorec formaldehydu, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	17
Obrázek 11 - Strukturní vzorec paraformaldehydu, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	18
Obrázek 12 - Strukturní vzorec glyoxalu, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	18
Obrázek 13 - Strukturní vzorec kyseliny pikrové, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	19
Obrázek 14 - Strukturní vzorec oxidu osmičelého, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	20
Obrázek 15 - Strukturní vzorec genipinu, vytvořeno v <i>ChemDraw</i> .	20
Obrázek 16 - Snímky fibroblastů (100x zvětšené), převzato z [11].	21
Obrázek 17 - Bruker BioSpec 94/30 USR.	22
Obrázek 18 - Nefixovaný myší mozek, převzato z [17].	23
Obrázek 19 - V pořadí třetí mozek fixovaný imerzní metodou pomocí paraformaldehydu.	23
Obrázek 20 - V pořadí šestý myší mozek fixovaný perfuzní metodou pomocí paraformaldehydu.	23
Obrázek 21 - Postup při perfuzní metodě fixace mozku, převzato z [13].	25
Obrázek 22 - Kontrolní mozek (A) a mozek uložený ve Fomblinu (B), převzato z [[15].	26
Obrázek 23 - Koronární řez myším mozkiem (třetí mozek v první sérii měření, imerzní fixace).	28
Obrázek 24 - Koronární řez myším mozkiem (čtvrtý mozek v první sérii měření, imerzní fixace).	28
Obrázek 25 - Koronární řez myším mozkiem (pátý mozek v první sérii měření, perfuzní fixace).	29
Obrázek 26 – Výsledné obrazy po provedení RARE sekvence s různými TR a se stejným TE (třetí mozek v první sérii, imerzní metoda fixace).	30
Obrázek 27 - Výběr oblasti pomocí křivky ROI (zelená a žlutá barva).	31

Obrázek 28 – Pátý mozek fixovaný perfuzní metodou ukázán v časovém horizontu čtyř měsíců (sekvence RARE).....	33
Obrázek 29 - Histogram pro první mozek, levý <i>hippokampus</i> (imerzní metoda fixace). ...	36
Obrázek 30 - Histogram pro šestý mozek, pravý <i>hippokampus</i> (perfuzní metoda fixace).	37
Obrázek 31 - Histogram pro třetí mozek, <i>corpus callosum</i> (imerzní metoda fixace).	37
Obrázek 32 - Histogram pro sedmý mozek, <i>corpus callosum</i> (perfuzní metoda fixace). ...	38
Obrázek 33 - P-P graf, sedmý mozek (perfuzní metoda fixace), <i>corpus callosum</i> , který porovnává naměřená data s normálním rozložením.	39
Obrázek 34 – Rozhodovací schéma pro výběr vhodného testu (testování dvou a více skupin), převzato a upraveno z [19].	39
Obrázek 35 – Fixovaný myší mozek ponechaný v <i>craniu</i> , imerzní metoda fixace – fixátor genipin, první mozek v první sérii měření.....	46
Obrázek 36 - Anatomická struktura pátého myšího mozku v první sérii měření, imerzní metoda fixace (30. 4. 2015).	48
Obrázek 37 - Anatomická struktura pátého myšího mozku ve druhé sérii měření, imerzní metoda fixace (13. 5. 2015).	48
Obrázek 38 – Myší <i>cranium</i> po třináctidenní fixaci genipinem.	49
Obrázek 39 – Uživatelské rozhraní programu <i>Mapa GUI</i>	51
Obrázek 40 – Výsledná mapa relaxačních časů T_1 v uživatelském prostředí.	51
Obrázek 41 – Pseudobarevný obraz výsledné mapy s relaxačními časy T_1 (třetí mozek, imerzní fixace, měřeno dne 16. 4. 2015)	52

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Nejvíce využívané atomy pro zobrazování [1].	2
Tabulka 2 - Parametry sekvence TriPilotMulti.	27
Tabulka 3 – Parametry sekvence T2w RARE pro anatomické obrazy.	27
Tabulka 4 - Parametry sekvence RARA-VRT.	29
Tabulka 5 - Veškerá naměřená data pro první mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda imerzní fixace.	33
Tabulka 6 - Veškerá naměřená data pro pátý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda perfuzní fixace.	34
Tabulka 7 - Veškerá naměřená data pro druhý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda imerzní fixace.	34
Tabulka 8 - Veškerá naměřená data pro šestý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda perfuzní fixace.	35
Tabulka 9 - Relaxační časy T_1 pro skupinu pravý <i>hippokampus</i> a ukázka pořadí jednotlivých hodnot.	40
Tabulka 10 - Výsledky Friedmanova testu pro pravý <i>hippokampus</i> , imerzní fixace.	41
Tabulka 11 - Výsledky Friedmanova testu pro pravý <i>hippokampus</i> , perfuzní fixace.	42
Tabulka 12 - Výsledky Friedmanova testu pro <i>corpus callosum</i> , imerzní fixace.	42
Tabulka 13 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro čtvrtý a osmý mozek.	44
Tabulka 14 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro třetí a sedmý mozek.	44
Tabulka 15 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro třetí a čtvrtý mozek.	45
Tabulka 16 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro šestý a sedmý mozek.	45
Tabulka 17 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro první mozek, imerzní fixace. ...	47
Tabulka 18 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro druhý mozek, perfuzní fixace. .	47
Tabulka 19 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro sedmý mozek, imerzní fixace. .	47
Tabulka 20 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pomocí vytvořeného programu, třetí mozek, imerzní metoda fixace.	53
Tabulka 21 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pomocí vytvořeného programu, šestý mozek, perfuzní metoda fixace.	54
Tabulka 22 - Veškerá naměřená data pro první mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda imerzní fixace.	64
Tabulka 23 - Veškerá naměřená data pro druhý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda imerzní fixace.	64
Tabulka 24 - Veškerá naměřená data pro třetí mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda imerzní fixace.	65
Tabulka 25 - Veškerá naměřená data pro čtvrtý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda imerzní fixace.	65

Tabulka 26 - Veškerá naměřená data pro pátý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda perfuzní fixace.	66
Tabulka 27 - Veškerá naměřená data pro šestý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda perfuzní fixace.	66
Tabulka 28 - Veškerá naměřená data pro sedmý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda perfuzní fixace.	67
Tabulka 29 - Veškerá naměřená data pro osmý mozek (pravý a levý <i>hippokampus</i>), metoda perfuzní fixace.	67
Tabulka 30 - Veškerá naměřená data pro první mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda imerzní fixace.	68
Tabulka 31 - Veškerá naměřená data pro druhý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda imerzní fixace.	68
Tabulka 32 - Veškerá naměřená data pro třetí mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda imerzní fixace.	69
Tabulka 33 - Veškerá naměřená data pro čtvrtý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda imerzní fixace.	69
Tabulka 34 - Veškerá naměřená data pro pátý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda perfuzní fixace.	70
Tabulka 35 - Veškerá naměřená data pro šestý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda perfuzní fixace.	70
Tabulka 36 - Veškerá naměřená data pro sedmý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda perfuzní fixace.	71
Tabulka 37 - Veškerá naměřená data pro osmý mozek (<i>corpus callosum</i>), metoda perfuzní fixace.	71
Tabulka 38 – Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro první mozek, imerzní fixace.	72
Tabulka 39 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro druhý mozek, perfuzní fixace. .	72
Tabulka 40 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro třetí mozek, imerzní fixace.	72
Tabulka 41 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro čtvrtý mozek, imerzní fixace.	72
Tabulka 42 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro pátý mozek, imerzní fixace.	73
Tabulka 43 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro šestý mozek, imerzní fixace.	73
Tabulka 44 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro sedmý mozek, imerzní fixace. .	73
Tabulka 45 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro osmý mozek, imerzní fixace. ...	73
Tabulka 46 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro devátý mozek, imerzní fixace. .	74

Úvod

Tato diplomová práce se zabývá zjišťováním vlivu formaldehydu a genipinu na relaxační vlastnosti daného biologického vzorku. Roztoky formaldehydu jsou velice oblíbená fixační činidla, která se využívají na řadě histologických pracovištích. Genipin je přírodní látka, která se získává z plodů gardénie jasmínovité a je schopná fixovat biologické vzorky.

Magnetická rezonance je hojně využívána z důvodů neinvazivnosti a také kvůli možnosti sledování případných anatomických změn ať už v lidském těle či zvířecím. Sledují se hlavně změny na měkkých tkáních, jako je například mozek.

První dvě kapitoly se zabývají základním principem MRI zobrazování, což tvoří kostru práce, která je důležitá z hlediska popisu problematiky. Ve třetí kapitole je stručný přehled pulsních sekvencí, kterých je nepřeberné množství. Čtvrtá kapitola se zabývá fixačními činidly, které se běžně používají v nejrůznějších laboratořích pro fixaci biologických vzorků. Je zde také zmínka o přírodním fixativu, které má podobné fixační vlastnosti jako formaldehyd ovšem je méně škodlivý a nebezpečný.

Experimentální část práce probíhala na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky. Experimentální části je věnována pátá kapitola, kde je nastíněn postup tvorby fixačních roztoků a to jak roztoku paraformaldehydu, tak roztoku genipinu. Jsou zde také vysvětleny dvě používané techniky fixace – imerzní metoda fixace a perfuzní metoda fixace. V neposlední řadě je zde vysvětlen a popsán postup získávání anatomických obrazů myšího mozku a měření relaxačních časů T_1 v oblasti *corpus callosum* a v oblasti levého a pravého *hippokampu*. Poslední části této kapitoly jsou věnovány statistickému zhodnocení naměřených dat ve zvolených oblastech a programu vytvořeného pro zjišťování relaxačních časů T_1 v různých oblastech myšího mozku.

1. Fyzikální princip magnetické rezonance

Fyzikální jev nazývaný nukleární magnetická rezonance (NMR) se využívá k zobrazování magnetickou rezonancí (MRI). Pro to, aby bylo možné zkoumat a lépe zobrazovat objekty, ať už lidské či zvířecí, je potřeba, aby atomy obsažené ve strukturách měly určitou vlastnost. Touto vlastností je myšlen spin (rotační pohyb částice) nabývající hodnot $+1/2$ a $-1/2$. V některých literaturách je také nazývaný moment hybnosti jádra. Tato vlastnost je pro zobrazování magnetickou rezonancí klíčová a odvíjí se od přesného složení atomového jádra. Atomová jádra, jež mají celkový moment hybnosti (součet jednotlivých spinů protonů a neutronů) nulový, neinteragují s vnějším magnetickým polem a nemohou být tedy studována - zobrazována magnetickou rezonancí. Pro zobrazení se využívají jen ta jádra, která mají liché nukleonové číslo. Tedy jádra s nenulovým celkovým momentem hybnosti. Jednoznačně nejvyužívanější atom pro zobrazení, který má liché nukleonové číslo, je atom vodíku ^1H . To především díky tomu, že je ve velké míře zastoupen v tkáních, které se skládají z vody a tuku a tedy co se týče jejich atomární úrovně i z vodíku. Stručný výčet jader, která lze zobrazit pomocí MR, je v Tabulka 1. [1]

Tabulka 1 - Nejvíce využívané atomy pro zobrazování [1].

Prvek	Počet protonů	Počet neutronů	Jaderný spin	Gyromagnetický poměr γ [MHz.T ⁻¹]
^1H	1	0	$1/2$	42,577
^3He	2	1	$1/2$	32,436
^{13}C	6	7	$1/2$	10,708
^{15}N	7	8	$1/2$	4,317
^{17}O	8	9	$5/2$	5,774
^{19}F	9	10	$1/2$	40,077
^{23}Na	11	12	$3/2$	11,268
^{31}P	15	16	$1/2$	17,251
^{129}Xe	54	75	$1/2$	11,860

Na protony lze nahlížet jako na malé rotující magnetické dipóly, které mají vlastní magnetické pole – díky tomu, že mají spin. Další vlastnost, kterou spin způsobuje, je to, že se náboj pohybuje, a pohybující se náboj je v podstatě elektrický proud, který je doprovázen magnetickým polem. Vektor magnetického momentu $\vec{\mu}$ představuje magnetické pole, které vzniklo díky rotujícímu protonu \vec{p} . Vektor $\vec{\mu}$ je popisován následující rovnicí [3]

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{p}, \quad (1.1)$$

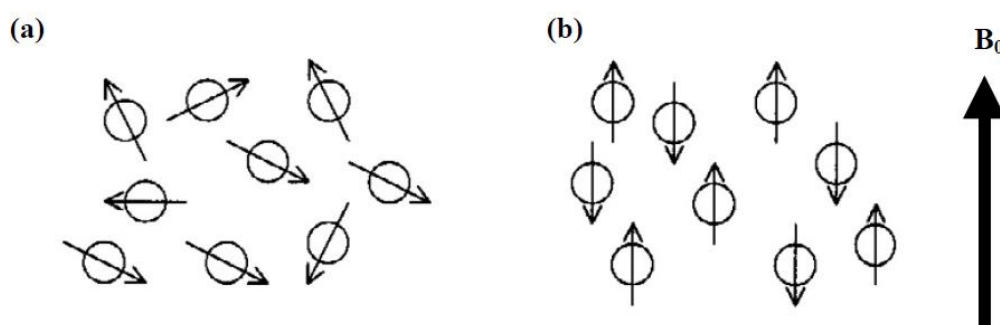
kde $\vec{\mu}$ je vektor magnetického momentu, \vec{p} je mechanický moment hybnosti a γ je gyromagnetický poměr, který je závislý na typu jádra (

Tabulka 1). [3]

Rovnici (1.1) lze interpretovat následovně: rotací elementárního elektrického náboje e^+ (proton, má kladný elementární náboj) je generován magnetický moment μ ve směru osy rotace, který je úměrný mechanickému momentu. [4]

Protony se chovají v externím magnetickém poli obdobně jako střelka kompasu v magnetickém poli Země. Rozdíl je v tom, že protony mohou být ve dvou různých energetických (kvantových) stavech. Je nutné podotknout, že bez působení vnějšího magnetického pole jsou vektory os rotace protonů náhodně orientované ve všech směrech (viz Obrázek 1 vlevo). Po součtu všech těchto vektorů je výsledný vektor roven nule - tkáň nevykazuje magnetické vlastnosti. Vystavíme-li tkáň (protony) silnému vnějšímu homogennímu magnetickému poli, dojde v zásadě k dvěma jevům. [2]

Prvním z nich je to, že se srovnají osy rotace s vnějším magnetickým polem. Protony se pak nacházejí v jednom ze dvou energetických stavů. Jeden stav je energeticky méně náročný a je označován jako paralelní. Je to stav, kdy osy rotace směřují směrem stejným, jakým působí vnější magnetické pole. Druhý stav je energeticky více náročný a je označován jako antiparalelní. Tedy stav, kdy osy rotace některých protonů směřují proti působení vnějšího magnetického pole. Přirozeně preferovaným stavem je ten, který vyžaduje méně energie. Je zřejmé, že větší množství protonů se bude nacházet na nižší energetické hladině (Boltzmannův statistický distribuční zákon). Počty protonů, které se budou v tomto stavu nacházet, závisí na intenzitě užitého pole. Výsledný vektor magnetizace bude stejně orientován jako vnější magnetické pole a bude jen nepatrně jeho hodnotu zvětšovat. [1] [2]



Obrázek 1 - Orientace os rotace bez působení vnějšího magnetického pole vlevo, vpravo pak ukázka dvou energetických stavů při působení vnějšího homogenního magnetického pole B_0 , převzato z [4].

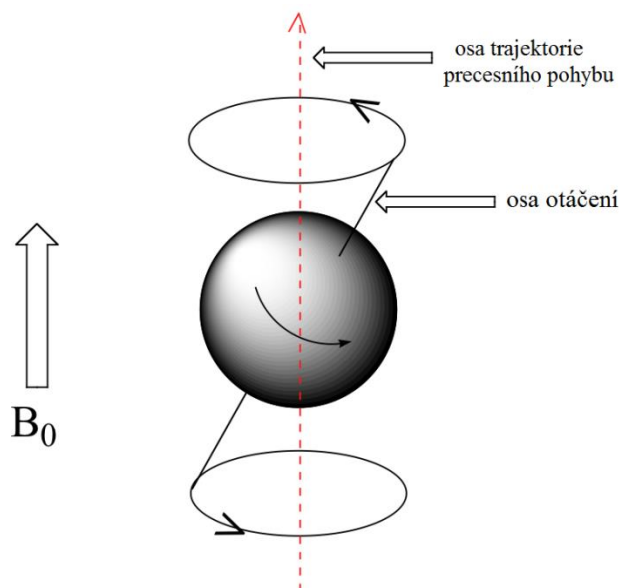
Druhý jev je pak takový, že protony, které rotují kolem vlastní osy, budou ve vnějším magnetickém poli vykazovat další pohyb. Tento pohyb je označován jako precese a lze si ho představit jako pohyb po plášti kužele (viz Obrázek 2). Rychlost precese není konstantní. Závisí na síle užitého magnetického pole a to tak, že se zvyšující

se silou magnetického pole roste rychlost, frekvence precesního pohybu. Ta se dá vypočítat pomocí Larmorova vztahu [1]

$$\omega_0 = \gamma B_0, \quad (1.2)$$

kde ω_0 je úhlová frekvence (Larmorova) otáčejícího se jádra kolem vnějšího magnetického pole B_0 , γ je gyromagnetický poměr, který je závislý na typu jádra (

Tabulka 1) [2].



Obrázek 2 - Proton ve vnějším magnetickém poli vykazující precesi, převzato z [5].

V případě, že jsou protony vystaveny vnějšímu homogennímu magnetickému poli (Obrázek 1 vpravo), bude nepatrně větší množství protonů na nižší energetické hladině - tak jak je popsáno výše. Toto množství protonů přispěje k existenci vektoru magnetizace M_z (longitudinální magnetizace) ve směru vnějšího magnetického pole. Nadbytek paralelních protonů lze vyjádřit vektorem magnetizace M_z jako [4]

$$M_z = M_0 \cdot c \frac{B_0 - N_p}{T}, \quad (1.3)$$

kde c je pro protony konstanta $c = 0,001 \text{ K} \cdot \text{T}^{-1}$, B_0 je velikost vnějšího magnetického pole, N_p je celkové množství protonů v dané oblasti a T je absolutní teplota. Vektor magnetizace M_z , jak plyne z rovnice (1.3) je přímo úměrný velikosti aplikovaného vnějšího magnetického pole B_0 a nepřímo úměrný absolutní teplotě T .

Promítneme - li moment hybnosti jádra místo do roviny z (tak jak je uvedeno výše) do roviny xy , dostaneme velikost transverzální magnetizace M_{xy} (opět vektorový součet), která je co do směru kolmá na vnější magnetické pole. Je ovšem nutné podotknout, že celkový příspěvek transverzální magnetizace je nulový ($M_{xy} = 0$), neboť jsou složky v této rovině úplně rozfázovány. [4]

Důležité je si také uvědomit, že v rovině z , tedy po směru magnetického pole, se výsledný vektor magnetizace M_z neměří. Přijímací cívka leží v rovině xy , kam vektor magnetizace sklápíme pomocí radiofrekvenčního pulzu.

2. Radiofrekvenční budící pulz

Pro to, abychom mohli měřit velikost vzniklého vektoru magnetizace v rovině z , je třeba jej překloupat z této roviny do roviny xy , kde měření probíhá. Nejjednodušší možností je využití krátkých pulzů radiofrekvenční (RF) energie. Během impulzu, někdy nazývaný jako budící impulz, protony absorbují část energie na konkrétní frekvenci. Po skončení impulzu protony emitují energii o stejné frekvenci. Pro to, aby protony mohly absorbovat energii z radiofrekvenčního pulzu, musí být frekvence budícího pulzu obdobná jak úhlová frekvence protonu, který vykonává precesní pohyb.

Působením budícího pulzu dochází ke vzniku vektoru B_1 , který je v rovině xy a který se pohybuje s určitou úhlovou frekvencí ve směru precese protonu. Díky dodané energii dochází v zásadě ke dvěma účinkům:

- Protony, které se nacházely na nižší energetické hladině, jsou najednou díky přísunu energie na vyšší energetické hladině (antiparalelně). To způsobí změnu velikosti longitudinální magnetizace.
- Dochází ke sfázování elementárních magnetických dipólů, čímž nastává postupné vyklopení vektoru magnetizace z původního směru osy z do roviny xy .

Před působením budícího impulzu byla složka vektoru magnetizace M_{xy} nulová. Nyní tento vektor magnetizace nabývá nenulových hodnot a vykonává složitý nudační pohyb. Pohyb spočívá jednak v precesi kolem B_1 a jednak v precesi kolem B_0 , pokaždé s jinou úhlovou frekvencí vzhledem k B_1 a B_0 . Výsledný pohyb vektoru magnetizace během RF impulzu si lze představit jako spirálovitý po sférickém povrchu. [3]

Úhel vychýlení θ je úhel, o který se vektor magnetizace sklápí ze své původní osy z (směr hlavního pole B_0) do roviny xy . Tento úhel lze stanovit jako [3]

$$\theta = \gamma \int_0^{\tau} B_1(t) dt, \quad (2.1)$$

kde τ je doba působení RF impulzu a γ je gyromagnetická konstanta. Pokud využijeme jen pravouhlý pulz, nastane zjednodušení vycházející z předešlé rovnice a dostáváme [3]

$$\theta = \gamma B_1 \tau \quad (2.2)$$

V praxi se využívá sklápění o různé úhly a jedním ze základních je sklápění o $\theta = 90^\circ$. Vektor magnetizace pak rotuje v rovině xy a jeho složka v ose zaniká. Předchozí dvě rovnice nám říkají, že s délkou trvání budícího pulzu a s velikostí budícího pulzu roste velikost úhlu sklopení θ . [3]

2.1. Relaxační mechanismy

Relaxace obecně nastane ihned poté, co budící impulz přestane na okresek tkáně působit. Jev je způsoben tím, že protony, které byly excitovány na vyšší energetickou hladinu, se opět navrací do svého rovnovážného stavu. Vektor magnetizace, který vznikl díky budícímu impulzu v rovině xy , se opět navrací do svého původního směru osy z (nastane termodynamická rovnováha).

Je nutné si uvědomit, že výměna energie je možná i bez RF impulzu a to díky interakci mezi protony v samotných jádrech atomů s okolním prostředím. Termodynamickou rovnováhu lze charakterizovat, [3]:

- vektor magnetizace v transverzální rovině je $M_{xy} = 0$
- velikost vektoru magnetizace v longitudinálním směru je $M_z = M_0$.

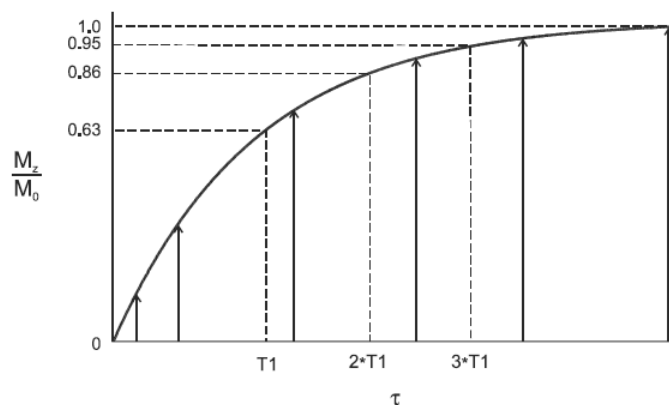
Existují dva typy interakcí pro to, aby se soustava dostala do stavu termodynamické rovnováhy. Jednou z nich je spin - mřížková interakce a druhou je spin - spinová interakce. Kvantitativní hodnocení těchto interakcí se provádí pomocí T_1 a T_2 relaxačních časů. [3]

2.1.1. Spin – mřížková relaxace

Spin - mřížková relaxace je taktéž označována jako longitudinální relaxace T_1 . Relaxační čas T_1 je čas potřebný k návratu vektoru magnetizace na 63% své původní hodnoty po skončení excitačním pulzu. Dochází tedy k postupnému zvětšování longitudinálního vektoru magnetizace M_z . Termínem spin - mřížková se rozumí to, že excitovaný proton (spin) předá energii do okolí (mřížka) spíše než do jiné rotace. Návrat vektoru magnetizace (počty protonů) má exponenciální charakter vzhledem k uplynulému času od RF pulzu (viz Obrázek 3). Velikost vektoru magnetizace měnícího se v čase vzhledem k rychlosti relaxace je [1]

$$M_z(\tau) = M_0(1 - e^{-\frac{\tau}{T_1}}), \quad (2.3)$$

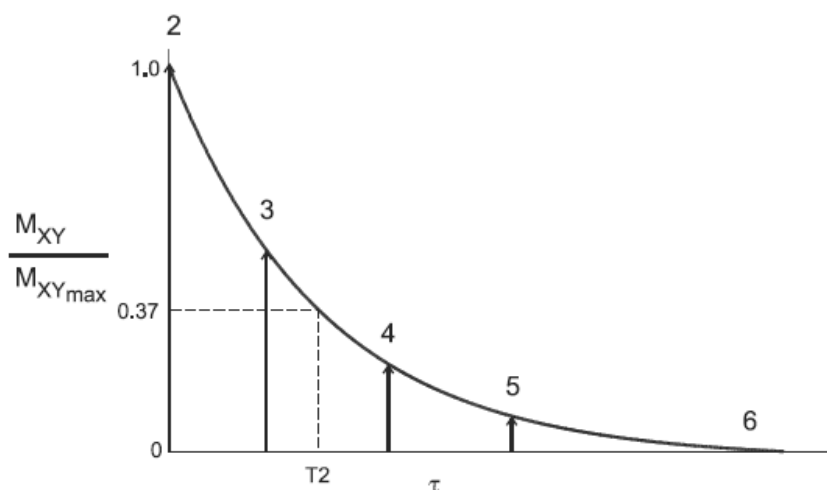
kde τ je doba následující po RF pulzu.



Obrázek 3 - Časový průběh T_1 relaxace – T_1 relaxační křivka, převzato z [1].

2.1.2. Spin – spinová relaxace

Spin - spinová relaxace je také označována jako transverzální relaxace T_2 . Relaxační čas T_2 je čas, za který vektor transverzální magnetizace M_{xy} klesá na 37% své původní hodnoty (Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.).



Obrázek 4 - Časový průběh vektoru magnetizace M_{xy} po aplikaci 90° RF pulzu, převzato z [1].

Intramolekulární a intermolekulární interakce, jako například vibrace či rotace, způsobí fluktuaci úhlové frekvence precedujících protonů. Tyto fluktuace způsobí postupnou ztrátu fázové koherence, což způsobí postupný pokles transverzální složky vektoru magnetizace M_{xy} – viz rovnice (2.4). To je jen jedna z možných příčin ztráty fázové koherence. Dalším možnou příčinou jsou lokální nehomogenity pole B_0 , které způsobí změnu úhlové frekvence precedujícího protonu, [1] [3]

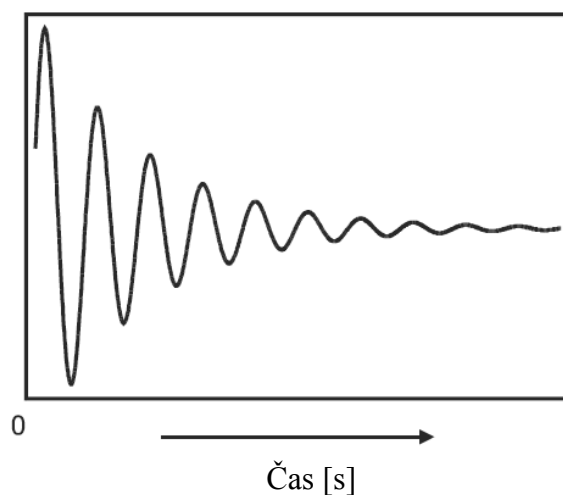
$$M_{xy}(\tau) = M_{xy(max)} \cdot e^{\frac{-\tau}{T_2}}, \quad (2.4)$$

kde τ je doba následující po RF pulzu a $M_{xy(max)}$ je hodnota transverzální magnetizace ihned po RF pulzu.

Efektivní relaxační čas T_2^* současně hodnotí vliv vnějších (B_0) nehomogenit a vnitřních nehomogenit. [[3]

2.2. Volně indukovaný signál

Volně indukovaný signál FID (z anglického *Free Induction Decay*, **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) je signál, který lze měřit po sklopení vektoru magnetizace v rovině xy . Pokud vypneme vysílač RF impulzů, tak se protony okamžitě začnou vracet do své termodynamické rovnováhy. Signál je tedy generován při relaxaci vybuzených jader atomů. Tento signál přináší informaci o objektu, který je právě snímán a lze ho měřit pomocí přijímací cívky (v rovině sklopení). V cívce se indukuje proud na Larmorově frekvenci ω_0 . Délka trvání volně indukovaného signálu závisí na relaxačních mechanizmech. [3]



Obrázek 5 - Průběh volně indukovaného signálu, převzato z [3].

3. Pulsní sekvence

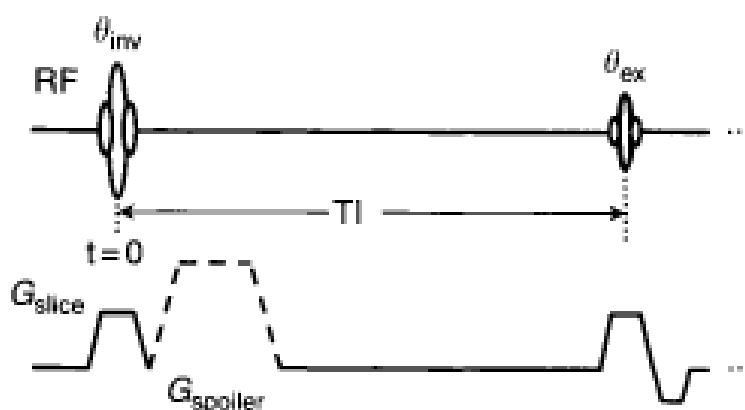
Pro to, abychom mohli specifickým protonům předat část energie a uvést je tedy do vyšší energetické hladiny, je nezbytná aplikace RF pulzů. Je nutné podotknout, že se nevyužívá jen jeden excitační pulz, ale většinou sada opakujících se pulzů. Dle nastavení různých metod pulsních sekvencí lze získat různě vážené obrazy (T_1 vážené, T_2 vážené či vážené hustotou protonů – *Proton density*). [3]

Dělení sekvencí se provádí podle jejich určitých vlastností a jedním ze základních rozdělení je [3] [16]:

- *Inversion Recovery* (IR)
- *Saturation Recovery* (SR)
- *Spin Echo* (SE), případně modifikace *Turbo Spin Echo* a jiné
- Gradientní Echo (GE).

3.1. *Inversion Recovery*

Začátkem pulsní sekvence IR je aplikování 180° pulsu. Po aplikování tohoto pulsu dojde k převrácení vektoru magnetizace z osy $+z$ do směru osy $-z$. Následuje aplikace 90° pulsu a to po době, která je označována jako inverzní TI (*Time Inversion*), (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Tento 90° pulz způsobí převrácení vektoru magnetizace M_z do transverzální roviny xy . Část atomových jader se díky T_1 vrátí do stavu termodynamické rovnováhy a mění tím pádem velikost vektoru magnetizace v rovině xy . Po uplynutí repetičního (TR) času se celý cyklus opakuje. [3]



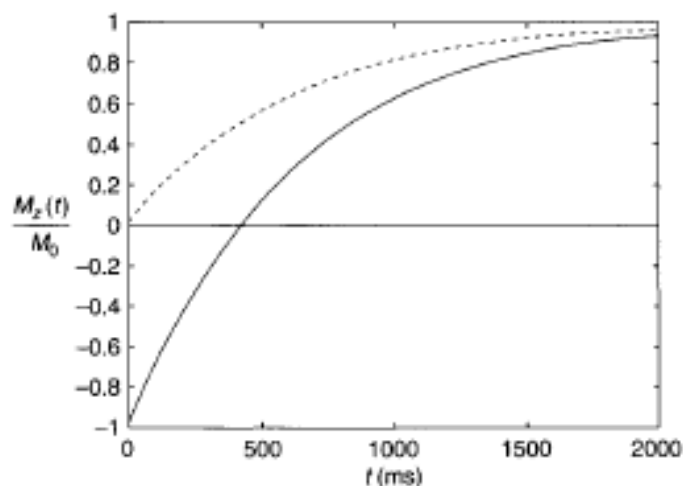
Obrázek 6 - Znázornění aplikace pulzů při metodě *Inversion Recovery*, převzato z [[16].

Vektor magnetizace prochází v jednom okamžiku nulovým bodem (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). V tomto místě nemůže být vektor magnetizace změřen.

Správně zvoleným TI a znalostí časů T_1 určitých tkání lze dosáhnout například potlačení signálů z tukové tkáně či mozkomíšního moku [[16].

3.2. Saturation Recovery

Sekvence SR je charakteristická repetičními aplikacemi 90° pulsů. Po uplynutí TR se aplikuje další 90° puls. Díky zpožděním, která vznikají v měřicím systému, nemůže být měřena velikost signálu ihned po aplikaci 90° pulsů. Měření může být zahájeno až po uplynutí časového intervalu, který je označován jako zpoždění echa (TE). Volba zpoždění umožňuje získání signálu závislého nejen na T_1 , ale i na T_2 relaxačním času. Pokud je interval TR dostatečně dlouhý (větší než čas T_1), vrací se vektor magnetizace M_{xy} zpět do směru osy z. Tento stav se označuje jako saturovaný. Touto metodou lze získat obraz vážený dle protonové hustoty specifických jader za předpokladu, že TR bude velmi dlouhé a TE bude naopak velmi krátké. [3]



Obrázek 7 - Znáornění vektoru podélné magnetizace při metodách IR a SR, převzato z [[16].

3.3. Spinové Echo

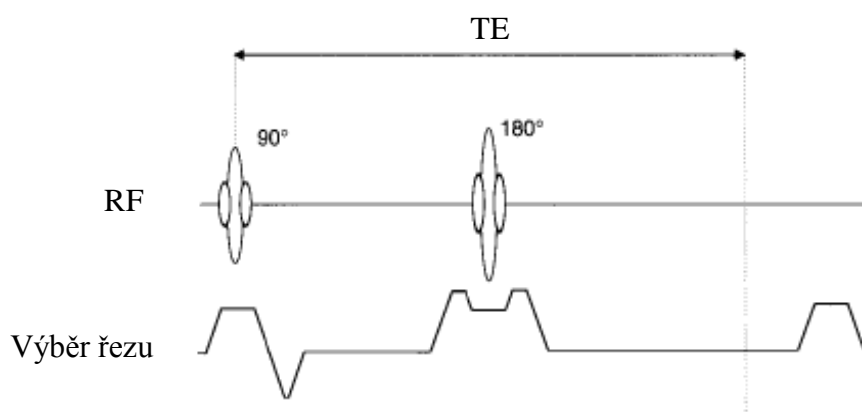
Metoda využívá sled pulsů tvořený 90° a 180° pulsy. Po aplikaci 90° pulsu dojde k překlopení vektoru magnetizace M_z do transverzální roviny. Následně dochází vlivem T_2 mechanismů k rozfázování spinů – dochází ke zmenšení vektoru magnetizace. Vlivem následného refokusačního pulsu (180°) dochází k opětovnému sfázování spinů. Po sfázování jader vzniká tzv. echo signál. Doba zpoždění (TD) je označení pro interval mezi echo signálem a následným 90° pulsem následující sekvence. [3]

Různě vážené obrazy lze vytvořit díky proměnným dobám TR a TE. Při krátkých TR a krátkých TE vznikají T_1 vážené obrazy. Při dlouhých TR a krátkých TE vznikají obrazy vážené protonovou hustotou jader. Dlouhé TR a dlouhé TE zapříčiňují vznik T_2 vážených obrazů. [[16]

3.3.1. RARE sekvence

RARE (*Rapid acquisition with relaxation enhancement*) je velmi rychlá obdoba SE techniky. Využívá RF budící puls následovaný sledem refokusačních pulsů. Každé echo je prostorově kódováno a díky tomu může být signál snímán po každém budícím pulsu. Z toho plyne, že se výrazně sníží čas potřebný k získání snímků. Pokud je 16 ech fázově kódováno touto metodou, může být celkový čas akvizice snížen o faktor 16 ve srovnání s metodou SE s identickými parametry (citelné snížení hlavně u T_2 vážených obrazů). Faktor je označení pro redukční čas. [[16]

Vzniklé RARE obrazy jsou méně zatížené artefakty, které mohou vzniknout vlivem nehomogenit vnějšího magnetického pole. Metoda má i své nevýhody, jako například: rozmazání, změna kontrastu způsobená větší intenzitou lipidů. [[16]



Obrázek 8 - Sekvence SE s ukázkou aplikace 90° a 180° (refokusačního) pulsů [[16].

3.4. Gradientní echo

Namísto refokuzujícího 180° pulzu využívají techniky k tvorbě echo signálu gradientní magnetické pole. Lokální magnetické pole je díky gradientnímu poli pozměněno na hodnotu vyšší či nižší. Echo signál vzniká aplikací fázového gradientu. Nejprve dochází vlivem gradientu k rozfázování spinů, následně je v předem definován čas (TE) aplikován gradient s opačnou polaritou, což způsobí opětovné sfázování spinů. Vzniká tedy gradientní echo signál.[3].

Různé typy těchto sekvencí využívají malé sklápěcí úhly, což zapříčiňuje neúplné překlopení vektoru magnetizace do roviny xy . Hodnotu TR lze snížit na minimum pak se neuplatní T_1 a kvůli malým sklápěcím úhlům, není dlouhá doba snímkování dané tkáně. Při této technice vznikají i artefakty, které jsou způsobeny nehomogenitami vnějšího magnetického pole [3] [16].

3.5. T_1 a T_2 relaxometrie

MR relaxometrie je metoda sloužící k posouzení stavu tkáně. Široké uplatnění nacházejí tyto metody především při zjišťování patologických stavů. Další uplatnění našly tyto metody při zjišťování dynamiky vody jak v biologických tkáních, tak v nejrůznějších biokompozitech. [18]

3.5.1. Základní principy relaxačních měření

Relaxační měření jsou postaveny na rozdílech v relaxačních mechanismech vyskytujících se například v biologických tkáních. Pro měření relaxačních časů T_1 a T_2 se využívají nejrůznější pulsní sekvence. Často využívanou pulsní sekvencí pro měření relaxačního času T_2 je Carrova – Purcellova – Meiboomova - Gillova sekvence (CPMG), což je obdoba SE sekvence. CPMG sekvence obsahuje 90° RF puls následovaný sérií 180° RF pulsů. Za dobu $2\tau = TE$ (τ je čas mezi 90° a 180° pulzem) od aplikace prvního pulzu dochází ke sfázování. V tomto okamžiku dosahuje amplituda signálu svého maxima a poté dochází k rozfázování. Po 180° pulzu následuje další 180° pulz v časovém intervalu 2τ (180° RF pulzy v dobách τ , 3τ , 5τ atd.). Detekujeme tedy řadu SE s exponenciálně klesající amplitudou. T_2 signál je pak dán [18][18]

$$S_k = N(T_1)e^{-kTE/T_2}, \quad (3.1)$$

kde k je číslo příslušného echa, $N(T_1)$ je hustota protonových jader.

Obrazy pořízené s různými hodnotami TE jsou souborem dat, z kterých lze za pomoci matematických modelů určit jak T_2 relaxační čas v měřené tkáni, tak i hustotu protonových jader.

Pro měření relaxačního času T_1 se využívá *saturation recovery* sekvence. Tato sekvence byla popsána v předešlé kapitole. Za pomoci matematických modelů lze pak z následující rovnice určit hodnotu relaxačního času T_1 [18]

$$S_k = N(T_2)(1 - e^{-kTR/T_1}), \quad (3.2)$$

kde k je číslo příslušného repetičního času a $N(T_2)$ je hustota protonových jader.

Při této sekvenci by se měl volit TE čas co nejmenší, aby se minimalizoval vliv T_2 relaxace. [18]

4. Fixace

Úkolem fixace je zachovat (konzervovat) buňky a tkáňové komponenty v takovém stavu, který dovoluje jejich pozdější studium a zamezení růstu plísní a bakterií. Během fixace dochází k denaturaci bílkovin. Po odebrání tkáně velmi rychle dochází k autolytickým procesům. K těmto pochodům dochází díky tomu, že jsou přerušeny přívody kyslíku a přestává být řízena regulace mezi jednotlivými buňkami v tkáni. Enzymy vznikající v organele nazývané lyzozom přispívají k autolýze. Pokud není fixace provedena okamžitě po odebrání tkáně, může docházet k napadení tkáně mikroorganismy, což je označováno jako heterolýza. Důležité u fixace je, aby nebyly změněny struktury buněk a jiných komponent, čemuž ovšem nejde zabránit na sto procent. Vždy dochází alespoň k částečným změnám, a proto je důležité vybrat takovou metodu fixace, která strukturní změny omezí. [7] [10]

Fixativa lze rozdělit podle velkého množství kritérií. Namátkou lze zmínit koagulující a nekoagulující fixativa či aditivní a neaditivní fixativa.

Mechanismem denaturace bílkovin se vyznačují fixativa koagulující, kdy dochází ke změně sekundární a terciální struktury bílkovin, a tím pádem se snižuje rozpustnost bílkovin. Hydrofobní oblasti bílkovin (vyskytující se na vnitřních stranách) spolu interagují a vnikají propojení, čímž dochází ke stabilizaci bílkovin. Tento typ fixace vlastně sbalí řetězce bílkovin do klubek. Nejčastěji se jedná o alkoholy (etanol, metanol), ale i kyselina dusičná či pikrová se řadí do této rozsáhle skupiny. [8]

Pokud jsou bílkoviny a další buněčné komponenty propojeny chemickou vazbou a nedochází ke koagulaci, mluvíme o nekoagulujících fixativech. Typické je pro tuto skupinu, že zachovává nitrobuněčné detaily. Při této metodě se tvoří intramolekulární a intermolekulární vazby. Dochází k přeměně cytoplazmy v transparentní gel. Do této skupiny řadíme především aldehydy, velice známým zástupcem je pak formaldehyd. Bližší pojednání o výše zmíněných chemických látkách bude následovat v dalších kapitolách. Existují tři velké skupiny metod, které se k fixaci využívají [8]:

- fyzikální metody
- chemické metody
- fyzikálně – chemické metody.

4.1. Fyzikální metody fixace

Fyzikální metody v sobě zahrnují fixaci pomocí vysokých teplot, nízkých teplot a metody vysychání.

Prvně zmíněná metoda se využívá v mikrobiologii, kdy jsou nátěry bakterií na sklíčku vystaveny plamenu kahanu. Další, dnes již běžně používanou metodou, je metoda mikrovlnná, která se také řadí do fixace vysokou teplotou. Jsou dvě možnosti využití těchto vln. První z nich je, že se fixační činidlo nahradí mikrovlnami. Druhá možnost využití spočívá v umístění tkáně do fixačního roztoku a vložení do mikrovlnné trouby. Mikrovlny vytvoří kanálky v tkáních a fixátor může lépe prostupovat do tkáně. Zde tedy mikrovlny ovlivňují rychlost prostupu fixačního činidla, ale jako samotné zde nejsou fixačním činidlem. U těchto metod je velice důležité dodržování teplotního schématu. Nadměrné teplo může způsobit poškození buněk a může vést ke značnému smrštění a ztvrdnutí vzorku. [6] [7]

U druhé fyzikální metody fixace se využívá nízkých teplot. Jde o metody kryofixace, kdy je vzorek rychle zmrazen (např. tekutým dusíkem). Aby se zkrátil čas, kdy se tvoří krystaly, tak se vzorek může ošetřit kryoprotektantem. U tohoto druhu fixace je velice důležitá rychlost zmrazení preparátu. Pokud vzorek není dostatečně rychle zmrazen, vznikají krystaly, které poškodí vnitřní struktury vzorku. Cílem metody je dosažení vitrifikovaného (zeskelnatění) stavu preparátu. Výhodou metody je, že nedochází k denuraci antigenů a enzymů. [6]

4.2. Chemické metody fixace

Při těchto metodách se užívají činidla, která reagují s biologickými složkami a imobilizují a stabilizují preparát bez velkých strukturních změn. Chemická metoda se provádí v zásadě dvěma různými způsoby – imerzním a perfuzním způsobem. [6] [10]

Imerzní – ponoření tkáně, která byla odebrána do fixačního roztoku, kdy se udává, že roztoku musí být řádově 10 až 100 krát víc, než je objem fixované tkáně. Toto ponoření trvá několik hodin, ale i dnů či delší časový úsek. Dále se v literatuře udává, že by měl být roztok alespoň jedenkrát vyměněn.

Perfúzní – při této metodě se samotný fixační prostředek vpraví do krevního oběhu, nejčastěji transkardiálně. Před tím se ještě proplachuje nejčastěji fyziologickým roztokem. Fixace je v tomto případě téměř dokonalá neboť se fixátor velmi rychle dostane ke všem buňkám orgánu. Metody se využívá pouze v experimentech na zvířatech a je to co do spotřeby fixačního roztoku nákladnější metoda.

4.2.1. Faktory ovlivňující chemickou fixaci

Existuje celá řada faktorů, které ovlivňují rychlost a účinnost fixace tkáně. K těm nejdůležitějším patří [7]:

- Objemový poměr – někdy udávaný jako objem fixáže, je objem, který je potřebný ke kvalitně provedené fixaci. Jako minimální poměr se udává 10:1,

tedy je potřeba minimálně desetkrát víc fixačního roztoku (co do objemu), než je objem tkáně. Optimální poměrem je 50:1. Cílem je, aby se zabránilo vyčerpání fixační látky. Větší objem také lépe reflektuje případné změny.

- Teplota – vyšší teplota zajistí rychlejší difúzi fixátoru do tkáně a také se zvýší rychlost chemické reakce mezi fixátorem a okolními látkami. Ovšem vyšší teplota může naopak negativně ovlivnit rychlost autolýzy. Někdy se pro změnu používá fixace při nízké teplotě, ta má zase za následek některé cytologické změny jako je rozpad mikrotubulů.
- pH – ovlivňuje rychlost autolýzy. Rychlost reakce aldehydů (formaldehyd) s bílkovinami je hodně ovlivněna právě pH, a proto se volí optimum kolem 6,8 – 7,2. Je dobré si opět uvědomit, že záleží na buněčných komponentách, které budou fixovány a podle toho volit pH. Příliš kyselé prostředí může ovlivnit některé komponenty negativně (vakuoly).
- Čas – optimální doba fixace se liší podle metody fixace a samotného fixátoru a je značně rozdílná. Míra penetrace je také závislá na čase a pro každý fixátor se udává zvlášť. Lze ji vyjádřit:

$$d = K\sqrt{t}, \quad (4.1)$$

kde d je hloubka průniku (penetrace) v mm, K je koeficient difúze v mm/h a t je čas v hodinách.

Pro 10% formaldehyd je difúzní koeficient roven 0,78 mm/h to znamená, že do středu tkáně o tloušťce 10 mm se formaldehyd dostane za více jak 25 hodin.

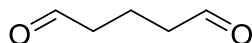
Dalšími faktory mohou být osmolalita, koncentrace fixačního činidla, případně ještě další přídavné látky, které se použijí během fixace. Z tohoto stručného přehledu je zřejmé, že neexistuje univerzální postup fixace, který by byl vhodný pro různé tkáně a buňky. [7]

4.2.2. Chemické látky užívané pro fixaci

Existuje nepřeberné množství fixačních činidel. Vůbec nejznámější a nejoblíbenější je formaldehyd, užívaný ve velké míře v histopatologii, a glutaraldehyd, který se užívá pro ultrastrukturní studie.

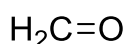
První skupinou používanou pro fixaci, a do které patří i výše zmíněné chemické látky, jsou aldehydy.

Glutaraldehyd (GA) je fixační prostředek, který dokáže zachovat prostorové rozmístění komponentů buňky a částečně dokáže zanechat některé enzymy aktivní. Díky dvěma funkčním skupinám se může vázat na aminoskupiny proteinů (Obrázek 9). Dokáže rychle reagovat s lysinem, ale i s dalšími proteinogeními aminokyselinami. Nereaguje s lipidy. GA má špatnou penetrační schopnost a díky tomu se dá využít jen na tenké řezy (uvádí se 2 mm). Další nevýhodou, která je ale společná pro všechny aldehydy, je sklon buněk tvořit membránové váčky po tom, co zemřou. Používají se výhradně pufrované roztoky a fixace většinou nepřesáhne pět hodin. [9]



Obrázek 9 - Strukturní vzorec glutaraldehydu, vytvořeno v *ChemDraw*.

Formaldehyd (FA, Obrázek 10) je fixátorem, který je hojně užívaný v histologických laboratořích. Při pokojové teplotě je formaldehyd plynem, který se velmi dobře rozpouští ve vodném prostředí. V tkáních reaguje převážně s bílkovinami a to díky své aldehydicke skupině, která se naváže na aminoskupiny proteinů (tvorba příčných vazeb mezi polypeptidickými řetězci bílkovin). Za pomoci FA je možné fixovat i větší preparáty a to díky malým molekulovým rozměrům. Je tedy zřejmé, že má vyšší penetrační schopnost na rozdíl od dříve zmíněného GA, který má větší molekulové rozměry. Reakce FA s bílkovinami je na rozdíl od rychlosti pronikání o poznání menší. Míra pronikání se s vyšší teplotou zvyšuje stejně jako intenzita tvorby příčných vazeb. Stejných účinků lze dosáhnout i zvýšením tlaku. Urychlení reakcí a zlepšení vazeb lze dosáhnout i pomocí mikrovlnného záření. Zde je ale důležité brát na zřetel, že dochází k tvorbě výparů, které jsou zdraví škodlivé a také dochází ke koagulaci. FA má tu výhodu, že dokáže zesíťovat i nukleové kyseliny. [6]



Obrázek 10 - Strukturní vzorec formaldehydu, vytvořeno v *ChemDraw*.

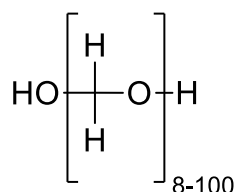
Nejenomže FA reaguje s bílkoviny, také reaguje s lipidy. Ionty Ca^{2+} zvyšují stabilizační účinek formaldehydu na lipidy, tekutina využívaná k této stabilizaci se označuje jako Bakerova (roztok formaldehydu a chloridu vápenatého). Občas se místo samotného FA využívá spojení s GA, a to kvůli tomu, že FA má nižší výslednou kvalitu fixace. GA v tomto případě zaručí lepší fixaci a FA zaručuje větší rychlost fixace. [6] [10]

Do laboratoří se dodává vodný roztok FA 37 – 40 %. Pokud vodný roztok FA necháme delší dobu stát, dochází k Cannizzarově reakci a vzniká metanol a kyselina mravenčí (lze částečně eliminovat práškovým uhličitanem vápenatým, který je nad roztokem). Látky, které vznikají takovýmto stáním, zhoršují výslednou kvalitu fixace.

Těmto nežádoucím jevům se dá zabránit - a to tím, že se v posledních letech využívá pevný polymer FA nazývaný paraformaldehyd. [10]

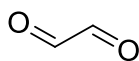
Roztoky paraformaldehydu (PFA, Obrázek 11) se připravují těsně před samotnou aplikací depolymerizací paraformaldehydu, kdy vzniká čistý monohydrát, tzv. metylenhydrát. Koncentrace vzniklých roztoků se pohybuje od 2 do 8 % a vždy jsou pufrované. Fixace se pohybuje v rozmezí 12 – 24 hodin, ale zase záleží na druhu a tloušťce preparátu. [10]

PFA je látka zdraví škodlivá, jak při vdechování tak po požití. Je podezření, že má karcinogenní účinky. Je velice dráždivý - dráždí dýchací orgány a také kůži. Taktéž může vážně poškodit oční orgán. Kvůli tomu se s PFA pracuje s ochrannými pomůckami (rukavice, brýle, rouška) a zásadně se vodné roztoky připravují v digestoři.



Obrázek 11 - Strukturní vzorec paraformaldehydu, vytvořeno v *ChemDraw*.

Glyoxal, nazývaný též diformyl, je bifunkčním aldehydem (Obrázek 12), který reaguje s bílkoviny i lipidy. Obě jeho aldehydicke skupiny jsou silně reaktivní a tvoří účinné zesíťování. Glyoxal se zejména využívá jako jedna ze složek při mikrovlnné fixaci, ale používá se i jako samotné fixační činidlo. Někdy bývá označován jako formaldehydová náhrada (velký rozmach zaznamenal hlavně v Severní Americe). Při pokojové teplotě se netvoří páry, takže je i méně nebezpečným fixátorem než FA. Nicméně je taktéž dráždivý a má potencionální mutagenní účinky. Je biologicky odbouratelný a jeho likvidace je jednodušší než v případě FA. [7]



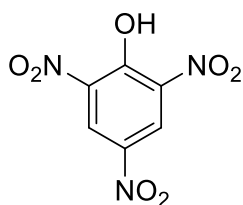
Obrázek 12 - Strukturní vzorec glyoxalu, vytvořeno v *ChemDraw*.

Dalšími hojně užívanými fixačními činidly jsou organické kyseliny. Můžeme sem zařadit kyselinu octovou, která se sama o sobě nevyužívá neboť fixační účinek na tkáň je velmi špatný. Proto se využívá pouze ve směsích či tekutinách, kde napomáhá urychlovat fixaci jiných fixačních látek. Stejně je tomu i u dalšího zástupce, jímž je kyselina trichloroactová, která rychle proniká do tkání. [10]

Nejznámějším zástupcem organických kyselin určených k fixaci je kyselina pikrová (Obrázek 13). Je to látka málo rozpustná ve vodě se silně hořkou chutí. V žádném případě se nesmí silně zahřívát, jelikož by hrozil výbuch. Velmi dobře precipituje bílkoviny,

neproniká do tkáně příliš rychle a barví tkáň nažluto. Reaguje převážně s bazickými aminokyselinami a tvoří s nimi málo rozpustné soli nazývané pikráty. Používá se buď v roztocích s jinými sloučeninami, nebo jako samotné fixační činidlo (sporadicky). V kombinaci s formaldehydem a kyselinou octovou vzniká Bouinova tekutina (má žlutou barvu, rychle proniká, nejčastěji 3 díly nasycené kyseliny pikrové, 1 díl formaldehydu a pár mililitrů ledové kyseliny octové). Bouinova tekutina se doporučuje pro fixaci biopsií ze zažívacího traktu, fixaci zvířecích embryí a tkáně ze žláz s vnitřní sekrecí. Vzhledem ke kyselé povaze látky se ve tkáni pomalu rozpouští vápenaté a železité depozity. Délka fixace je 4 – 18 hodin. [7]

Dalšími známými tekutinami, které se využívají pro fixaci a majoritní složkou je zde kyselina pikrová, jsou Pasteelsova a Gendreova tekutina. Při použití kyseliny pikrové dochází během procesu fixace ke smrštění tkáně. [10] [7]



Obrázek 13 - Strukturní vzorec kyseliny pikrové, vytvořeno v *ChemDraw*.

Poslední velkou skupinou užívanou pro fixaci jsou soli těžkých kovů. Patří sem chlorid rtuťnatý, oxid osmičelý, dvojchroman draselný a samotné soli chromu.

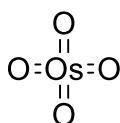
Chlorid rtuťnatý byl vůbec jedním z prvních užívaných fixačních činidel. Pro samotnou fixaci se nehodí, vždy se využívá s jinými chemickými sloučeninami (Zenkerova tekutina, Heidenhainova tekutina). Primárně reaguje s amino a amido skupinami bílkovin. Reaguje s fosfátovou skupinou nukleových kyselin a účinně fixuje nukleoproteiny. Má velkou rychlost pronikání tkání. Po aplikaci chloridu rtuťnatého se mohou v tkáních objevit malé rtuťnaté sraženiny. Ve starších literaturách se označuje jako korozivní sublimát (triviální název). Dokáže reagovat i s nerezavějící ocelí. Je hlavní komponentou některých fixačních sloučenin jako například B - 5 nebo Hellyho tekutina. [10] [7]

Oxid osmičelý (Obrázek 14) je vysoce toxická, těkavá, krystalická pevná látka, která se dodává v uzavřených ampulích. Je rozpustný v polárních i nepolárních rozpouštědlech. Reaguje s postranními řetězci bílkovin a tvoří s nimi vazby. Je jedním z mála fixátorů, který dokáže stabilizovat lipidy (s nenasycenými mastnými kyselinami utváří cyklické estery osmia). Při reakcích s organickými sloučeninami se tvoří osmiová černá a ta způsobí zčernání preparátu (hlavně se ukládá v membránách). Nezpůsobuje téměř žádné morfologické artefakty ve tkáních. Velice dobře zachovává strukturu biologických membrán, čehož se využívá ve světelné mikroskopii. Molekula oxidu osmičelého je poměrně velká a kvůli tomu proniká do tkáně velice pomalu, udává se $K = 0,2$ mm/h

(difúzní koeficient). Kvalita fixace je ovlivňována teplotou (rychlejší reakce při vyšší teplotě), koncentrací (větší koncentrace napomáhá rychlejší fixaci) a konečně při nízkém pH se snižuje reaktivita. [6] [7] [10]

Zachází se s ním velmi opatrně a jen v digestoři. Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození sítnice. Smí se s ním pracovat jen s ochrannými pomůckami (obličejový štít, rukavice, plášť, ochranné brýle).

Fixační roztoky, které obsahují ve své struktuře chrom, velmi dobře stabilizují proteiny i fosfolipidy. Do tkáně pronikají jen velmi pomalu a i kvůli tomu se využívají jen v kombinacích s jinými fixačními roztoky (Zenkerova a Hellyho tekutina). [10]



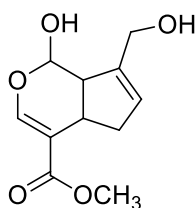
Obrázek 14 - Strukturní vzorec oxidu osmičelého, vytvořeno v *ChemDraw*.

Menší skupinou, která se využívá jen v kombinacích s jinými fixátory a ve specifických tekutinách, je etanol (Carnoyova tekutina), metanol a aceton. Samy o sobě způsobují smrštění a ztvrdnutí fixovaného vzorku. [10]

4.2.3. Přírodní látky používané pro fixaci

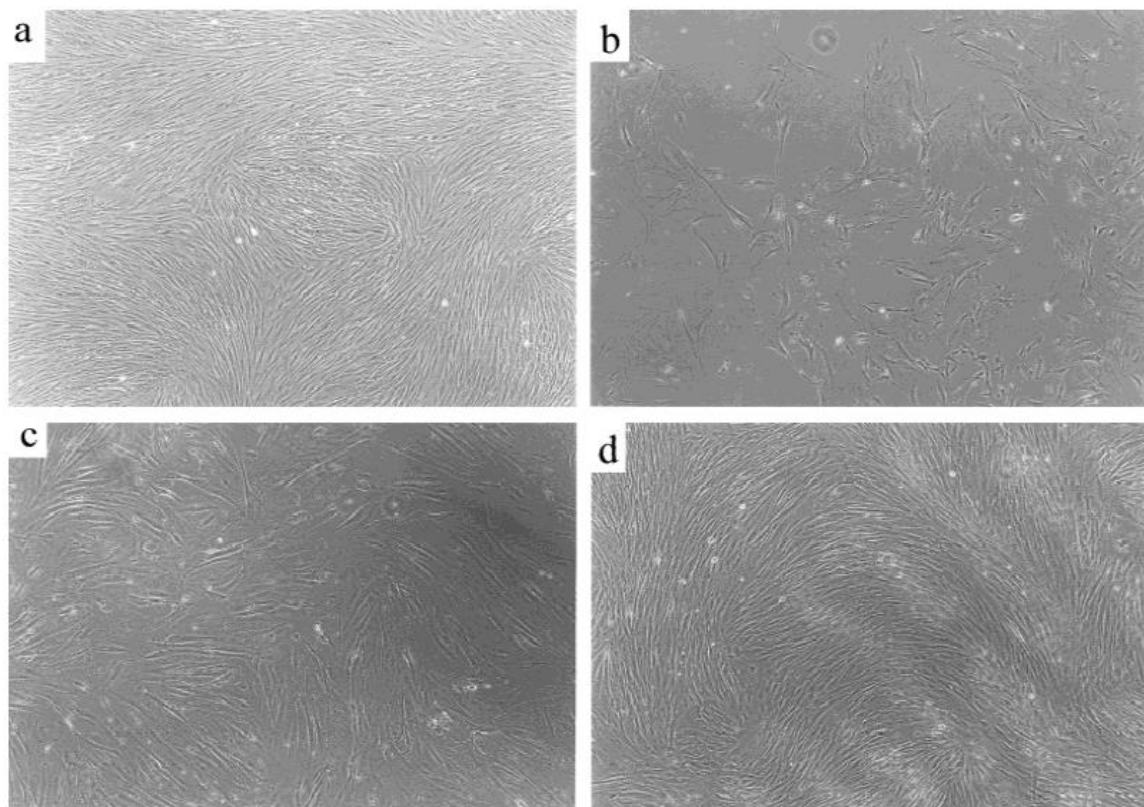
Různá fixační činidla jako formaldehyd, glutaraldehyd, oxid osmičelý a spousta dalších jsou velice toxická, mohou poleptat kůži a některá jsou dokonce mutagenní. Je proto důležité najít taková fixační činidla, která by se mohla používat v biomedicínských aplikacích. Předpokladem je nízká cytotoxicita, vysoká stabilita a hlavně biokompatibilita.

Genipin je přirozeně se vyskytující síťovací činidlo, které se extrahuje z Gardénie jasmínové. Fixace nebo chemická modifikace biologické tkáně zvyšuje odolnost vůči enzymatické degradaci a snižuje antigenicitu. Předávkování genipinem bylo testováno na krysách (podáváno perorálně) a nebylo zjištěno, že by genipin způsobil abnormální akutní změny jak na játrech, tak na ledvinách. Genipin spontánně reaguje s aminokyselinami za vzniku modrého pigmentu - ten se využívá i jako potravinářské barvivo. [11]



Obrázek 15 - Strukturní vzorec genipinu, vytvořeno v *ChemDraw*.

Byly prováděny pokusy s prasečím perikardem, kdy se pro fixaci použil glutaraldehyd, epoxidová sloučenina (již dříve se zkoušel účinek fixace epoxidovou sloučeninou a to s heparinem nebo bez něj na prasečích aortálních chlopních [12]) a genipin. Měřily se různé charakteristiky – odolnost vůči enzymatické degradaci, mechanická pevnost, měření denaturační teploty (indikátor stupně zesítnění), zkoumání kolagenové struktury a jiné. Z výsledků vyplývá, že genipin je velice kvalitním přírodním fixátorem, který je o mnoho méně cytotoxický než glutaraldehyd a epoxidové sloučeniny (viz Obrázek 16). [11]



Obrázek 16 - Snímky fibroblastů (100x zvětšené), převzato z [11].

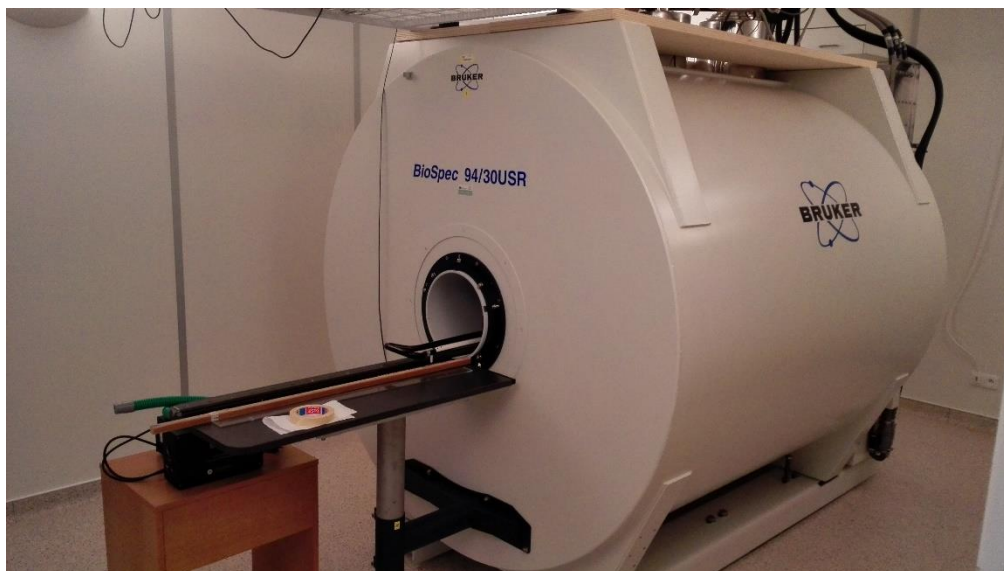
Na snímku a) jsou zachyceny fibroblasty - k této tkáni nebyla přidána žádná síťovací činidla. Snímek b) ukazuje situaci při použití glutaraldehyhu. U snímku c) byla použita epoxidová sloučenina a na posledním snímku d) byl jako fixátor použit genipin. Z obrázku plyne, že nejméně cytotoxickým fixačním činidlem je přírodní genipin.

5. Experimentální část

Ústav přístrojové techniky (ÚPT), jenž je pracovištěm Akademie věd (AV) České republiky, v nedávných letech pořídil moderní preklinický víceúčelový systém BioSpec 94/30 USR společnosti Bruker o intenzitě 9,4T (viz Obrázek 17). Průměr otvoru pro nejrůznější objekty činí 30cm.

Celý systém je uzavřený ve Faradayově kleci (na dřevěné konstrukci je připevněna tenká měděná folie), která slouží k odstínění elektromagnetického záření – známé také jako radiofrekvenční štít. Toto záření by mohlo nepříznivě ovlivnit výsledky měření a z toho důvodu se tato ochrana používá.

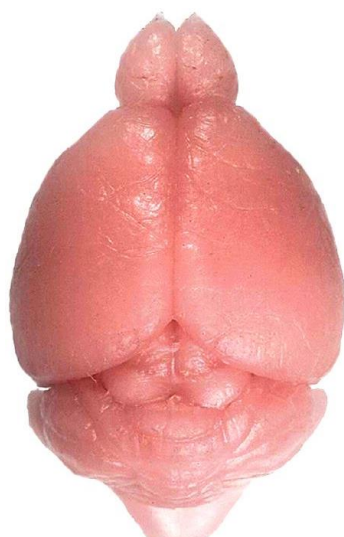
Softwarový balíček ParaVision 5.1 představuje prostředí, za pomoci kterého se celý systém ovládá. Slouží k získávání dat, rekonstrukci, analýze a vizualizaci veškerých naměřených dat.



Obrázek 17 - Bruker BioSpec 94/30 USR.

5.1. Výběr tkáně pro fixaci

Myší mozek (viz Obrázek 18) byl vybrán jako vhodný objekt pro fixaci ve formaldehydu. Výběr nebyl náhodný, nervovou tkáň lze velice dobře charakterizovat svým vysokým obsahem složených lipidů, neesterifikovaného cholesterolu a proteinů (kanály, přenašeče, receptory, neurotransmitery). Sacharidy se vyskytují v menším měřítku. Formaldehyd, respektive jeho polymerizovaná forma - paraformaldehyd, jak už bylo napsáno v předešlých kapitolách, velice dobře fixuje jak bílkoviny, tak lipidy.



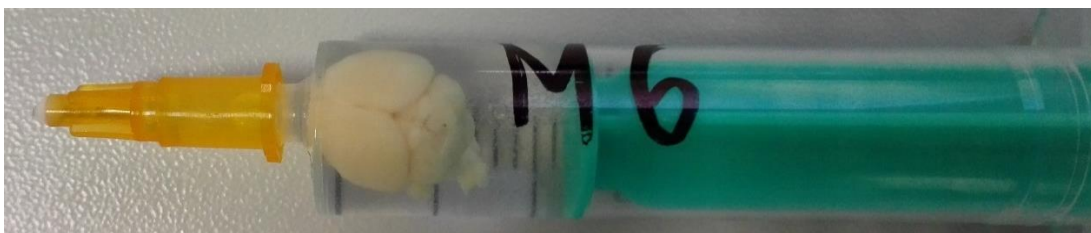
Obrázek 18 - Nefixovaný myší mozek, převzato z [17].

5.1.1. Odebrání mozku a fixace tkáně

Odebrání Odebrání tkáně a fixace myších mozků pomocí paraformaldehydu probíhala na ÚPT AV. Celkem bylo vyjmuto osm mozků, přičemž na čtyři mozky se použila metoda imerzní fixace, kdy se mozek ihned ponořil do osmiprocentního roztoku paraformaldehydu. U zbylých mozků se využila metoda perfuzní, tedy samotný fixační prostředek se vpravil do krevního oběhu transkardiálně. Vyjmuté mozky z *cranií* se taktéž vložily do osmiprocentního roztoku paraformaldehydu. První sada mozků má načervenalý charakter (Obrázek 19), druhá sada mozků má spíše šedší až bílý charakter (viz Obrázek 20), což je způsobeno samotnou perfuzní metodou (zbavení se krve v mozku, jak výplachem pomocí fyziologického roztoku, tak následným vpravením fixátoru).



Obrázek 19 - V pořadí třetí mozek fixovaný imerzní metodou pomocí paraformaldehydu.



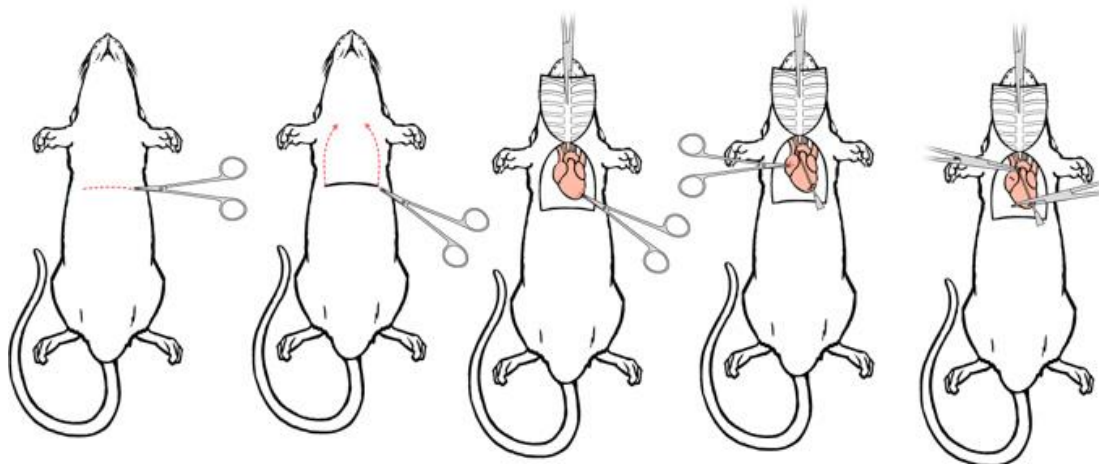
Obrázek 20 - V pořadí šestý myší mozek fixovaný perfuzní metodou pomocí paraformaldehydu.

Nejprve bylo nutné připravit 8% roztok paraformaldehydu. Do 250ml destilované vody (dH₂O) se přidalo 20g paraformaldehydu. Za stálého míchání se roztok přivedl na teplotu 60 – 65 °C (teplota 65 °C se nesmí překročit, výsledný roztok by nemusel mít dobré fixační vlastnosti). K získání čirého roztoku se kapátkem přidaly 2ml 1M roztoku hydroxidu sodného (NaOH) při nižší teplotě. [13]

Myš byla přivedena do celkové anestezie. Celková anestezie se kontroluje pomocí dechové frekvence. Při anestezii se mění dechová frekvence z původních 150 – 200 dechů za minutu na hodnoty kolem 40 – 60 dechů za minutu. Když byla ověřena účinnost anestezie, mohlo se přejít k samotnému zákroku vyjmutí mozku.

Zkrácený postup při perfuzní metodě fixace mozku (viz Obrázek 21) [13]:

- Ověření účinku anestezie.
- Laterální řez dlouhý 5 cm na břišní stěně těsně pod hrudním košem.
- Řez přes hrudní koš na jedné straně až ke klíční kosti.
- Totožný řez provedený na druhé straně.
- Odejmutí hrudního koše.
- Proveďte se malý řez na levé komoře, kam se zavede hrot perfuzní jehly.
- Proveďte se co největší řez na pravé síni, od tohoto okamžiku je zvíře připravené na perfuzi.
- Pod tlakem přivedeme do jehly a tedy i do oběhu myši nejdříve pufr a následně fixační roztok.
- Proveďte dekapitaci, vyjmeme mozek a oddělíme *olfactory bulbus* (čichový bulbus).
- Nakonec vložíme mozek do nádoby s fixátorem.



Obrázek 21 - Postup při perfuzní metodě fixace mozku, převzato z [13].

U imerzní metody fixace mozku se provede oddělení hlavy od trupu a vyjmeme mozek obdobným způsobem jak při perfuzní metodě. Mozek poté ihned vložíme do fixačního roztoku. Po 24 hodinách jsou mozky fixovány, uchováváme je v lednici (4°C). Od této chvíle máme připravené mozky pro snímkování.

5.2. Vložení mozku do systému, snímkování

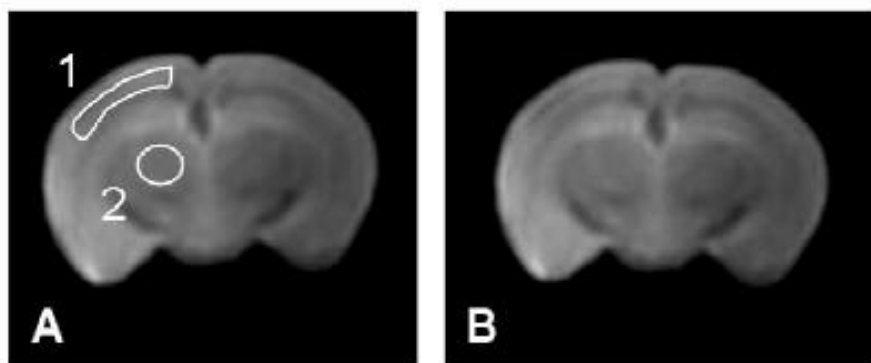
Před samotným vložením jednotlivých mozků do systému je nutné přemístění mozku do jiného roztoku a to z toho důvodu, že paraformaldehyd negativně ovlivňuje kvalitu jednotlivých snímků (značné množství vodíkových protonů). Mozek vkládáme do menší injekční stříkačky, která je naplněná Fomblinem. Během první série snímkování se vývod stříkačky utěsňoval uzávěrem, který vždy způsobil při natlačení na stříkačku plynové bublinky, které jsou taktéž při snímkování nežádoucí.

Při druhé sérii se místo určeného uzávěru zvolila jehla, která se nasadila na vývod, stříkačka se odvzdušnila tlakem na píst a jehla se poté kleštičkami odštípla, aby nedošlo k poranění. Tento systém s jehlou se ukázal jako velice účinný a chrání vniknutí okolního atmosférického vzduchu do injekční stříkačky, tak jak je ukázáno na Obrázek 19 Obrázek 20.

Při přemísťování mozku z roztoku paraformaldehydu do roztoku Fomblinu bylo nutné dodržet bezpečnostní předpisy. Kvůli tomu se veškerá manipulace s mozkiem odehrávala v digestoři a s předepsanými bezpečnostními prvky (ochranné rukavice, plášť, rouška). Jak již bylo zmíněno ve čtvrté kapitole, paraformaldehyd je zdraví škodlivá látka, jak při vdechování, tak při požití. Může mít karcinogenní účinky a proto používání ochranných pomůcek je více než žádoucí.

Fomblin je obchodní název pro fluorovaný polymer, přesnějším označením je to perfluoropolyether (PFPE). Při *Ex vivo* MRI nic využívá jako vhodné médium zabraňující

dehydrataci vzorků. Velkou výhodou při používání je, že neobsahuje ve své struktuře vodíkové atomy 1H , které by mohly negativně ovlivnit výsledný obraz, jak je tomu v případě paraformaldehydu, který má naopak značné množství vodíkových atomů. Proběhlo už několik studií a nebylo zjištěno, že by Fomblin ovlivňoval strukturu studované tkáně, jak ukazuje Obrázek 22. Křivky vyznačené na obrázku ukazují anatomické struktury v mozku, které nebyly ovlivněny Fomblinem. Další výhodou této látky spočívá v její netoxicitě. [14] [15]



Obrázek 22 - Kontrolní mozek (A) a mozek uložený ve Fomblinu (B), převzato z [[15].

Celkem bylo získáno osm myších mozků, které byly postupně snímkovány. Jednotlivé série snímků, které se vyhodnocovaly, byly získány v období od 8. 12. 2014 do 16. 4. 2015. Přibližně ve čtrnáctidenním intervalu.

Postupu vkládání a snímkování fixovaných mozků:

- Spuštění programu ParaVision 5.1 (operační systém GNU/Linux).
- Zapnutí gradientních cívek.
- V programu se vytvoří soubor pro nového pacienta s vhodným pojmenováním.
- Mozek v injekční stříkačce naplněné Fomblinem se na pojízdném rameni, na kterém je pevně fixována, vsune doprostřed magnetu.
- Spustí se úvodní sekvence TriPilot (lokalizace objektu, parametry sekvence Tabulka 2).
- Spuštění ladící sekvence Wobble pro naladění objemové vysílací cívky
- Ruční ladění probíhá v zadní části přístroje Bruker (prováděno pomocí otočných šroubů) – ladění trvá přibližně 10 minut (dle zručnosti a zkušenosti).
- Ukončení ladící sekvence *Wobble*.

Po provedení předešlých úkonů se v místnosti zhaslo, aby všechna měření probíhala za stejných podmínek.

Nyní se mohlo přistoupit k opětovnému provedení lokalizační sekvence (TriPilotMulti – sběr dat pro více řezů v koronárním, axiálním a sagitálním směru). Pokud nebyl mozek přesně uprostřed systému, bylo nutné posunout celé rameno s injekční stříkačkou blíž či dále od předpokládaného středu systému. Případně se rameno mírně zvedlo nahoru nebo dolů. Tyto úkony se opakovaly, dokud nebyl mozek správně lokalizován (snímky ze všech řezů). Toto nastavování probíhalo při první sérii měření delší dobu než při druhé sérii (naučení se všech potřebných úkonů během první série měření).

Parametry lokalizační sekvence TriPilotMulti:

Tabulka 2 - Parametry sekvence TriPilotMulti.

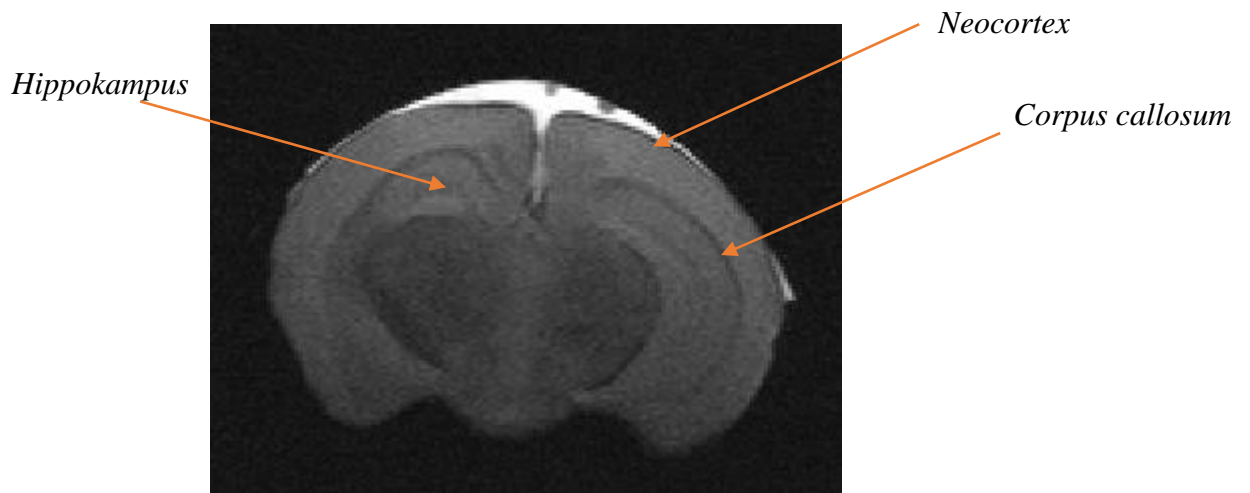
Sekvenční metoda	FLASH
TE	3 ms
TR	200 ms
Sklápěcí úhel	30 °
Tloušťka řezu	1 mm
Obrazová matice	256 x 256
Doba měření	25 s

Po úspěšném lokalizování mozku se mohly začít pořizovat anatomické snímky, které jsou stěžejní pro celou práci. Proto bylo nutné dbát správného nastavení. Po pořízení prvních koronárních anatomických řezů mozku bylo nutné vybrat jeden řez, na kterém jsou vidět anatomické struktury, pomocí nichž by se vybíraly i zbývající řezy u dalších mozků. Respektive vybrat takový řez, který napomůže vybrat řez u dalšího mozku s odpovídající anatomickou strukturou, která je dobře patrná (viz Obrázek 23)

K anatomickým řezům byla vybrána ONKO T2w RARE sekvence s parametry:

Tabulka 3 – Parametry sekvence T2w RARE pro anatomické obrazy.

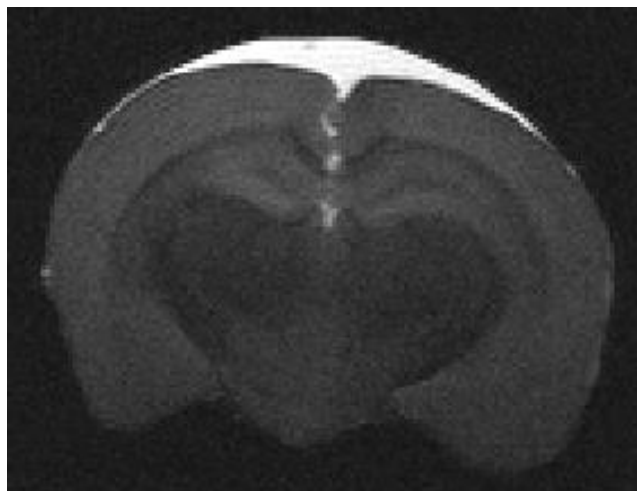
Sekvenční metoda	RARE
TE	36 ms
TR	3500 ms
Sklápěcí úhel	180 °
RARE faktor	8
FOV	1,70 x 1,92
Tloušťka řezu	0,7 mm
Obrazová matice	256 x 256



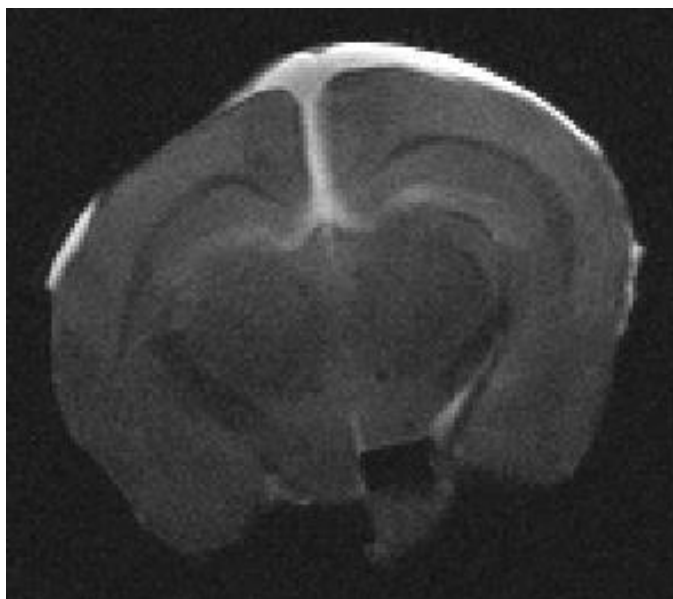
Obrázek 23 - Koronární řez myším mozkiem (třetí mozek v první sérii měření, imerzní fixace).

V našem případě se pro pozdější vyhodnocení relaxačních časů, po provedení vícero sérií měření, použily jako anatomické struktury *corpus callosum* a pravý a levý *hippokampus*. Tyto dvě struktury, které jsou zaznačeny i na Obrázek 23, jsou celkem dobře patrné a byly vybrány z důvodů určení relaxačních časů v bílé a šedé hmotě mozkové, aby se zjistilo, jestli není fixací znehodnocena jen některá část myšího mozku.

Na Obrázek 24Obrázek 25 jsou T_2 vážené snímky fixovaných myších mozků (rozdíly T_2 relaxačních časů tkání, čím delší T_2 čas, tím vyšší intenzita signálu – voda je hypersignální, hojně se využívají pro anatomické studium centrálního nervového systému). Na obrázcích jsou snímky myších mozků, které byly fixovány pomocí paraformaldehydu, jak imerzní metodou fixace (Obrázek 24), tak metodou perfuzní (Obrázek 25).



Obrázek 24 - Koronární řez myším mozkiem (čtvrtý mozek v první sérii měření, imerzní fixace).



Obrázek 25 - Koronární řez myším mozem (pátý mozek v první sérii měření, perfuzní fixace).

5.2.1. Získávání mapy obrazů pro zjištění relaxačního času T_1

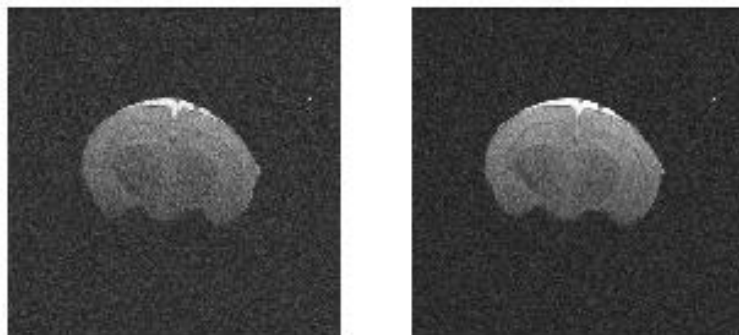
Po vybrání vhodného anatomického řezu se zapsala pozice, na které se řez nachází. Ta se následně použila jako akviziční parametr u tvorby sady obrazů. Importovaly se i zbylé parametry z anatomického řezu jako například FOV, *read matrix* aj.

Pro tvorbu obrazů s různými repetičními časy a různými echo časy a následně zjištění T_1 času pro pozdější hodnocení vlivu paraformaldehydu na relaxační vlastnosti biologického vzorku, byla použita sekvence RARE-VRT (Tabulka 4).

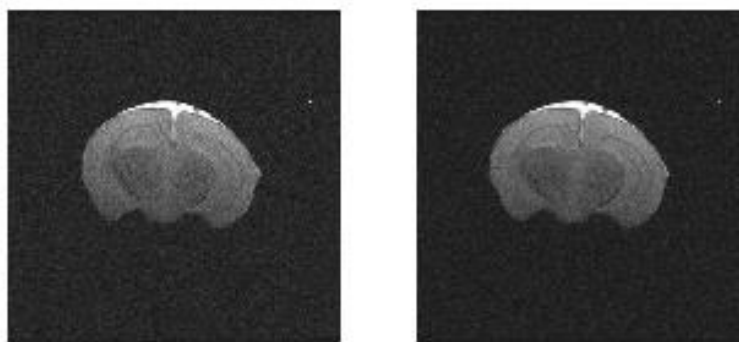
Tabulka 4 - Parametry sekvence RARA-VRT.

Sekvenční metoda	RARE
TE [ms]	10, 30, 50, 70, 90
TR [ms]	107,077; 223,923; 356,251; 508,799; 688,882; 908,676; 1190,802; 1585,245; 2246,036; 5000
Refokusační úhel	180 °
RARE faktor	2
FOV [cm]	1,70 x 1,92
Tloušťka řezu	0,7 mm
Obrazová matice	256 x 256
Doba měření	20 min 30 s

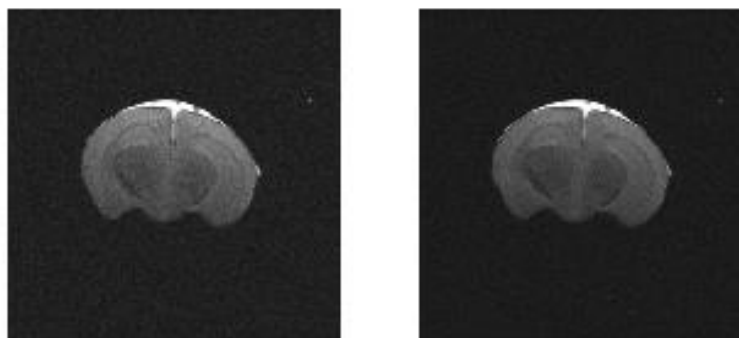
TE = 30 ms, TR = 688 ms TE = 30 ms, TR = 908 ms



TE = 30 ms, TR = 1190 ms TE = 30 ms, TR = 1585 ms



TE = 30 ms, TR = 2246 ms TE = 30 ms, TR = 5000 ms



Obrázek 26 – Výsledné obrazy po provedení RARE sekvence s různými TR a se stejným TE (třetí mozek v první sérii, imerzní metoda fixace).

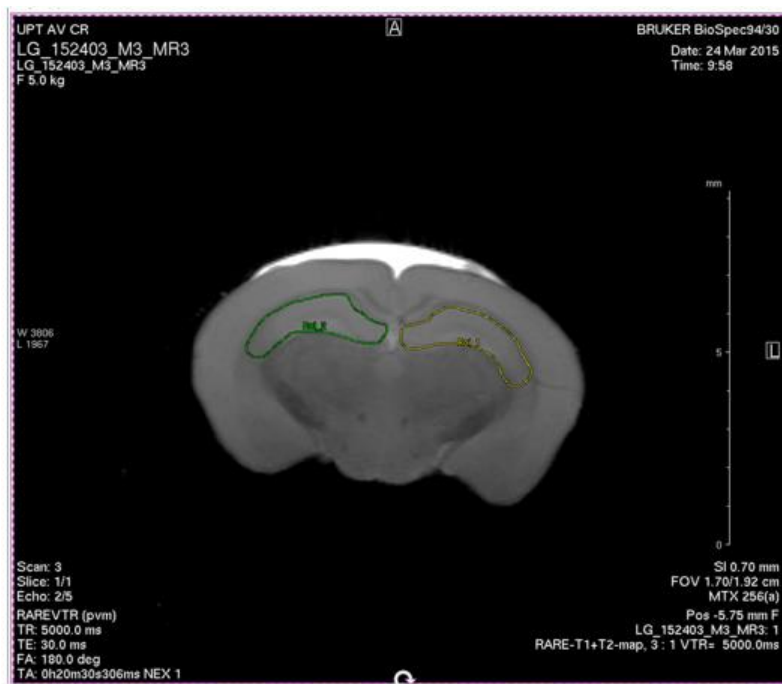
Po provedení celé sekvence RARE-VRT se v nastavení *Processing - Image sequence analysis (ISA)*, zvolil typ relaxačního času, v našem případě T_1 a v samotném obraze se pomocí funkce ROI (*Region of interest*) vybrala oblast zájmu (takový anatomický útvar, který je patrný i na dalších snímcích) pro zjištění relaxační časové

konstanty. V našem případě se jako oblast zájmu vybral *corpus callosum* a pravý a levý *hippokampus* (v anatomických snímcích oblast pod *corpus callosum* (Obrázek 23).

Nelze si nevšimnout velmi intenzivní (světlé) části v obrázcích nad tímto textem (Obrázek 23, Obrázek 24, Obrázek 25). Tento artefakt se vyskytuje na všech snímcích ve všech sériích měření. Tento artefakt se vyskytuje nad mozkem a kopíruje tvar injekční stříkačky. Útvar je způsoben formaldehydem. Část formaldehydu vždy v nějaké menší míře zůstane na mozku Po přesunu tkáně do Fomblinu se tedy díky své hustotě usadí na povrchu. Další možností je, že formaldehyd reaguje s Fomblinem či naopak.

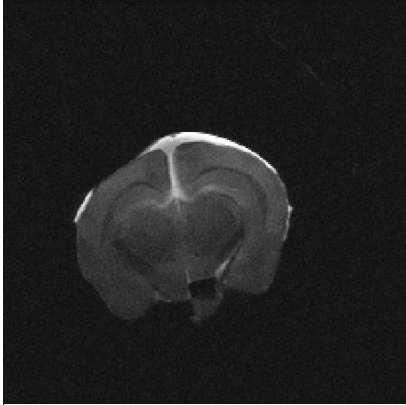
5.3. Naměřená data – fixátor paraformaldehyd

Po označení oblasti zkoumání, v našem případě pravý a levý *hippokampus* (Obrázek 27) a *corpus callosum*, vypočítal softwarový balíček ParaVision hodnoty relaxačního času T_1 a směrodatnou odchylku. Software počítá hodnoty relaxačního času s předem stanovené rovnice, přes všechny obrazy (pixely), které mají stejný čas TE, ale rozdílné TR.

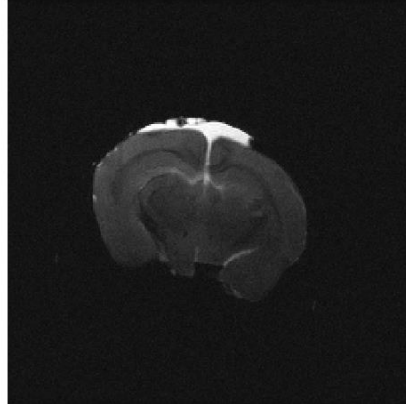


Obrázek 27 - Výběr oblasti pomocí křivky ROI (zelená a žlutá barva).

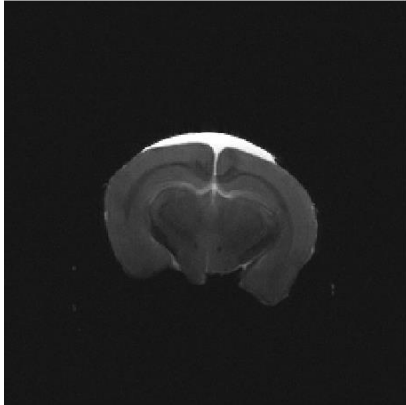
Datum měření - 8. 12. 2014



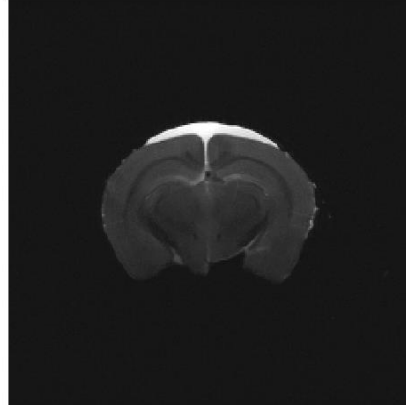
Datum měření - 19. 12. 2014



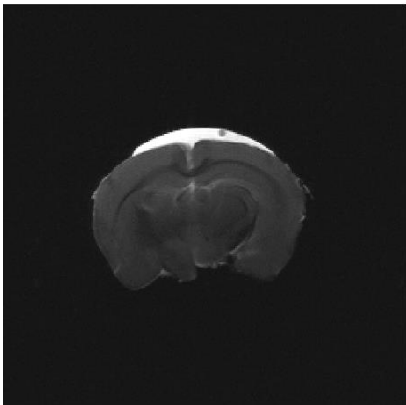
Datum měření - 12. 1. 2015



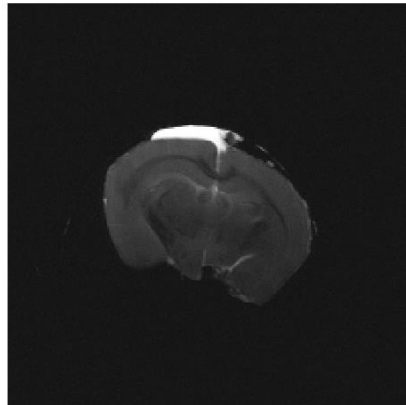
Datum měření - 26. 1. 2015



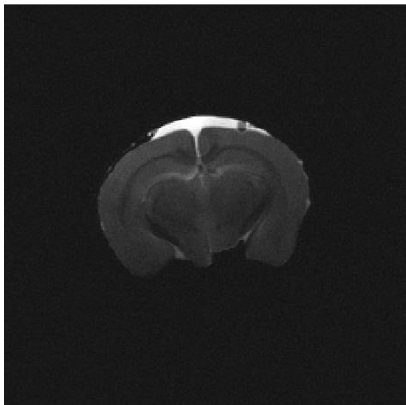
Datum měření - 10. 2. 2015



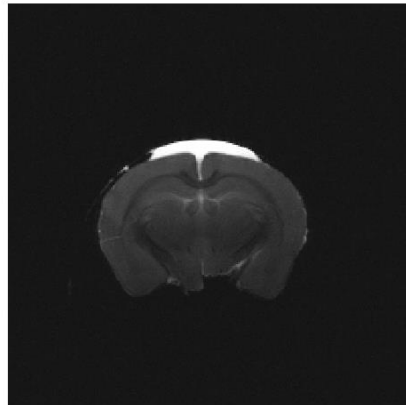
Datum měření - 23. 2. 2015

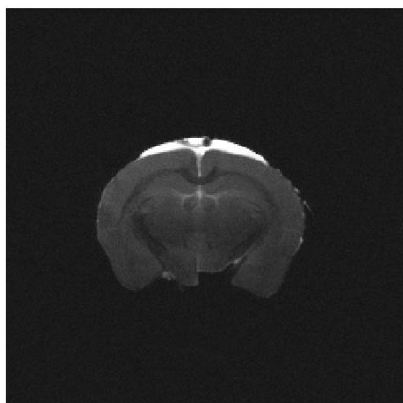


Datum měření - 10. 3. 2015



Datum měření - 24. 3. 2015





Obrázek 28 – Pátý mozek fixovaný perfuzní metodou ukázán v časovém horizontu čtyř měsíců (sekvence RARE).

5.3.1. Tabulky s naměřenými daty - fixátor paraformaldehyd

Jak již bylo několikrát napsáno, veškerá naměřená data pochází z období od 8. 12. 2014 do 16. 4. 2015. V jednotlivých tabulkách, jež se nacházejí v Příloha 1, jsou uvedeny hodnoty naměřené pro jednotlivé mozky z již zmíněného období. Oranžovou barvou jsou označeny hodnoty relaxačního času T_1 , které byly v průběhu měření zjištěny jako nejvyšší. Světle modré hodnoty pak poukazují na nejnižší naměřenou hodnotu. Pro ukázkou naměřených dat jsou zde uvedeny jen některé tabulky.

Tabulka 5 - Veškerá naměřená data pro první mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda imerzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T_1 [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1266	9	1360	4
19. 12. 2014	1167	257	1132	220
12. 1. 2015	1195	191	1210	150
26. 1. 2015	1195	240	1164	244
10. 2. 2015	1168	259	1208	271
23. 2. 2015	1197	209	1168	253
10. 3. 2015	1182	178	1148	211
24. 3. 2015	1198	204	1189	191
16. 4. 2015	1211	241	1180	240
Průměrná hodnota	1198	199	1195	198

Tabulka 6 - Veškerá naměřená data pro pátý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda perfuzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1018	245	1122	240
19. 12. 2014	1276	237	1255	321
12. 1. 2015	1251	263	1340	209
26. 1. 2015	1238	328	1243	281
10. 2. 2015	1233	274	1289	290
23. 2. 2015	1294	219	1237	290
10. 3. 2015	1257	222	1205	271
24. 3. 2015	1279	251	1270	283
16. 4. 2015	1240	288	1250	305
Průměrná hodnota	1232	259	1246	277

Data naměřená pro *corpus callosum* jsou taktéž v Příloha 1. Hodnoty jsou naměřeny ve stejném časovém intervalu jako hodnoty pro pravý a levý *hippokampus*. Nejvyšší naměřené hodnoty jsou zvýrazněny oranžovou barvou, světle modrou barvou pak nejnižší naměřené hodnoty. Pro ilustraci naměřených hodnot jsou zde uvedeny alespoň dvě tabulky pro imerzní a perfuzní fixaci.

Tabulka 7 - Veškerá naměřená data pro druhý mozek (*corpus callosum*), metoda imerzní fixace.

Datum měření	<i>corpus callosum</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	909	291
19. 12. 2014	1180	218
12. 1. 2015	1207	109
26. 1. 2015	1216	101
10. 2. 2015	1177	208
23. 2. 2015	1206	119
10. 3. 2015	1173	172
24. 3. 2015	1223	154
16. 4. 2015	1138	258
Průměrná hodnota	1159	181

Tabulka 8 - Veškerá naměřená data pro šestý mozek (*corpus callosum*), metoda perfuzní fixace.

Datum měření	<i>corpus callosum</i>	
	Relaxační čas T_1 [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1060	257
19. 12. 2014	1005	365
12. 1. 2015	1190	206
26. 1. 2015	1229	333
10. 2. 2015	1191	276
23. 2. 2015	1169	317
10. 3. 2015	1067	359
24. 3. 2015	1166	299
16. 4. 2015	1121	215
Průměrná hodnota	1133	292

5.3.2. Zhodnocení naměřených dat - fixátor paraformaldehyd

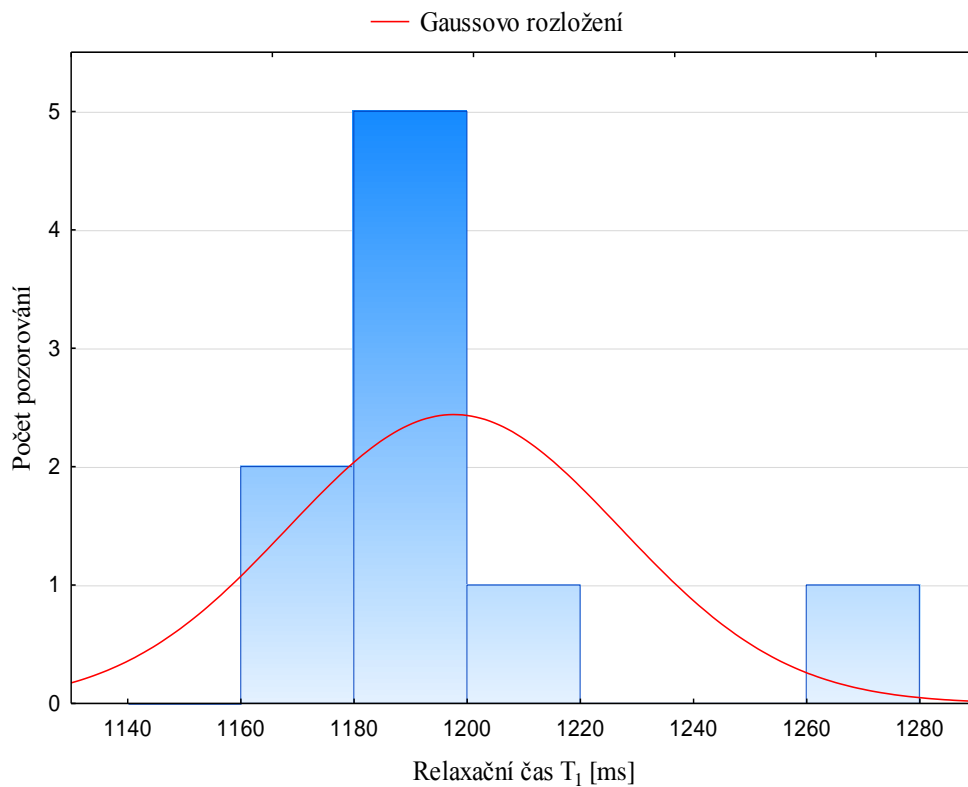
Statistické zhodnocení veškerých naměřených dat probíhalo v softwaru STATISTICA 12 se školní licencií.

Pro to, abychom mohli rozhodnout, jaký statistický test zvolit pro naše naměřená data, je nejprve nutné určit, zda soubor naměřených dat odpovídá Gaussovu rozložení pravděpodobností. Určení se provádí pomocí testů normality. Pokud se zjistí, že data nemají Gaussovské rozdělení, pak pracuje s neznámým rozdělením. [20]

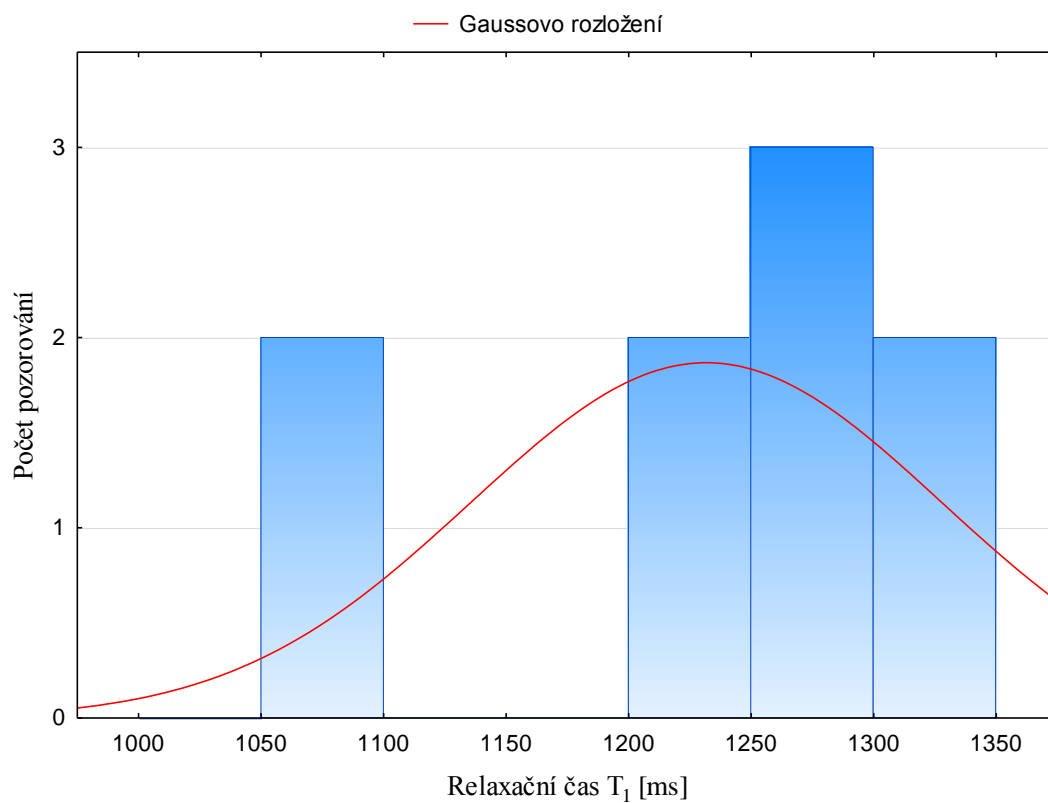
Pro zjištění normality lze postupovat dvěma směry, a v obou směrech je nepřehledné množství metod a technik jak ověřit normalitu dat. První možností je použití testů, při nichž se vyvrací či potvrzuje hypotéza, že je datový výběr z normálního rozložení. Jako příklad lze uvést Shapirův-Wilkův test či Kolmogorovův-Smirnovův test. Druhou možností je grafické ověření normality dat. Jako příklady lze uvést *Normal Probability Plot* (NP plot) či ověření normality pomocí histogramů. [20] [21]

V našem případě se zvolily grafické metody ověření normality dat. Je nutné podotknout, že se využívají pro vizuální kontrolu předpokladů na rozdělení zkoumaných dat. Je ještě dobré říci, že z testu normality se odvíjí, jaký další statický test se použije pro následnou analýzu dat. Pokud by data měla normální rozdělení, tak by se použily parametrické testy. Při neznámém rozdělení se použijí neparametrické testy, které ovšem mají sníženou sílu testu a to z toho důvodu, že se redukuje informační hodnota dat, protože neparametrické testy nevyužívají původní hodnoty, ale ve většině případů počítají jen s jejich pořadím. Při nedodržení předpokladů parametrických testů (např. normalita dat)

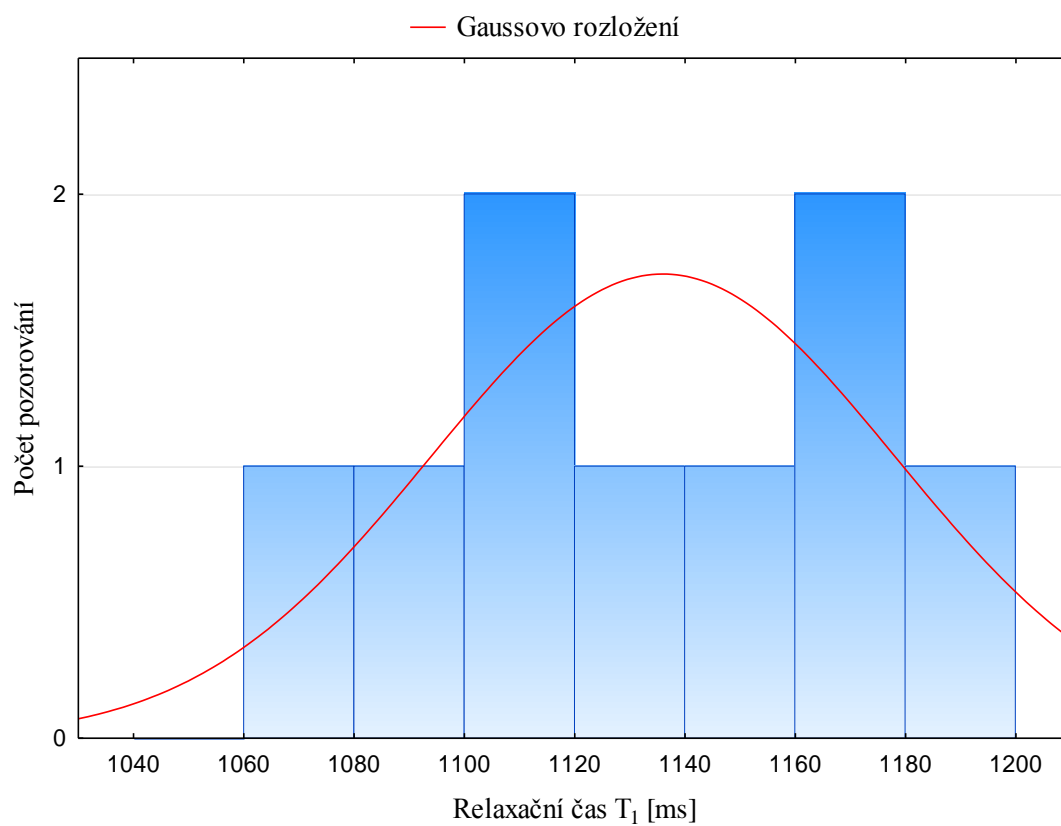
prudce klesá síla testů a výsledky testů mohou být nesmyslné a chybné, proto je důležité ověřit normalitu dat. [20] [21]



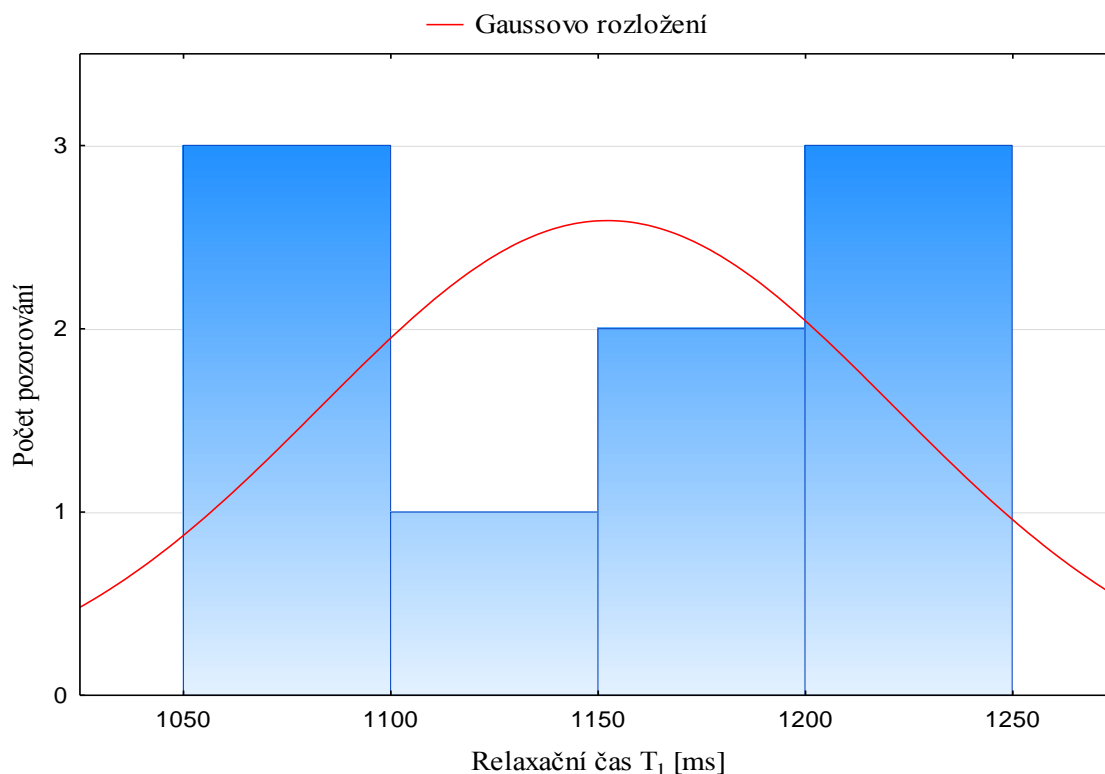
Obrázek 29 - Histogram pro první mozek, levý *hippokampus* (imerzní metoda fixace).



Obrázek 30 - Histogram pro šestý mozek, pravý *hippokampus* (perfuzní metoda fixace).

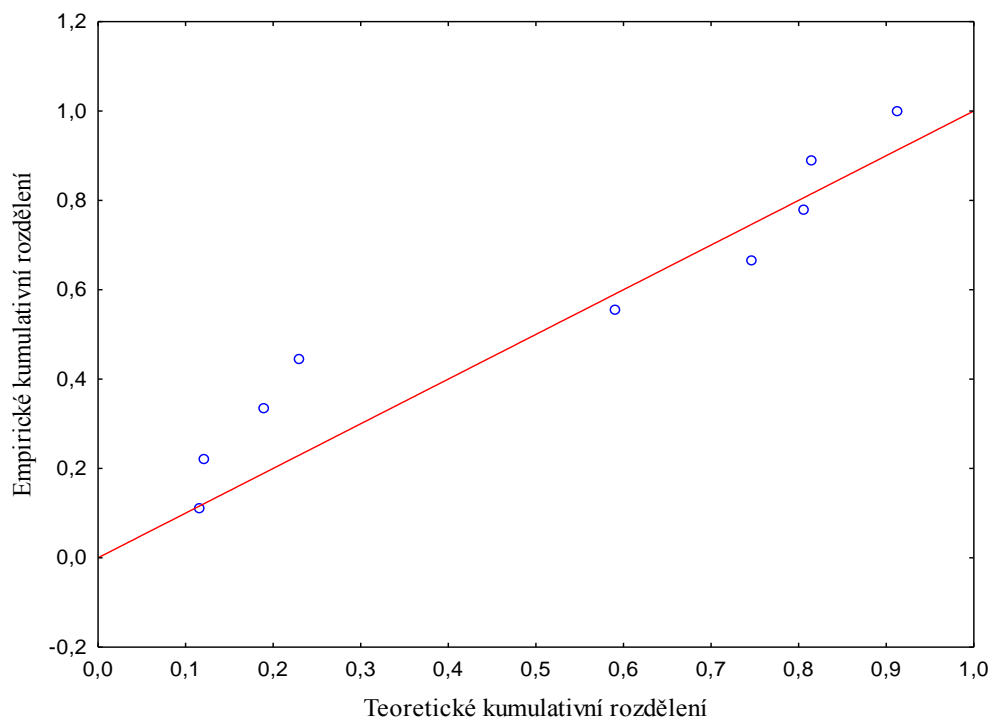


Obrázek 31 - Histogram pro třetí mozek, *corpus callosum* (imerzní metoda fixace).



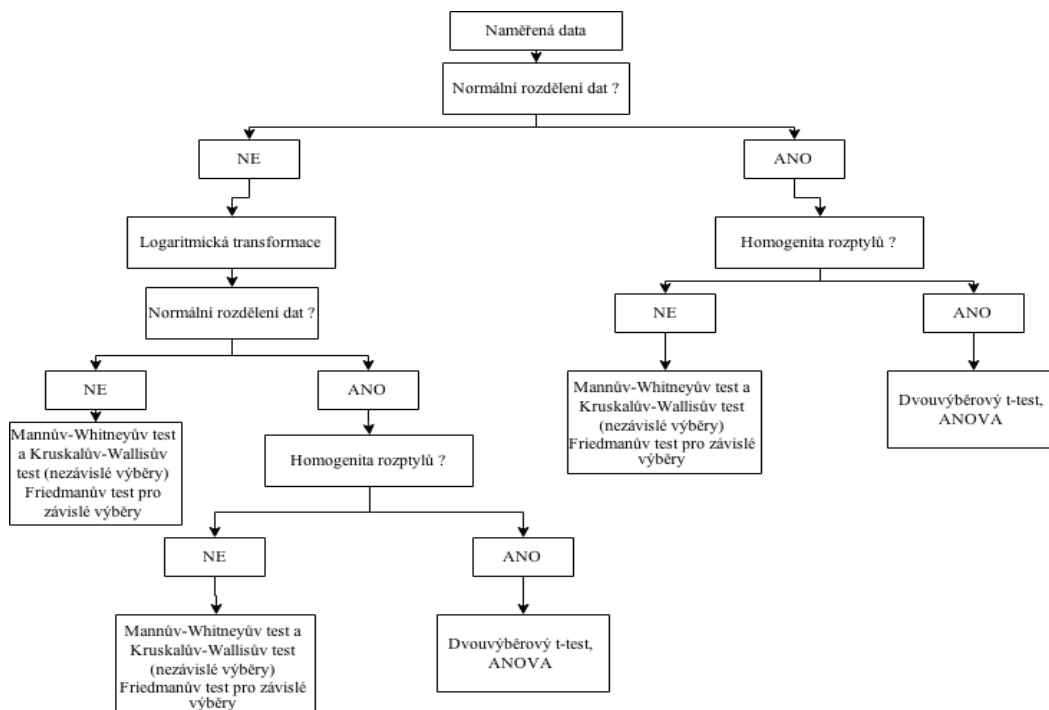
Obrázek 32 - Histogram pro sedmý mozek, *corpus callosum* (perfuzní metoda fixace).

Z předcházejících grafů na Obrázek 29 Obrázek 32 je patrné, že naměřená data nemají normální rozložení, v grafech je normální rozložení zobrazeno červenou barvou. Data mají nedetekovatelné rozložení. Ještě byla provedena logaritmická transformace dat (jednotlivé hodnoty relaxačních časů se převedly do logaritmického měřítka a vynesly se opět do histogramů), ale ani po této transformaci data neměla Gaussovo rozložení. Z tohoto zjištění bylo odvozeno, že budeme pro statistické zhodnocení dat používat neparametrické testy. Ještě pro absolutní jistotu je vykreslen jeden P-P graf (Pravděpodobnostně pravděpodobnostní graf Obrázek 33), pomocí kterého se také určuje normalita. V tomto grafu jde jen o to, aby zaznačené hodnoty ležely na přímce, potom se jedná o normální rozložení, pokud leží vykreslené hodnoty mimo přímku, tak se nejedná o normální rozložení. Jednoduše se dá ještě o P-P grafu říci, že se vezmou hodnoty dat a těm se stanoví v daných bodech teoretický a pozorovaný kvantil. [22]



Obrázek 33 - P-P graf, sedmý mozek (perfuzní metoda fixace), *corpus callosum*, který porovnává naměřená data s normálním rozložením.

P-P grafem jsme ověřili normalitu dat a potvrdili jsme si, že data opravdu nepochází z normální rozložení a můžeme tedy přejít k výběru neparametrického testu. Při výběru testu jsme vycházeli z následujícího schématu (Obrázek 34).



Obrázek 34 – Rozhodovací schéma pro výběr vhodného testu (testování dvou a více skupin), převzato a upraveno z [19].

Ze schématu plyne, že využijeme jen jeho levou část. Zjistili jsme, že data nemají normální rozdělení a nemají ho ani po logaritmické transformaci dat. Nyní je nutné si uvědomit, jaký design nejlépe pasuje na naše data. Párový design říká, že mezi objekty ve srovnávaných skupinách existuje vazba (např. člověk před operací a po operaci či reakce stejného kmene krysy). Nepárový design říká, že skupiny srovnávaných dat jsou na sobě zcela nezávislé (např. lidé z různých zemí či nezávislé skupiny pacientů s různou léčbou). [20] [21]

Pro naše účely je víc než vhodný párový design, protože ve srovnávaných skupinách (jednotlivé mozky) existuje vazba. Pro zjištění, zda má paraformaldehyd vliv na jednotlivé části mozku (levý *hippokampus*, pravý *hippokampus*, *corpus callosum*) ve skupinách nejprve jen pro imerzní metodu fixace a pak i pro perfuzní metodu fixace, byl vybrán Friedmanův test.

Friedmanův test je testem pořadovým, takže se před analýzou v software Statistica musí určit pořadí hodnot ([23]), tedy největší hodnotě relaxačního času T_I přísluší v našich datech pro jednu skupinu jednička a nejnižší hodnotě přísluší devítka (vzhledem k počtu měření - Tabulka 9).

Tabulka 9 - Relaxační časy T_I pro skupinu pravý *hippokampus* a ukázka pořadí jednotlivých hodnot.

Číslo měření	Levý <i>hippokampus</i>							
	Relaxační časy T_I [ms]				Pořadí hodnot			
1	1360	1123	1167	1059	1	9	2	9
2	1132	1160	1155	1236	9	6	3	2
3	1210	1261	1185	1233	2	1	1	3
4	1164	1220	1123	1126	7	4	7	8
5	1208	1162	1101	1244	3	5	8	1
6	1168	1223	1145	1140	6	3	4	7
7	1148	1144	1130	1143	8	8	6	6
8	1189	1231	1133	1155	4	2	5	5
9	1180	1154	1100	1169	5	7	9	4

Z pořadí hodnot se již dá udělat Friedmanův test. Ve statistice je tento test v záložce *Statistika – Neparametrické metody – Porovnání více závislých (vzorků) proměnných*.

V tuto chvíli je nutné si definovat nulovou (H_0) a alternativní hypotézu (H_A). Nulová hypotéza nám říká, že sledovaný efekt mezi skupinami je nulový (předpoklad, který ověřujeme), alternativní hypotéza říká, že sledovaný efekt je různý mezi skupinami (tvrzení, které předpoklad popírá).

Hladina testu α je zvolené číslo (interval 0 až 1), které tvoří interval spolehlivosti, a za pomoci této hodnoty porovnáváme, zda vypočítaná hodnota statisticky leží nebo neleží v tomto intervalu. V našem případě je $\alpha = 0,05 \Rightarrow 95\%$ interval. V softwaru Statistica vyjde po provedení testu hodnota p , což je nejmenší hladina, na které zamítáme. Pokud je $p < \alpha$, je platnost H_0 málo pravděpodobná a zamítneme H_0 na hladině α a přijímáme alternativní hypotézu H_A . Pokud je $p \geq \alpha$, nezamítáme H_0 , ale zároveň to neznamená zamítnutí H_A . I přes správný design experimentu se můžeme při rozhodnutí o zamítnutí či nezamítnutí nulové hypotézy dopustit chyby, což je velice důležité si uvědomit. Existují dvě varianty chyb. Chyba prvního druhu (značená jako α), která říká, že nulová hypotéza ve skutečnosti platí, ale náš test prokázal alternativu. Chyba druhého druhu (značená jako β), kdy ve skutečnosti platí hypotéza alternativní, ale test nezamítl hypotézu nulovou. [20] [21]

Nulová a alternativní hypotéza pro naše testy:

- H_0 : Relaxační časy T_I se mění v čase jen náhodně při použití PFA (tzn. nezáleží na tom, kolik měření provedeme).
- H_A : Relaxační časy T_I se v čase nemění náhodně při použití PFA.

Tabulka 10 - Výsledky Friedmanova testu pro pravý *hippokampus*, imerzní fixace.

Friedmanova ANOVA				
Proměnná	Průměrné pořadí	Součet pořadí	Průměr	Směrodatná odchylka
První mozek	2,555	23,0	5	2,738
Druhý mozek	2,277	20,5	5	2,738
Třetí mozek	2,555	23,0	5	2,738
Čtvrtý mozek	2,611	23,5	5	2,738
p hodnota	0,941			

Z tabulky (Tabulka 10) nás nejvíce zajímá hodnota $p = 0,941$. Nastavený interval spolehlivosti je $95\% \Rightarrow \alpha = 0,05$. Z těchto čísel plyne, že $p > \alpha$ a tudíž nezamítáme nulovou hypotézu.

Stejný test provedeme i pro mozky, které byly fixovány rovněž paraformaldehydem, ale fixační metoda byla perfuzní. H_0 : PFA nemá vliv na relaxační čas T_I ve čtyřech mozcích (pro pravý *hippokampus*), fixovaných metodou perfuzní. H_A : PFA má vliv na relaxační časy T_I ve vybraných skupinách mozků.

Tabulka 11 - Výsledky Friedmanova testu pro pravý *hippokampus*, perfuzní fixace.

Friedmanova ANOVA				
Proměnná	Průměrné pořadí	Součet pořadí	Průměr	Směrodatná odchylka
První mozek	2,666	24,0	5,000	2,738
Druhý mozek	2,333	21,0	5,000	2,738
Třetí mozek	2,388	21,5	4,888	2,803
Čtvrtý mozek	2,611	23,5	5,000	2,738
p hodnota	0,897			

Z tabulky (Tabulka 11) vyčtená hodnota $p = 0,897$. Nastavený interval spolehlivosti je 95 % $\Rightarrow \alpha = 0,05$. Z těchto čísel plyne, že $p > \alpha$ a tudíž nezamítáme nulovou hypotézu o tom, že PFA nemá vliv na relaxační časy T_1 pro vybraná data (pátý až osmý mozek – perfuzní fixace).

Z vypočítaných hodnot vyplývá, relaxační časy se mění v čase (datum měření) jen náhodně při použití paraformaldehydu. Tudíž ani imerzní a ani perfuzní metoda fixace nemá vliv na relaxační časy T_1 v oblasti *hippokampů*.

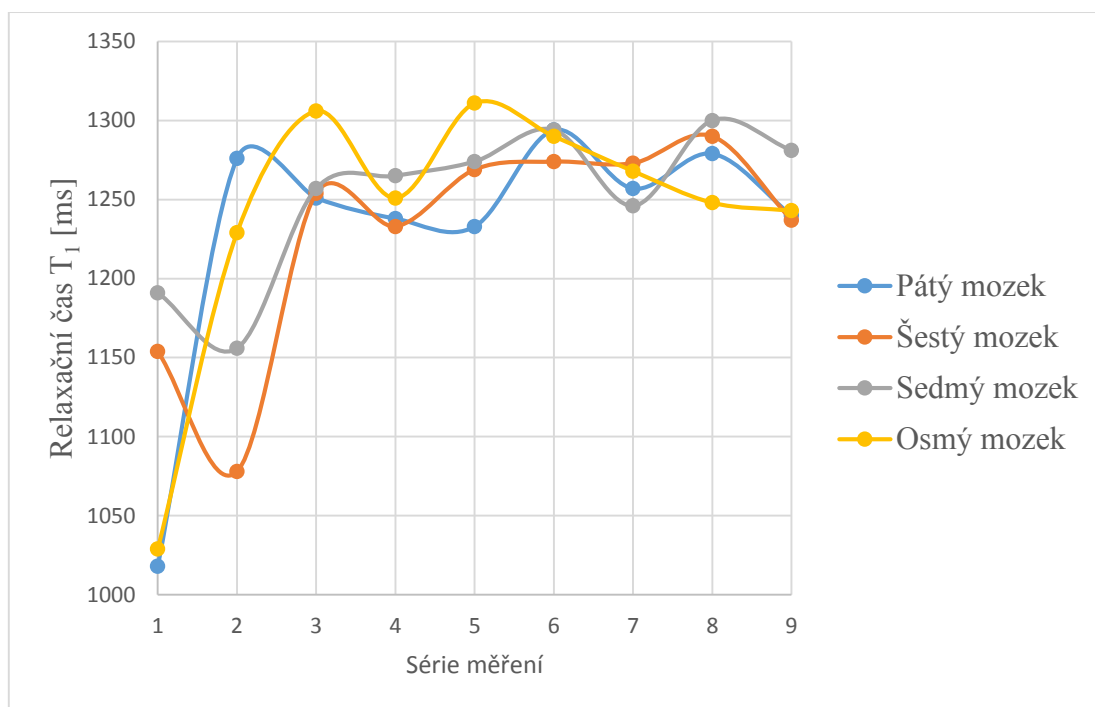
Friedmanův test provedeme i pro oblast *corpus callosum*, abychom zjistili, jestli náhodou není rozdíl v relaxačních časech T_1 v bílé hmotě mozkové oproti šedé hmotě mozkové (vliv paraformaldehydu na různé části mozku), která je reprezentována *hippokampem*. Postup je totožný jak v předešlém případě. A tedy nulová hypotéza H_0 : Relaxační časy T_1 se mění v čase jen náhodně při použití PFA (tzn., nezáleží na tom, kolik měření provedeme). H_A : Relaxační časy T_1 se v čase nemění náhodně při použití PFA.

Tabulka 12 - Výsledky Friedmanova testu pro *corpus callosum*, imerzní fixace.

Friedmanova ANOVA				
Proměnná	Průměrné pořadí	Součet pořadí	Průměr	Směrodatná odchylka
První mozek	2,444	22,0	5,000	2,738
Druhý mozek	2,277	20,5	5,000	2,738
Třetí mozek	2,888	26,0	5,000	2,738
Čtvrtý mozek	2,388	21,5	4,777	2,774
p hodnota	0,718			

Z tabulky (Tabulka 12) vyčtená hodnota $p = 0,718$ a $\alpha = 0,05$. Z toho vyplývá, že $p > \alpha$ a tudíž nezamítáme nulovou hypotézu. Stejný test se stejnými parametry byl proveden i pro zbývající čtyři mozky, fixované tentokrát perfuzní metodou a vyšlo, že $p > \alpha$ a tudíž nezamítáme nulovou hypotézu.

Z těchto statistických analýz plyne, že paraformaldehyd nemá vliv na relaxační časy T_1 u všech mozků, fixovaných jak metodou imerzní, tak metodou perfuzní. Změny relaxačních časů jsou jen náhodné.



Graf 1 – Flukтуаční charakter naměřených relaxačních časů T_1 pro pátý až osmý mozek, levý *hippokampus*.

Je vhodné ještě vyhodnotit, zda jsou obě metody fixování stejné či jestli je mezi nimi rozdíl. Jak již bylo nastíněno, naše data nemají normální rozložení, tedy k testu, jestli je rozdíl mezi oběma metodami, použijeme opět některý z neparametrických. K tomuto účelu se hodí dvouvýběrový Wilcoxonův test, respektive jeho obdoba obdoba, což je Mannův-Whitneyův U test. [19]

Nulová a alternativní hypotéza:

- H_0 : Nejsou rozdíly mezi metou perfuzní fixace a metodou imerzní fixace.
- H_A : Jsou rozdíly mezi oběma metodami.

Data si nejprve upravíme - vezmeme si hodnoty relaxačního času T_1 z pravého a levého *hippokampu* u čtvrtého mozku a data z osmého mozku, opět pro levý a pravý *hippokampus*. Všechny tyto hodnoty si dáme do jednoho sloupce. Do druhého sloupce přiřadíme číslo jedna, ovšem jen těm hodnotám, které se měřily na mozcích fixovaných imerzně. Mozkům, které byly fixovány perfuzně, se přiřadí do téhož sloupce číslo dva. Máme tedy dva sloupce, v jednom jsou hodnoty relaxačních časů T_1 a ve druhém sloupci jsou čísla jedna a dva příslušící jedné z metod fixace.

V programu Statistica si v záložce Statistika (*Statistics*) zvolíme neparametrické metody (*Nonparametrics*), dále pak vybereme porovnání dvou nezávislých skupin (*Comparing two independent groups*). Jako závislou proměnou (*dependent variables*) vybereme relaxační časy a jako nezávislou proměnou (*independent variables*) vybereme metodu fixace.

Tabulka 13 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro čtvrtý a osmý mozek.

Mannův - Whitneyův U test (Wilcoxonův)		
Proměnná	Součet pořadí pro první skupinu	Součet pořadí pro druhou skupinu
Relaxační časy	235	431
p hodnota pro výběry větší jak 30 hodnot	0,0020	
p hodnota pro výběry menší jak 30 hodnot	0,0014	

Z tabulky (Tabulka 13) vyčteme, že výsledná p hodnota je rovna $p = 0,002$. $\alpha = 0,05$ a tedy $\alpha > p$, tudíž zamítáme nulovou hypotézu na dané hladině významnosti o tom, že jsou obě metody fixace stejné a přijímáme hypotézu alternativní, která říká, že jsou rozdíly mezi metodou perfuzní a imerzní.

Stejný test provedeme pro ověření ještě jednou, tentokrát s hodnotami relaxačního času pro třetí a sedmý mozek.

Tabulka 14 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro třetí a sedmý mozek.

Mannův - Whitneyův U test (Wilcoxonův)		
Proměnná	Součet pořadí pro první skupinu	Součet pořadí pro druhou skupinu
Relaxační časy	212	454
p hodnota pro výběry větší jak 30 hodnot	0,000138	
p hodnota pro výběry menší jak 30 hodnot	0,000049	

Hodnota α z Tabulka 14 je větší jak hodnota $p = 0,000138$. Zamítáme nulovou hypotézu, že jsou obě metody fixování stejné a přijímáme hypotézu alternativní.

Pro ověření naší hypotézy uděláme další test, tentokrát s mozkiem třetím a čtvrtým. Oba byly fixovány stejnou metodou a měli bychom tedy potvrdit nulovou hypotézu.

Nulová a alternativní hypotéza:

- H_0 : Nejsou rozdíly mezi oběma metodami fixace.

- H_A : Jsou rozdíly mezi oběma metodami fixace.

Tabulka 15 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro třetí a čtvrtý mozek.

Mannův - Whitneyův U test (Wilcoxonův)		
Proměnná	Součet pořadí pro první skupinu	Součet pořadí pro druhou skupinu
Relaxační časy	83	88
p hodnota pro výběry větší jak 30 hodnot	0,860	
p hodnota pro výběry menší jak 30 hodnot	0,863	

Z tabulky (Tabulka 15) odečteme p hodnotu pro výběry menší jak třicet hodnot, protože jsme použili vždy jen hodnoty relaxačního času pro levý *hippokampus* u třetího a čtvrtého mozku, které byly fixovány imerzně. Stejný test provedeme i pro šestý a sedmý mozek, ty však byly fixovány metodou imerzní.

Tabulka 16 - Výsledky Mannova-Whitneyova testu pro šestý a sedmý mozek.

Mannův - Whitneyův U test (Wilcoxonův)		
Proměnná	Součet pořadí pro první skupinu	Součet pořadí pro druhou skupinu
Relaxační časy	95	76
p hodnota pro výběry větší jak 30 hodnot	0,427	
p hodnota pro výběry menší jak 30 hodnot	0,436	

V obou tabulkách (Tabulka 15 a Tabulka 16) je p hodnota větší jak α , tudíž nezamítáme nulovou hypotézu o tom, že obě metody jsou stejné. Tyto testy byly prováděny pro ověření předcházejících testů, kdy jsme vyvrátili, že metoda fixace imerzní a perfuzní je stejná.

5.4. Naměřená data - fixátor genipin

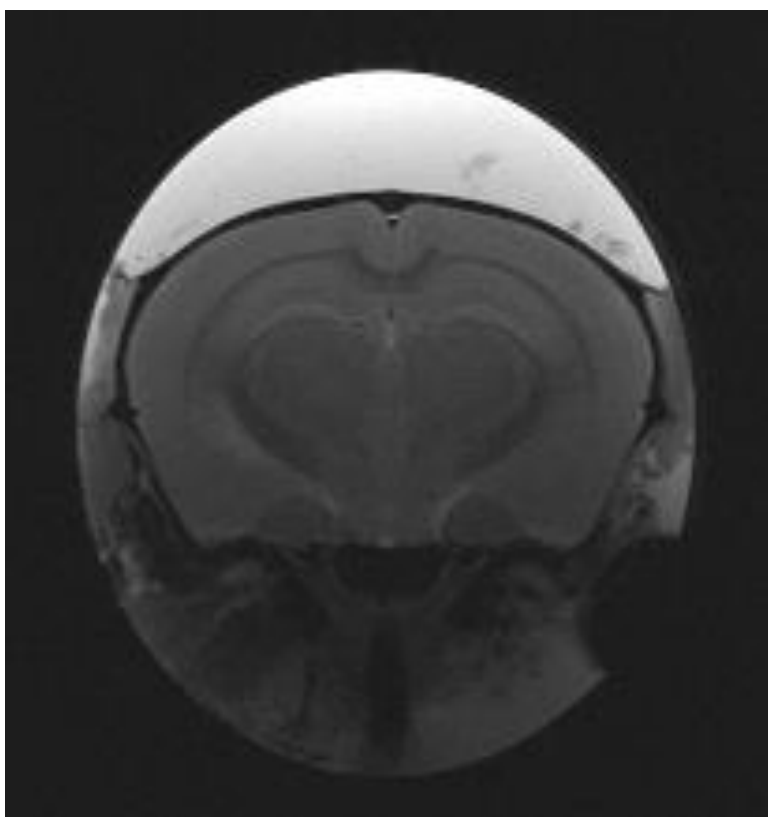
Genipin, jak už bylo napsáno ve čtvrté kapitole, je přírodní síťovací činidlo. Při reakci genipinu s aminokyselinami vzniká modrý pigment. Genipin byl vybrán jako vhodný fixátor z důvodů jeho nízké toxicity. Navíc odpadá, tedy na rozdíl od paraformaldehydu, používání ochranných pomůcek. Dle dřívějších studií, popsanych ve čtvrté kapitole, je fixace pomocí této přírodní látky kvalitnější.

Postup fixace dalších devíti myších mozků byl naprosto stejný jak při použití paraformaldehydu. Byla použita jak metoda imerzní fixace, tak metoda perfuzní fixace. Rozdíl byl jen v přípravě samotného fixačního činidla. Příprava fixátoru:

- Genipin byl dodán ve formě prášku. Tento prášek se rozpouštěl ve vodném prostředí (bylo nutné roztok mírně zahřát, protože se tvořily shluky nerozpuštěného práškového genipinu).
- Byl vytvořen 0,33 % roztok genipinu.
- Roztok genipinu byl pufrován 0,01 M PBS (*Phosphate Buffered Saline*), což je fosfátový roztok s 0,15 M chloridu sodného (pufrovaný fyziologický roztok).

Po přípravě roztoku se mohlo přistoupit k samotné fixaci. Osm mozků bylo fixováno imerzní metodou a jeden fixován perfuzní metodou viz kapitola 5.1.1. Pro kvalitní fixaci se tkáň měla nechat fixovat po dobu tří dnů při teplotě 37 °C. [11]

Měření relaxačních časů a tvorba anatomických obrazů probíhala naprosto totožně jak při snímkování fixovaných mozků pomocí paraformaldehydu. Jediný rozdíl byl v tom, že se mozky nechaly v *craniu* (Obrázek 35). Byly provedeny dvě série měření a to v termínech 30. 4. 2015 a 6. 5. 2015.



Obrázek 35 – Fixovaný myší mozek ponechaný v *craniu*, imerzní metoda fixace – fixátor genipin, první mozek v první sérii měření.

5.4.1. Tabulky s naměřenými daty - fixátor genipin

Veškeré tabulky s naměřenými daty se nacházejí v Příloha 2. Je z nich jasně patrné, že v první sérii měření vycházely relaxační časy T_1 menší, než v sérii druhé. Pokud vezmeme hodnoty celkově, tak jsou o několik stovek milisekund zvětšené oproti hodnotám časů T_1 , které byly získány při měření s fixátorem paraformaldehydem (Příloha 1). Pro ilustraci naměřených hodnot jsou zde uvedeny tabulky pro tři měření. Dvě pro imerzní fixaci a jedna pro perfuzní fixaci.

Tabulka 17 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro první mozek, imerzní fixace.

Mozek 1 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1653	355	1652	358
13. 5. 2015	1650	233	1653	241

Tabulka 18 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro druhý mozek, perfuzní fixace.

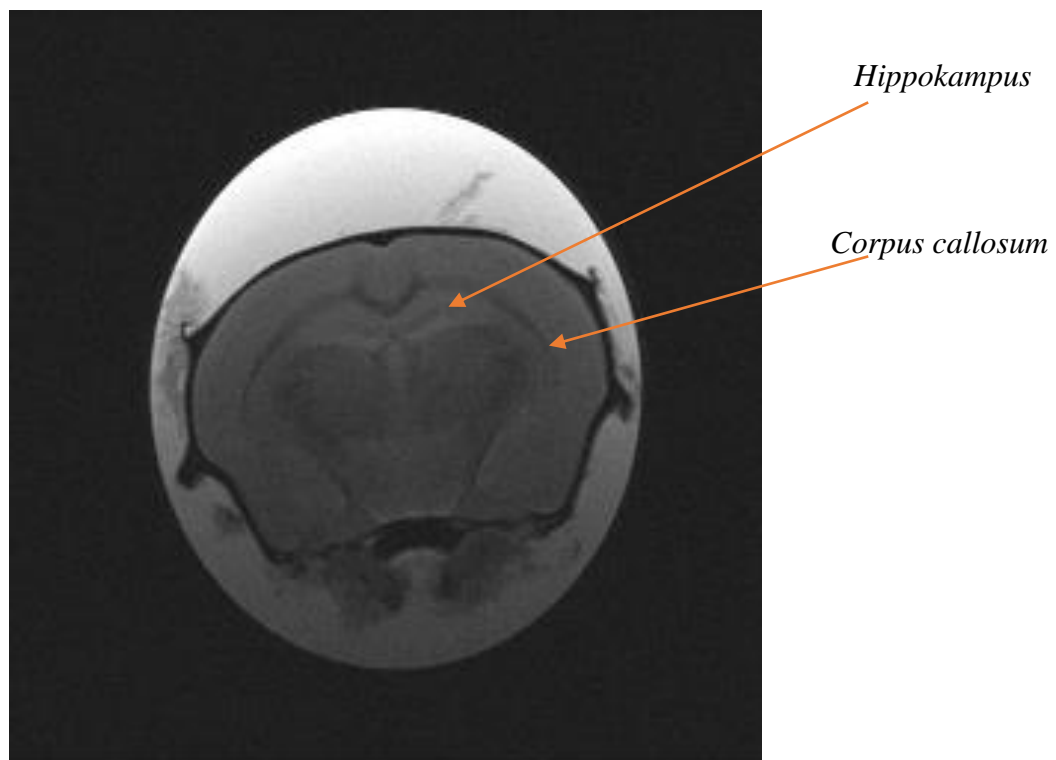
Mozek 2 - perfuzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1620	454	1665	384
13. 5. 2015	1653	257	1683	183

Tabulka 19 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro sedmý mozek, imerzní fixace.

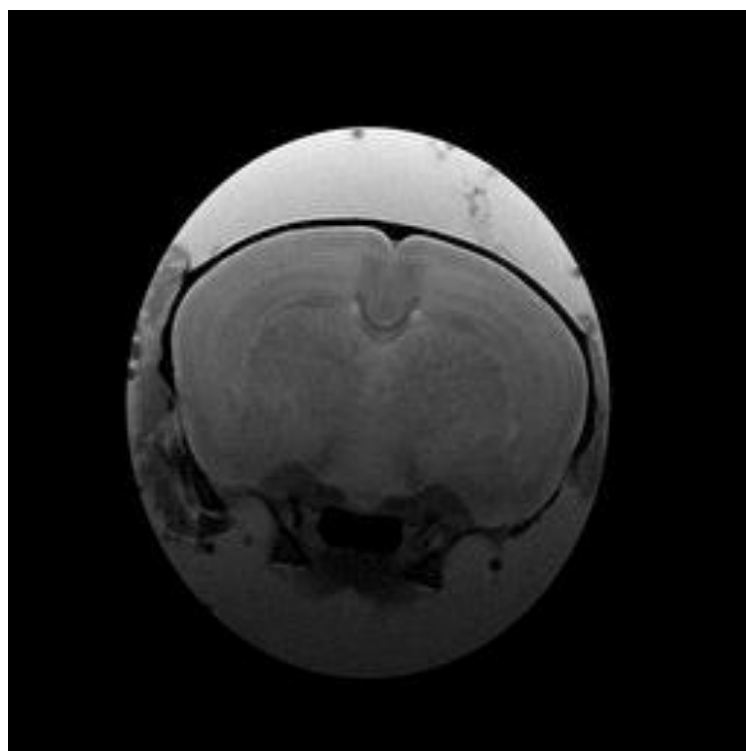
Mozek 7 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1652	336	1592	456
13. 5. 2015	1746	230	1746	257

5.4.2. Zhodnocení naměřených dat - fixátor genipin

Celkem byly provedeny dvě série měření na devíti mozcích. Vzhledem k této skutečnosti se nedá vybrat žádný relevantní statistický test, který by mohl prokázat, zda má fixátor genipin nějaký vliv na relaxační čas T_1 ve zkoumaných mozcích. Obrázek 36 a Obrázek 37 z první a druhé série měření porovnáme tedy jen vizuálně.



Obrázek 36 - Anatomická struktura páteho myšího mozku v první sérii měření, imerzní metoda fixace (30. 4. 2015).



Obrázek 37 - Anatomická struktura páteho myšího mozku ve druhé sérii měření, imerzní metoda fixace (13. 5. 2015).

Na prvním Obrázek 36 jsou jasně patrné anatomické struktury, ve kterých jsme měřili relaxační čas T_1 (pravý a levý *hippokampus* a *corpus callosum*). Na Obrázek 37 je pak tentýž mozek s odstupem třinácti dnů. Vizually se dá zhodnotit, že oba mozky vypadají odlišně. Myší mozek na prvním obrázku (Obrázek 36) vypadá obdobně jak předešlé mozky, které byly fixovány paraformaldehydem (pro příklad Obrázek 28). Pátý mozek ve druhé sérii měření pak nemá dobře patrné anatomické struktury. *Corpus callosum* je téměř nedohledatelné, tudíž i oblast *hippokampů*, která leží pod *corpus callosum* je velmi špatně dohledatelná. Měření relaxačního času T_1 tedy probíhalo v oblastech, ve kterých byl předpoklad, že se nachází *hippokampus*.

Hodnoty relaxačních časů se ve druhé sérii měření zvětšily ve všech mozcích (viz Příloha 2). Na první pohled je patrné, že obraz má hodně světlý charakter - vyšší intenzita signálu ve všech okresech mozku. Buďto dochází k autolytickým procesům, čemuž má fixace zabránit a tedy byla provedena špatná fixace (což naznačuje Obrázek 37 - nemožnost najít anatomické struktury) nebo samotný genipin reaguje nepříznivě s mozkovou tkání a sám podporuje autolytické procesy.

Jak je vidět na obrázku (Obrázek 38), tak část mozku opustila *cranium*. To mohlo být způsobeno absorpcí vody z roztoku či špatnou fixací. Objem mozkové hmoty se díky tomu mohl zvětšit a opustit *cranium*.



Obrázek 38 – Myší *cranium* po třináctidenní fixaci genipinem.

Z naměřených dat i z vizuálního pohledu na obrázky (Obrázek 37 a Obrázek 38) je patrné, že fixátor genipin nedokonale fixoval myší mozek.

5.4.3. Možné příčiny špatné fixace

Jedna z možných příčin nepovedené fixace je nedodržení teploty pro fixaci. Fixace probíhala za pokojové teploty, ale v článku [11], kde fixovali prasečí perikardiy genipinem byla teplota pro fixaci stanovena na 37°C po dobu tří dnů. Další možnou příčinou špatné fixace může být nízká koncentrace fixačního roztoku, či že genipin špatně fixuje lipidy,

keré jsou v mozku hojně zastoupeny. Bylo by jistě zajímavé vyzkoušet fixovat další myši mozky pomocí genipinu, tentokrát s různými koncentracemi fixačního roztoku a při dodržení teploty 37°C. Po těchto fixacích by s odstupem času mohla provést, vedle měření relaxačního času T_1 , volumetrie (zjišťování objemových změn).

5.5. Programová část

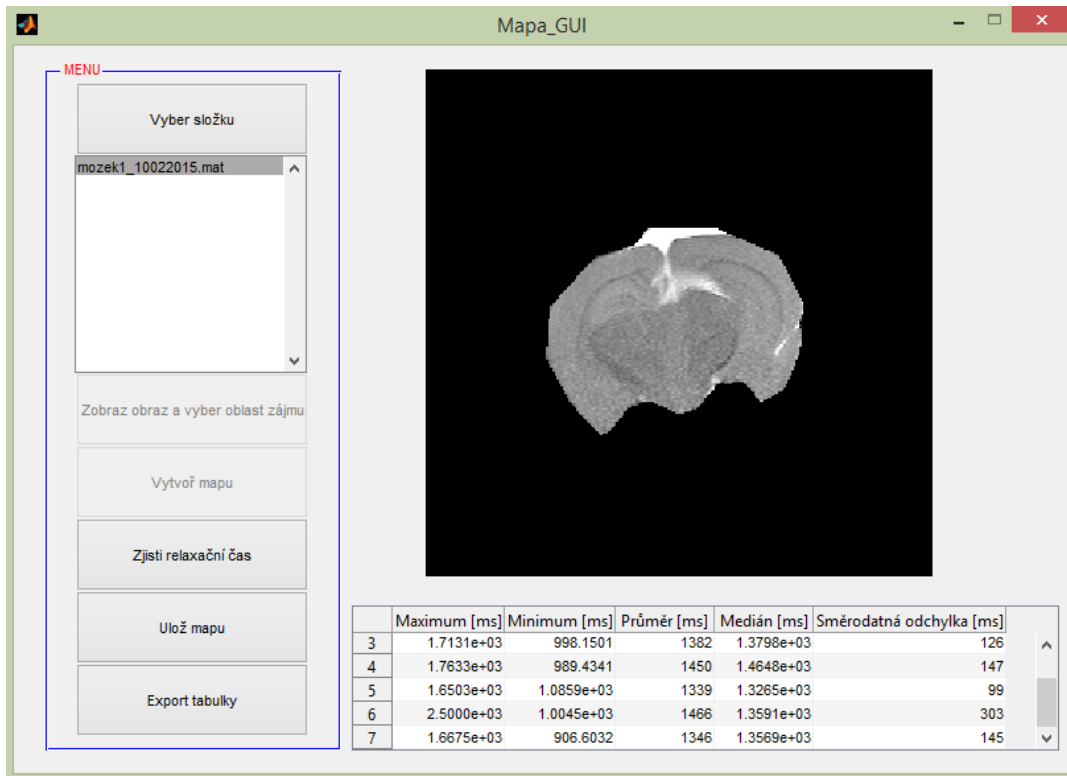
Pro vyhodnocení naměřených dat byl vytvořen program v prostředí Matlab 2013b. Program je obdobou prostředí, ve kterém se vyhodnocovaly časy T_1 v softwaru ParaVision. Hlavním úkolem programu je načíst obrazy ve formátu *mat*, vytvořit mapu relaxačních časů a zjistit ve zvolené oblasti hodnotu relaxačního času. Surová data ve formátu *2dseq*, která byla získána, se převedla pomocí softwaru Aedes 2.11 (<http://aedes.uef.fi>) do formátu *mat*, se kterými se již dá v Matlabu pracovat. Uživatel má k dispozici vytvořené rozhraní, které je pro své jednoduché ovládání přehledné.

5.5.1. Uživatelské prostředí

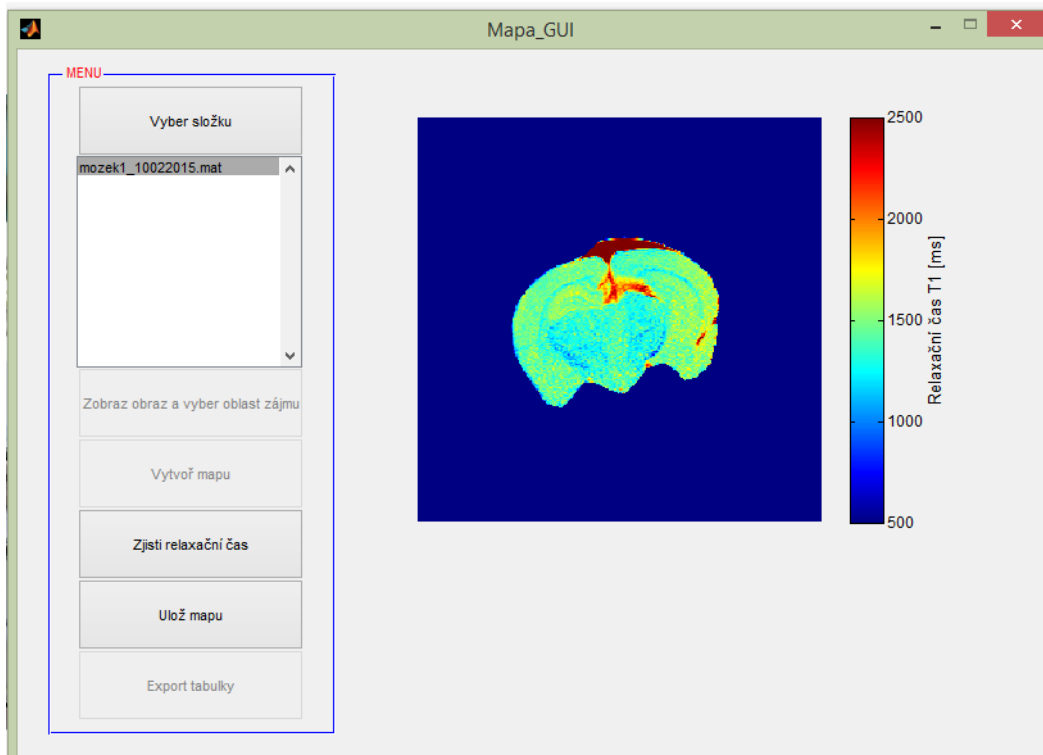
Prostředí, ve kterém se uživatel pohybuje (Obrázek 39), má celkem šest tlačítek. Zprvu je uživateli zpřístupněno jen tlačítko - Vyber složku, které slouží pro výběr složky, ve které jsou uložena data obrazů ve formátu *mat*. Po tom, co uživatel vybere složku s daty, se do posunovacího okénka nahrají jména všech souborů. Po tomto úkonu je zpřístupněno další tlačítko – Zobraz obraz a vyber oblast zájmu. Do uživatelského prostředí se zobrazí obraz mozku, zakáže všechna ostatní tlačítka a uživatel si zvolí oblast, která se bude zpracovávat.

Programově je výběr oblasti zájmu realizován funkcí *roipoly*, která umožňuje tvorbu jakéhokoli polygonu. Dvojklikem ve vytvořené oblasti se zpřístupní tlačítko – Vytvoř mapu. Po stisku tohoto tlačítka se zavolá funkce *Tjednicka.m*, která počítá pixel po pixelu relaxační čas T_1 . Jelikož je výpočet mapy časově náročný, má uživatel možnost sledovat *waitbar*, který dává přehled o tom, kdy bude výpočet hotov. Po výpočtu mapy se zobrazí pseudobarevný obraz (Obrázek 40) v navrženém prostředí.

Tlačítkem – Ulož mapu, se uloží vytvořená mapa ve formátech *mat* a *png* do složky vybrané uživatelem. Tlačítkem – Zjisti relaxační čas, si uživatel navolí oblast (programově opět funkce *roipoly*), ve které bude chtít vypočítat hodnoty relaxačního času T_1 . Po vybrání oblasti se vytvoří tabulka, kde jsou zjištěné hodnoty časů zobrazeny. Ve sloupcích jsou postupně maximální, minimální a průměrná naměřená hodnota, dále pak medián a směrodatná odchylka. Uživatel má možnost si tabulku uložit do Excelu, k čemuž slouží tlačítko – Export tabulky.



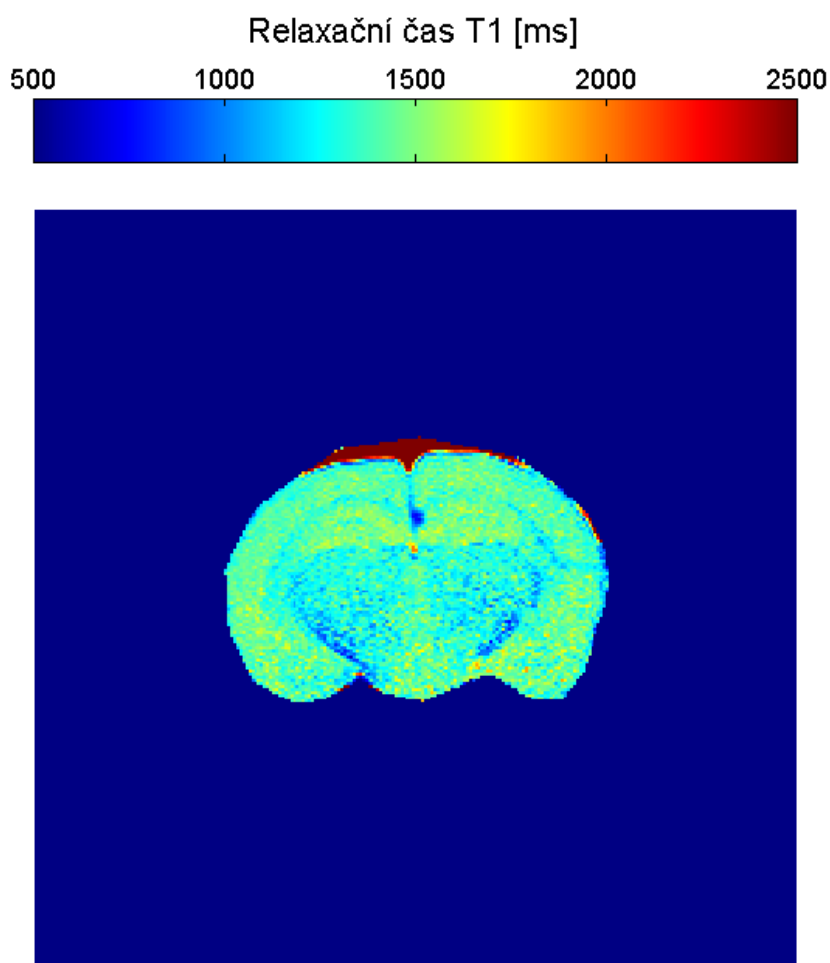
Obrázek 39 – Uživatelské rozhraní programu *Mapa GUI*.



Obrázek 40 – Výsledná mapa relaxačních časů T_1 v uživatelském prostředí.

V obrázku (Obrázek 41) jsou zaznačeny oblasti zájmu, ve který byl měřen relaxační čas T_1 na ÚPT. V oblastech pravého a levého *hippokampu* je o něco větší relaxační čas T_1 než v oblasti *corpus callosum*, což dokládá tentýž obrázek. V oblasti *hippokampu* jsou

hodnoty relaxačního času T_1 , po odečtení z barevné škály, kolem 1500 ms. V oblasti *corpus callosum* je hodnota T_1 přibližně rovna 1300 ms. Je tedy zřejmé, že je rozdíl v relaxačních časech T_1 mezi bílou hmotou mozkovou a šedou hmotou mozkovou. Ovšem tyto hodnoty nic neříkají o tom, že by byl rozdíl v relaxačních časech po fixaci paraformaldehydem, což už bylo zjištěno v kapitole 5.3.2. Hodnoty nám říkají, že v určitých částech mozku jsou různé relaxační časy T_1 . Záleží tedy na složení jednotlivých částí mozku.



Obrázek 41 – Pseudobarevný obraz výsledné mapy s relaxačními časy T_1 (třetí mozek, imerzní fixace, měřeno dne 16. 4. 2015)

5.5.2. Funkce *Tjednicka.m*

Pokud jsou v uživatelském rozhraní nahrány soubory *mat* a uživatel si vybral oblast, ve které se má vypočítat mapa relaxačních časů T_1 , tak může stisknout tlačítko – Vytvoř mapu. Vytvořený program zavolá funkci *Tjednicka.m*, do které vstupují obrazy s různými repetičními časy, ale se stejným TE (obrazy získané z magnetické rezonance). Dalším vstupem je pak binární maska. Tu si uživatel navolil pomocí funkce *roipoly* v uživatelském prostředí. Výstupem funkce je pak vytvořená mapa relaxačních časů T_1 . Hodnotami v obraze je proložena funkce [24]

$$M_z = M_0 \left[1 - \left(1 - \frac{M_I}{M_0} \right) e^{-\frac{TR}{T_1}} \right], \quad 5.1$$

kde M_0 je hustota protonových jader, TR je repetiční čas, M_I je magnetizace na začátku TR.

Funkce *Tjednicka.m* využívá v Matlabu implementovanou matematickou funkci *lsqcurvefit*. Tato funkce používá pro odhad hodnot M_0 a T_1 , v každém pixelu příslušných obrazů, metodu nejmenších čtverců. Hodnoty M_0 a T_1 se počítají jen v polygonu, který uživatel vytvořil v uživatelském rozhraní. Hodnoty relaxačních časů jsou uvedeny v následujících tabulkách. Relaxační časy jsou podobné jak při výpočtu na konzoli na Akademii věd.

Tabulka 20 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pomocí vytvořeného programu, třetí mozek, imerzní metoda fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T_1 [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
08. 12. 2014	1350	166	1333	153
19. 12. 2014	1386	145	1354	187
12. 1. 2015	1388	124	1365	115
26. 1. 2015	1368	170	1359	163
10. 2. 2015	1402	95	1425	93
23. 2. 2015	1367	112	1385	115
10. 3. 2015	1405	118	1399	123
24. 3. 2015	1387	154	1400	141
16. 4. 2015	1358	132	1388	157

Tabulka 21 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pomocí vytvořeného programu, šestý mozek, perfuzní metoda fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T_1 [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
08. 12. 2014	1433	119	1411	123
19. 12. 2014	1374	154	1401	98
12. 1. 2015	1425	112	1389	132
26. 1. 2015	1381	124	1400	111
10. 2. 2015	1396	135	1369	168
23. 2. 2015	1497	124	1399	164
10. 3. 2015	1445	175	1389	145
24. 3. 2015	1398	141	1425	115
16. 4. 2015	1487	139	1452	110

Diskuze

Medián naměřených hodnot relaxačního času T_1 je pro oblast levého *hippokampu* u prvních čtyřech mozků, které byly fixovány imerzní metodou 1163 ms. Medián pro oblast pravého *hippokampu* je 1161 ms. Medián relaxačních časů T_1 pro oblast levého *hippokampu* u mozků fixovaných perfuzní metodou vyšel 1256 ms. Medián pro oblast pravého *hippokampu* je 1248 ms. Je zřejmé, že hodnoty pro imerzní fixaci jsou o něco nižší než hodnoty pro perfuzní fixaci. Je tedy rozdíl v obou metodách fixace, což potvrdily i Mannovy – Whitneyovy U testy, kdy p hodnoty vycházely menší než zvolená hodnota α (Tabulka 13 a Tabulka 14). Při perfuzní metodě fixace se rychleji fixují jak proteiny, tak lipidy protože fixační prostředek nemusí prostupovat celou tkáň, ale už je ve velké míře přítomen uvnitř tkáně. Při fixacích tkání je nejdůležitější rychlost fixace, protože při pomalých fixacích může docházet k autolýze. Z těchto důvodů je lepší zvolit metodu perfuzní fixace, pokud je tato možnost.

Naměřené hodnoty relaxačních časů v příslušných oblastech (*corpus callosum*, levý a pravý *hippokampus*) neměly normální rozložení. Proto se přistoupilo k neparametrickým testům, konkrétně k Friedmanovu testu. Hodnoty p pro Friedmanovy testy prováděné v oblastech *hippokampů* vycházely $p = 0,897$ při perfuzní metodě fixace a $p = 0,941$ při imerzní metodě fixace (Tabulka 10 a Tabulka 11). Z těchto hodnot vyplynulo, že paraformaldehyd nemá vliv na relaxační časy jak v oblastech *hippokampů*, tak v oblasti *corpus callosum*. Hodnoty relaxačního času T_1 mají flukтуаční charakter (Graf 1) a s časem se mění jen náhodně – výsledky Friedmanových testů. Při použití paraformaldehydu se nemění anatomická struktura což je ukázáno na Obrázek 28, kde je zachycen pátý myší mozek v horizontu čtyř měsíců. Friedmanovým testem nebylo zjištěno, že byl rozdíl ve fixaci bíle hmoty mozkové oproti šedé hmotě mozkové (Tabulka 12). Kvalita fixace paraformaldehydem pro bílou a šedou hmotu mozkovou je obdobná a zároveň PFA nemá vliv v těchto oblastech mozku na relaxační čas T_1 . Při příštím podobném pokusu by se ještě mohla provést volumetrie, aby se zjistilo, jestli náhodou není změna ve velikosti mozků.

V případě genipinu nastala jiná situace, kdy ses hodnoty relaxačního času T_1 zvýšily oproti první sérii měření u všech devíti fixovaných myších mozků (Tabulka 38 až Tabulka 46). I anatomické struktury v mozcích byly špatně rozeznatelné až téměř nedohledatelné (Obrázek 37). *Corpus callosum* nebylo rozpoznáno, tak se měřily relaxační časy jen v oblastech, kde by se měly vyskytovat *hippokampy*. Po několika ti denní fixaci genipinem dokonce došlo k tomu, že část mozku opustila *cranium*. Lze tedy předpokládat, že fixace genipinem nebyla účinná. Možnou příčinou špatné fixace mohla být skutečnost, že se nedodržel fixační teplota. Fixace probíhala za pokojové teploty, kdežto v dřívějších studiích [11] probíhala fixace při teplotě 37°C po tři dny. Další možnou příčinou špatné

fixace mohla být skutečnost, že byla příliš nízká koncentrace fixačního činidla. V našem případě byl vytvořen 0,33 % roztok genipinu. Pro příští zkoumání vlivu genipinu by bylo dobré vytvořit vícero roztoků s genipinem o různých koncentracích. Další možností je, že genipin nemá takové fixační schopnosti v případě lipidů, jak v případě bílkovin.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem paraformaldehydu a genipinu na relaxační časy T_1 ve vhodně zvolené tkáni, což byl v našem případě myší mozek. První kapitoly práce byly zaměřeny na teoretický úvod do zobrazování pomocí magnetické rezonance. Stěžejní částí práce byly čtvrtá a pátá kapitola.

Ve čtvrté kapitole jsou rozebrány jak fyzikální metody fixace, tak chemické metody fixace. Podrobněji je rozebrán formaldehyd, respektive paraformaldehyd, což je pevný polymer. Paraformaldehyd je stálící mezi fixačními prostředky a využívá se v řadě laboratoří. Velmi kvalitně dokáže fixovat jak bílkoviny, tak lipidy. Nevýhoda paraformaldehydu spočívá v jeho škodlivosti na lidský organismus. Je pozření, že má karcinogenní účinky. Proto je ve čtvrté kapitole rozebrán přírodní fixační prostředek genipin, který je získáván z gardénie jasmínovité. Pro svou nízkou toxicitu je ideálním kandidátem a možným nástupcem paraformaldehydu. Velmi dobře a rychle fixuje jak lipidy, tak bílkoviny.

Veškerá experimentální činnost se odehrávala na ÚPT AV České republiky. Zde byl připraven roztok 8% paraformaldehydu, který se následně využil k fixaci myších mozků. Konkrétně bylo odebráno osm myších mozků, přičemž čtyři byly fixovány metodou imerzní a další čtyři metodou perfuzní, ta se provádí transkardiálně. Odebrané mozky se před každým snímkováním vkládaly do injekční stříkačky naplněné Fomblinem. Bylo to z toho důvodu, že paraformaldehyd má ve své struktuře velký počet vodíkových atomů a ty nepříznivě ovlivňovaly výsledný obraz mozku. Po vložení jednotlivých mozků do systému BioSpec se prováděly nejprve lokalizační snímky, kvůli správnému umístění. Následovaly anatomické koronární snímky, kde byl vždy vybrán obraz s odpovídajícími anatomickými strukturami. Po nalezení vhodných struktur se provedla sekvence s různými repetičními časy. Pak probíhalo vyhodnocení relaxačních časů na konzoli, kdy se pomocí křivky vybrala oblast *corpus callosum* a oblasti *hippokampů* a v těchto oblastech se vypočítaly relaxační časy T_1 .

Těžiště práce spočívalo ve vyhodnocení vlivu paraformaldehydu na relaxační čas T_1 . Tato problematika je rozebrána v páté kapitole. Proběhla analýza naměřených dat a bylo zjištěno, že naměřené relaxační časy nemají normální rozložení. Proto se ke statistickému zhodnocení využily neparametrické testy. Konkrétně byl využit Mannův – Whitneyův U test a Friedmanův test. Z testů vyplynulo, že paraformaldehyd nemá vliv na relaxační časy T_1 (Tabulka 10 a Tabulka 11).

Genipin byl vybrán jako další fixační prostředek k fixování dalších devíti myších mozků. Ovšem již po pár dnech fixování došlo k tomu, že část myšího mozku opustila

cranium (Obrázek 38). Ani anatomické snímky nebyly příliš povzbudivé (Obrázek 37). Úplně se ztratila oblast *corpus callosum* a i oblast *hippokampů* byla těžce dohledatelná.

Jako vhodnější fixační prostředek se ukázal paraformaldehyd, který neměl vliv na relaxační časy T_1 ve zvolené tkáni. Anatomická struktura po jeho použití zůstala zachována, kdežto u genipinu nikoli. Tímto bylo zadání diplomové práce splněno.

Seznam použité literatury

- [1] BROWN, M. A., SEMELKA, R. C. *MRI: basic principles and applications*. 3rd ed. Hoboken, N. J.: Wiley-Liss, 2003, xiv, 265 p. ISBN 04-714-3310-1.
- [2] SCHILD, H. H. *MRI: made easy*. Germany: Schering, 1990. ISBN 3-921817-41-2.
- [3] DRASTICH, A. *Tomografické zobrazovací systémy*. 1. vyd. Brno: VUT, 2004, 208 s. ISBN 80-214-2788-4.
- [4] GEROTHANASSIS, I. P., A. TROGANIS, V. EXARCHOU a K. BARBAROSSOU. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY: BASIC PRINCIPLES AND PHENOMENA, AND THEIR APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE. *Chemistry Education Research and Practice*. 2002, vol. 3, issue 2. DOI: 10.1039/b2rp90018a. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b2rp90018a>
- [5] Populárně naučný portál: Popular. *Magnetická rezonance (3): A nyní fyzika...* [online]. x [cit. 2015-02-20]. Dostupné z: <http://popular.fbmi.cvut.cz/Stranky/default.aspx>
- [6] NEBESÁŘOVÁ, J. *Elektronová mikroskopie pro biology: Příprava preparátů pro TEM fyzikálními metodami* [online]. 2001 [cit. 2014-12-22]. Dostupné z: <http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>
- [7] ROLLS, G. Leica Biosystems: Histology sample preparation. [online]. Wetzlar, Germany, 2012 [cit. 2014-12-22]. Dostupné z: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/topics/histology-sample-preparation/>
- [8] SOUKUP, A. Botanická mikrotechnika: Preparáty - fixace. PŘF UK. [online]. Praha, 2004 [cit. 2014-12-23]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/index.html>
- [9] PAWLEY, J. B. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3rd ed. New York, NY: Springer, c2006, xxviii, 985 p. ISBN 03-872-5921-X.
- [10] ČECH, S., M. SEDLÁČKOVÁ, D. HORKÝ, L. KREJČÍŘOVÁ a LAUSCHOVÁ. MASARYKOVA UNIVERZITA, LF. *MedAtlas verze 2.1: Přehled chemických fixačních prostředků* [online]. Brno, 2006 [cit. 2014-12-23]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/histol/atlas.htm>
- [11] SUNG, Hsing-Wen, Rong-Nan HUANG, Lynn L. H. HUANG, Chen-Chi TSAI a Chi-Tung CHIU. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, vol. 42, issue 4, s. 560-567. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(19981215)42:4<560::aid-jbm12>3.0.co;2-i.
- [12] SUNG, Hsing-Wen a Jeng-Shiuan SHIH. Biological materials fixed with an epoxy compound: Comparison of the effects with or without ionically bound heparin.

- Journal of Applied Biomaterials*. 1995, vol. 6, issue 3, s. 185-190. DOI: 10.1002/jab.770060307.
- [13] GAGE, Gregory J., Daryl R. KIPKE a William SHAIN. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, issue 65, s. -. DOI: 10.3791/3564. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3564/whole-animal-perfusion-fixation-for-rodents>
- [14] KOLASINSKI, J., C. J. STAGG, S. A. CHANCE, G. C. DELUCA, M. M. ESIRI, E.-H. CHANG, J. A. PALACE, J. A. MCNAB, M. JENKINSON, K. L. MILLER a H. JOHANSEN-BERG. A combined post-mortem magnetic resonance imaging and quantitative histological study of multiple sclerosis pathology. *Brain*. 2012-10-12, vol. 135, issue 10, s. 2938-2951. DOI: 10.1093/brain/aws242. Dostupné z: <http://www.brain.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/brain/aws242>
- [15] HYARE, H., C. POWELL, J. S. THORNTON, H. PARKES, L. MANCINI, T. YOUSRY, S. BRANDNER a P-W. SO. Perfluoropolyethers in Magnetic Resonance Microscopy: *Effect on Quantitative Magnetic Resonance Imaging Measures and Histological Properties of Formalin-Fixed Brain Tissue*. 2008, č. 16. Dostupné z: <http://cds.ismrm.org/ismrm-2008/files/01719.pdf>
- [16] BERNSTEIN, Matt A, Kevin Franklin KING a Ziaohong Joe ZHOU. *Handbook of MRI pulse sequences*. Boston: Academic Press, c2004, xxii,1017 p. ISBN 01-209-2861-2.
- [17] *Genetic control of the mouse cerebellum: Identification of quantitative trait loci modulating size and architecture* [online]. 2000 [cit. 2014-15-12]. Dostupné z: <http://www.nervenet.org/papers/cerebellum2000.html>
- [18] WAGNEROVÁ, D. *Korelace mezi kvantitativními in vivo MR parametry v různých tkáních (MR spektroskopické zobrazování, MR difúzometrie, MR relaxometrie aj.)* [online]. Praha, 2012 [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/86122/?lang=en>. Disertační práce.
- [19] NOVOTNÝ, J. *PŘEHLED VYBRANÝCH PARAMETRICKÝCH A NEPARAMETRICKÝCH TESTŮ VE STATISTICE* [online]. 2011 [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://www.fsps.muni.cz/~novotny/Statistika.htm>
- [20] HARUŠTIAKOVÁ, Danka. *Vícerozměrné statistické metody v biologii*. Vyd. 1. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012, 110 s. ISBN 978-80-7204-791-8.
- [21] LITSCHMANNOVÁ, M. Úvod do statistiky, *VŠB - Technická univerzita Ostrava* [online]. Ostrava, 2011 [cit. 2015-05-02]. Dostupné z: http://mi21.vsb.cz/sites/mi21.vsb.cz/files/unit/uvod_do_statistiky.pdf
- [22] StatSoft. *Jak se pozná normalita pomocí grafů?* [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: http://www.statsoft.cz/file1/PDF/newsletter/2013_10_09_StatSoft_Jak_se_pozna_normalita_pomoci_grafu.pdf

- [23] Free Statistics Lectures. *Friedman Test* [online]. 2012 [cit. 2015-05-02]. Dostupné z:
<http://www.statisticslectures.com>
- [24] KINGSLEY,. Signal intensities and T1 calculations in multiple-echo sequences with imperfect pulses. *Concepts in Magnetic Resonance*. 11(1): 29 - 49. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0534(1999)11:1

Seznam použitých zkratek

NMR	Nuclear magnetic resonance
MRI	Magnetic resonance imaging
RF	Radiofrekvenční
FID	Free Induction Decay – volně indukovaný signál
IR	Inversion Recovery
SR	Saturation Recovery
SE	Spin Echo
GE	Gradientní Echo
TI	Time Inversion
TE	Time Echo
TR	Time Repetition
TD	Time Delay
FOV	Field of View
ROI	Region of interest
RARE	Rapid acquisition with relaxation enhancement
GA	Glutaraldehyd
FA	Formaldehyd
PFA	Paraformaldehyd
PFPE	Perfluorpolyether (Fomblin)
ISA	Image sequence analysis
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
CPMG	Carrova – Purcellova – Meiboomova - Gillova sekvence

Seznam příloh

Příloha 1: Tabulky s naměřenými daty pro fixátor paraformaldehyd.

Příloha 2: Tabulky s naměřenými daty pro fixátor genipin.

Příloha 3: CD s elektronickou verzí diplomové práce a vytvořeným programem.

Příloha 1

Tabulka 22 - Veškerá naměřená data pro první mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda imerzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1266	9	1360	4
19. 12. 2014	1167	257	1132	220
12. 1. 2015	1195	191	1210	150
26. 1. 2015	1195	240	1164	244
10. 2. 2015	1168	259	1208	271
23. 2. 2015	1197	209	1168	253
10. 3. 2015	1182	178	1148	211
24. 3. 2015	1198	204	1189	191
16. 4. 2015	1211	241	1180	240
Průměrná hodnota	1198	199	1195	198

Tabulka 23 - Veškerá naměřená data pro druhý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda imerzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1055	262	1123	269
19. 12. 2014	1138	251	1160	204
12. 1. 2015	1170	258	1261	153
26. 1. 2015	1168	251	1220	252
10. 2. 2015	1260	183	1162	321
23. 2. 2015	1148	265	1223	226
10. 3. 2015	1112	249	1144	266
24. 3. 2015	1201	226	1231	205
16. 4. 2015	1184	211	1154	238
Průměrná hodnota	1160	240	1186	237

Tabulka 24 - Veškerá naměřená data pro třetí mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda imerzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1113	257	1167	208
19. 12. 2014	1135	217	1155	207
12. 1. 2015	1141	258	1185	205
26. 1. 2015	1154	236	1123	265
10. 2. 2015	1196	181	1101	294
23. 2. 2015	1154	216	1145	276
10. 3. 2015	1139	196	1130	234
24. 3. 2015	1147	220	1133	232
16. 4. 2015	1158	207	1100	296
Průměrná hodnota	1149	221	1138	246

Tabulka 25 - Veškerá naměřená data pro čtvrtý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda imerzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1061	243	1059	277
19. 12. 2014	1235	176	1236	203
12. 1. 2015	1183	211	1233	215
26. 1. 2015	1195	185	1126	305
10. 2. 2015	1145	279	1244	166
23. 2. 2015	1137	254	1140	266
10. 3. 2015	1140	186	1143	240
24. 3. 2015	1159	211	1155	264
16. 4. 2015	1120	254	1169	263
Průměrná hodnota	1153	222	1167	244

Tabulka 26 - Veškerá naměřená data pro pátý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda perfuzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1018	245	1122	240
19. 12. 2014	1276	237	1255	321
12. 1. 2015	1251	263	1340	209
26. 1. 2015	1238	328	1243	281
10. 2. 2015	1233	274	1289	290
23. 2. 2015	1294	219	1237	290
10. 3. 2015	1257	222	1205	271
24. 3. 2015	1279	251	1270	283
16. 4. 2015	1240	288	1250	305
Průměrná hodnota	1232	259	1246	277

Tabulka 27 - Veškerá naměřená data pro šestý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda perfuzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1154	202	1057	242
19. 12. 2014	1078	341	1086	320
12. 1. 2015	1254	210	1241	221
26. 1. 2015	1233	301	1330	210
10. 2. 2015	1269	253	1312	231
23. 2. 2015	1274	201	1270	223
10. 3. 2015	1273	206	1231	231
24. 3. 2015	1290	189	1276	236
16. 4. 2015	1237	286	1282	247
Průměrná hodnota	1229	243	1232	240

Tabulka 28 - Veškerá naměřená data pro sedmý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda perfuzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1191	254	1056	235
19. 12. 2014	1156	304	1083	275
12. 1. 2015	1257	255	1315	162
26. 1. 2015	1265	242	1260	199
10. 2. 2015	1274	219	1242	224
23. 2. 2015	1294	180	1246	230
10. 3. 2015	1246	226	1218	212
24. 3. 2015	1300	168	1255	195
16. 4. 2015	1281	260	1255	217
Průměrná hodnota	1252	234	1214	217

Tabulka 29 - Veškerá naměřená data pro osmý mozek (pravý a levý *hippokampus*), metoda perfuzní fixace.

Datum měření	Levý <i>hippokampus</i>		Pravý <i>hippokampus</i>	
	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1029	279	1045	252
19. 12. 2014	1229	283	1127	318
12. 1. 2015	1306	212	1215	299
26. 1. 2015	1251	306	1311	217
10. 2. 2015	1311	227	1293	270
23. 2. 2015	1290	252	1296	236
10. 3. 2015	1268	212	1205	301
24. 3. 2015	1248	276	1243	257
16. 4. 2015	1243	267	1272	237
Průměrná hodnota	1242	257	1223	265

Tabulka 30 - Veškerá naměřená data pro první mozek (*corpus callosum*), metoda imerzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T ₁ [ms]	Směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1303	6
19. 12. 2014	1107	298
12. 1. 2015	1194	300
26. 1. 2015	1139	212
10. 2. 2015	1129	295
23. 2. 2015	1196	153
10. 3. 2015	1132	197
24. 3. 2015	1100	300
16. 4. 2015	1157	229
Průměrná hodnota	1162	221

Tabulka 31 - Veškerá naměřená data pro druhý mozek (*corpus callosum*), metoda imerzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T ₁ [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	909	291
19. 12. 2014	1180	218
12. 1. 2015	1207	109
26. 1. 2015	1216	101
10. 2. 2015	1177	208
23. 2. 2015	1206	119
10. 3. 2015	1173	172
24. 3. 2015	1223	154
16. 4. 2015	1138	258
Průměrná hodnota	1159	181

Tabulka 32 - Veškerá naměřená data pro třetí mozek (*corpus callosum*), metoda imerzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T ₁ [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1171	195
19. 12. 2014	1096	239
12. 1. 2015	1160	124
26. 1. 2015	1180	94
10. 2. 2015	1186	149
23. 2. 2015	1117	199
10. 3. 2015	1062	254
24. 3. 2015	1114	213
16. 4. 2015	1138	160
Průměrná hodnota	1136	181

Tabulka 33 - Veškerá naměřená data pro čtvrtý mozek (*corpus callosum*), metoda imerzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T ₁ [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1201	181
19. 12. 2014	1062	278
12. 1. 2015	1148	252
26. 1. 2015	1156	236
10. 2. 2015	1148	236
23. 2. 2015	1097	276
10. 3. 2015	1032	295
24. 3. 2015	1097	252
16. 4. 2015	1040	299
Průměrná hodnota	1109	256

Tabulka 34 - Veškerá naměřená data pro pátý mozek (*corpus callosum*), metoda perfuzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1004	233
19. 12. 2014	1090	323
12. 1. 2015	1223	267
26. 1. 2015	1186	272
10. 2. 2015	1195	363
23. 2. 2015	1133	366
10. 3. 2015	1075	277
24. 3. 2015	1184	350
16. 4. 2015	1093	364
Průměrná hodnota	1131	312

Tabulka 35 - Veškerá naměřená data pro šestý mozek (*corpus callosum*), metoda perfuzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1060	257
19. 12. 2014	1005	365
12. 1. 2015	1190	206
26. 1. 2015	1229	333
10. 2. 2015	1191	276
23. 2. 2015	1169	317
10. 3. 2015	1067	359
24. 3. 2015	1166	299
16. 4. 2015	1121	215
Průměrná hodnota	1133	292

Tabulka 36 - Veškerá naměřená data pro sedmý mozek (*corpus callosum*), metoda perfuzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1101	229
19. 12. 2014	1069	327
12. 1. 2015	1246	269
26. 1. 2015	1214	257
10. 2. 2015	1168	342
23. 2. 2015	1212	296
10. 3. 2015	1091	322
24. 3. 2015	1198	236
16. 4. 2015	1071	261
Průměrná hodnota	1152	282

Tabulka 37 - Veškerá naměřená data pro osmý mozek (*corpus callosum*), metoda perfuzní fixace.

	<i>corpus callosum</i>	
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms]	směrodatná odchylka [ms]
8. 12. 2014	1035	237
19. 12. 2014	1091	280
12. 1. 2015	1183	221
26. 1. 2015	1210	298
10. 2. 2015	1175	364
23. 2. 2015	1161	329
10. 3. 2015	1135	261
24. 3. 2015	1164	275
16. 4. 2015	1128	232
Průměrná hodnota	1142	277

Příloha 2

Tabulka 38 – Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro první mozek, imerzní fixace.

Mozek 1 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1653	355	1652	358
13. 5. 2015	1650	233	1653	241

Tabulka 39 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro druhý mozek, perfuzní fixace.

Mozek 2 - perfuzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1620	454	1665	384
13. 5. 2015	1653	257	1683	183

Tabulka 40 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro třetí mozek, imerzní fixace.

Mozek 3 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1624	379	1662	328
13. 5. 2015	1635	275	1640	208

Tabulka 41 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro čtvrtý mozek, imerzní fixace.

Mozek 4 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1630	384	1655	362
13. 5. 2015	1713	271	1767	185

Tabulka 42 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro pátý mozek, imerzní fixace.

Mozek 5 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1577	393	1617	388
13. 5. 2015	1660	252	1682	165

Tabulka 43 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro šestý mozek, imerzní fixace.

Mozek 6 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1638	385	1687	328
13. 5. 2015	1741	159	1721	369

Tabulka 44 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro sedmý mozek, imerzní fixace.

Mozek 7 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1652	336	1592	456
13. 5. 2015	1746	230	1746	257

Tabulka 45 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro osmý mozek, imerzní fixace.

Mozek 8 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1607	392	1615	379
13. 5. 2015	1635	268	1653	196

Tabulka 46 - Naměřené hodnoty relaxačního času T_1 pro devátý mozek, imerzní fixace.

Mozek 9 - imerzní fixace				
Datum měření	Relaxační čas T_1 [ms] - levý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]	Relaxační čas T_1 [ms] - pravý <i>hippokampus</i>	Směrodatná odchylka [ms]
30. 4. 2015	1645	350	1541	426
13. 5. 2015	1679	338	1729	172