



Primerjava distribucije injektata zmesi jodiksana in metilenskega modrila med fiksiranim in sveže odmrznjenim piščančjim mišičnim tkivom

RAZISKOVALNA NALOGA

Zunanji mentor:
doc. dr. Nejc UMEK, dr. med.

Šolski mentor:
doc. dr. Miha SLAPNIČAR, prof. kem. in biol.

Avtorici:
Eva Deleja AMBROŽIČ
Laura OSREČKI

Ljubljana, april 2024

POVZETEK

Barvilo je sredstvo za barvanje, ki so ga do srede 19. stoletja izdelovali iz naravnih snovi. Poznamo fizikalne in kemijske barve. Človeško oko je čutilo, ki nam omogoča zaznavanje elektromagnetnega valovanja oziroma svetlobe od 390 nanometrov do 750 nanometrov. Barvila so v histologiji ključna za raziskovanje strukture tkiv in organov ter diagnosticiranje v medicinski praksi. V naši raziskovalni nalogi smo uporabljali kontrastni barvili jodiksanol in metilensko modrilo.

Obe barvili sta akutno toksični, ampak sta si po zgradbi različni. Kot primer je molekulska masa, jodiksanol ima 1550,2 g/mol, metilensko modrilo pa 319,5 g/mol.

Glavni lastnosti mišic sta krčenje (kontrakcija) in sproščanje (relaksacija). Mišice pa se delijo v tri tipe mišičnih tkiv: prečno progasto, gladko in srčno. To je razlog za razlike v njihovi funkciji, vlogi in delovanju. Poznamo tudi različne tipe mišičnega krčenja: izotonično, koncentrično in ekscentrično.

Pri ustvarjanju energije za delovanje mišič ima bistveno vlogo kreatin. Poznamo več mehanizmov, ki potekajo v mišicah in so poglavitni za zagotavljanje energije za mišično delo, to so fosfagenski mehanizem, glikoliza, mlečnokislinsko vrenje in celično dihanje.

Difuzija in konvekcija sta procesa za prehajanje toplote in snovi skozi tkiva na podlagi koncentracije dveh snovi.

Absorpcijske pasove v opazovanem območju kažejo solvatokromna barvila.

Medicinsko slikanje je sestavni del postopkov za odkrivanje, diagnosticiranje in spremljanje zdravljenja različnih zdravstvenih stanj na neinvaziven način, kot sta CT in MR slikanje.

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, kako se zmes injektata metilenskega modrila in jodiksanela distribuira skozi fiksirano in sveže odmrznjeno piščančje tkivo.

Raziskovalna naloga je vključevala pripravo in injiciranje injektata v prsa. Piščančja prsa smo slikali s pomočjo računalniške tomografije. Piščančja prsa smo razrezali in z geotrikotnikom izmerili debelino, višino in dolžino distribucije injektata. V aplikaciji Radiant, ki je prosto dostopna vsem in omogoča proučevanje CT slik, smo piščančjim prsom izmerili debelino, višino in dolžino distribucije injektata. Nato smo izmerili še ploščino in volumen.

Rezultati so pokazali, da je širjenje injektata v eni od smeri prečno na mišico večje v sveže odmrznjeni mišici kot v fiksiranam mišičnem tkivu. Poleg tega je indeks elipsičnosti večji od ena, kar pomeni, da je širjenje injektata anizotropno.

Ključne besede: metilensko modrilo, jodiksanol, mišično tkivo, difundiranje, piščančja prsa

ABSTRACT

Dye is a coloring agent produced from natural substances until the mid-19th century. We distinguish between physical and chemical dyes. The human eye is a sensory organ that enables us to perceive electromagnetic radiation or light from 390 nanometers to 750 nanometers. Dyes are crucial in histology for exploring the structure of tissues and organs and diagnosing medical conditions in practice.

In our research project, we used Iodixanol and methylene blue contrast dyes. Both dyes are acutely toxic, but they differ in structure. For example, the molecular mass of iodixanol is 1550.2 g/mol, while methylene blue is 319.5 g/mol.

The main properties of muscles are contraction and relaxation. Muscles are divided into three types of muscle tissue: skeletal, smooth, and cardiac, which explains the differences in their function, role, and operation. We also recognize types of muscle contraction: isotonic, concentric, and eccentric.

Creatine plays a crucial role in providing energy for muscle functioning. There are several mechanisms in muscles essential for providing energy for muscle functioning: the phosphagen system, glycolysis, lactic acid fermentation, and cellular respiration.

Diffusion and convection are processes for transferring heat and substances through tissues based on the concentration of two substances. Solvatochromic dyes exhibit absorption bands in the observed range. Medical imaging is an integral part of procedures used for detecting, diagnosing, and monitoring the treatment of various health conditions in a non-invasive manner, such as CT and MRI imaging.

The purpose of the research project was to determine how the mixture of methylene blue and Iodixanol injectate is being distributed through fixed and freshly thawed chicken tissue. The research project involved preparing and injecting the injectate into the chicken chest. We used computer tomography to scan the chicken breasts. Afterward, we sliced the chicken breasts and measured the thickness, height, and length of the injectate distribution using a caliper. Using the Radiant application, which is freely accessible to everyone and allows for examining CT images, we measured the thickness, height, and length of injectate distribution in the chicken breasts. We also measured the area and volume.

The results show that the spread of the injection in one direction, transversal to the muscle, is greater in freshly thawed muscle compared to fixed muscle tissue. Additionally, the ellipticity index is greater than one, indicating an anisotropic spread of the injection.

Keywords: Metylene Blue, iodixanol, muscle tissue, diffusion, chicken breast

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	2
1 RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE	1
2 KONTRASTNA SREDSTVA	2
2.1 Barvila	2
2.2 Zaznavanje barve s človeškim očesom	4
2.3 Uporaba barvil v medicini – histologiji.....	5
3 JODIKSANOL	6
3.1 Zgodovina uporabe jodiksanela.....	6
3.2 Kemijske in fizikalne lastnosti jodiksanela	7
3.3 Sinteza jodiksanela.....	8
3.4 Uporaba	11
3.4.1 TERAPEVTSKA UPORABA	11
3.4.2 ABSORCIJA, PORAZDELITEV IN IZLOČANJE	11
3.5 Alternativne možnosti in primerjava.....	12
4 METILENSKO MODRILO	14
4.1 Zgodovina.....	14
4.2 Kemične in fizikalne lastnosti.....	14
4.3 Sinteza in razgradnja	16
4.4 Reaktivnost metilenskega modrila z drugimi molekulami	17
4.5 Sorodne in nesorodne molekule.....	17
4.6 Uporaba MM	18
5 MIŠIČJE.....	19
5.1 Gladko mišično tkivo	19
5.2 Prečnoprogasto mišično tkivo.....	21
5.3 Skeletna mišica	22
5.4 Povezava med kostmi in mišicami.....	24
5.5 Zgradba prečno progastega mišičnega vlakna in njegovo delovanje.....	26
5.6 Začetek krčenja	28
5.7 Tipi mišičnega krčenja	28
5.8 Vloga skeletnega mišičja pri termoregulaciji	30
5.9 Prenos signala z nevronov na mišična vlakna	31
5.10 Delovanje sarkomere na molekularni ravni.....	32
5.11 Energija za mišično delo	33

5.12 Mehanizmi	34
5.12.1 FOSFAGENSKI MEHANIZEM	34
5.12.2 GLIKOLIZA	34
5.12.3 MLEČNOKISLINSKO VRENJE	34
5.12.4 CELIČNO DIHANJE	35
5.13 Odziv telesa na povečano telesno aktivnost	36
6 DIFUZIJA IN KONVEKCIJA	37
6.1 Efekti zmrzovanja in odmrzovanja tkiv	38
6.2 Zmrzovalni artefakti in shranjevanje	39
6.3 Formalin	40
6.4 Vpliv pH	41
6.4.1 VPLIV Ph NA SOLVATACIJSKO ENERGIJO MM IN JODIKSANOLA	41
6.4.2 Ph ZUNAJCELIČNE IN ZNOTRAJCELIČNE TEKOČINE PRI ŽIVIH ORGANIZMIH	42
6.5 Anizotropija	43
6.6 CT – Računalniška tomografija	44
7 METODE DELA	47
8 PREDLOGI NADALJNJEGA DELA	60
9 LITERATURA	61
VIRI SLIK	68
ZAHVALA	71

KAZALO SLIK

Slika 1: Pojav disperzije bele svetlobe na optični prizmi	3
Slika 2: 2D struktura jodiksanola	7
Slika 3: Sinteza jodiksanola	10
Slika 4: Struktura molekule MM	14
Slika 5: Oksidirana in reducirana oblika MM	15
Slika 6: Sinteza MM	16
Slika 7: Degeneracija MM	17
Slika 8: A: tkivo progaste skeletne mišice, B: tkivo progaste srčne mišice, C: tkivo gladke mišice	19
Slika 9: Celica gladke mišice	20
Slika 10: Sarkoplazemski retikulum	21
Slika 11: Srečna mišica	22
Slika 12: Skeletna mišica	22
Slika 13: Struktura miozina	23

Slika 14: Tipi skeletnih mišičnih vlaken.....	24
Slika 15: Kita povezuje mišico in kost.....	25
Slika 16: Hrustanec in sklep.....	25
Slika 17: Sarkolema, sarkoplazma in miofibrile	26
Slika 18: Aktin in miozin	27
Slika 19: Miofibrile.....	27
Slika 20: A: sarkomere, B: aktin, C: miozin, D: miozinska molekula.....	28
Slika 21: Odnos med silo in hitrostjo krčenja mišice	29
Slika 22: Prikaz koncentrične, izometrične in ekscentrične mišične kontrakcije.....	29
Slika 23: Nepremičen predmet in izometrična mišična kontrakcija	30
Slika 24: Motorična ploščica	31
Slika 25: Zgradba sarkomere.....	32
Slika 26: Strukturna formula kreatina.....	33
Slika 27: Glikoliza in vrenje.....	35
Slika 28: 3D struktura formalina	40
Slika 29: Kristalna oblika formalina	40
Slika 30: a) Mape frakcijske anizotropije v človeških možganih. b)prevladujoča usmerjenost difuzijskega tenzorja v posameznih vokslih c)Primer deterministične traktografije	44
Slika 31: CT naprava.....	45
Slika 32: CBCT slikanje.....	45
Slika 33: Postopek vnosa injektata v formalinsko prso	48
Slika 34: Postopek vnosa injektata v sveže prso	48
Slika 35:Skladiščenje oštevilčenih prsi.....	49
Slika 36: CT slikanje.....	50
Slika 37: Meritve z geotrikotnikom	51
Slika 38: Začetna stran.....	52
Slika 39: 3D MRP okno	53
Slika 40: MIP nastavitev vzporedno s kontrastom	54
Slika 41: Meritev z ravnilom.....	54
Slika 42: Meritev ploščine s funkcijo zaprtega mnogokotnika	55

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Difundiranje injektata skozi prsa v formalinu.....	48
Tabela 2: Difundiranje injektata skozi sveže odmrznjena prsa	49
Tabela 3: Meritve distribucije injektata v prsah v formalinu.....	51
Tabela 4: Ročne meritve svežih prs	52
Tabela 5: CT in ročne meritve svežih prsi	57
Tabela 6: indeks elipsičnosti CT.....	57
Tabela 7: Izračun povprečja in standardni odklon svežih prsi	58
Tabela 8: CT in ročne meritve fiksiranih prs	58
Tabela 9: Izračunan indeks elipsičnosti CT meritev pri fiksiranih prsah	58
Tabela 10: Izračunano povprečje in standardni odklon fiksiranih prsi.....	59

1 RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE

Do sedaj še ni bilo raziskovano, kako se zmes injektata metilenskega modrila in jodiksanela distribuira skozi tkivo fiksiranih in sveže odmrznjenih piščančjih prs. Zato je bil namen raziskovalne naloge ugotoviti, kako injektat prehaja oziroma difundira skozi tkivo piščančjega prsa. Injektat je zmes iz dvanajstih mililitrov 1 % metilenskega modrila, dveh mililitrov 10 % jodiksanela in dvanajstih mililitrov destilirane vode. Injektata je tako 25 mililitrov in je 0,5 %. Raziskovalni problem je razlika pronicanja in razširjanja injektata v sveže odmrznjenih piščančjih prsah in fiksiranih piščančjih prsah. Fiksirana prsa so hranjena 1 mesec v 4 % formalinu. Namen je ugotoviti, kje bolje prehaja skozi tkivo in zakaj. Glede na to naredimo primerjavo distribucije pri sveže odmrznjenih in fiksiranih piščančjih prsah. Poleg tega tudi ugotovitev, zakaj je pri enem prišlo do boljše distribucije. To smo na podlagi teorije, ki je razvita v projektni nalogi izvedli in prišli do rezultatov. Teorija pravi, da sta jodiksanol in metilensko modrilo v pogosti uporabi pri raziskovanju tkiv in diagnosticiranju bolezni. V tak namen še ni bilo narejene raziskovalne naloge, zato smo se odločili to praktično narediti.

V nadaljevanju so predstavljena pomembnejša poglavja za namen raziskovalne naloge.

2 KONTRASTNA SREDSTVA

2.1 Barvila

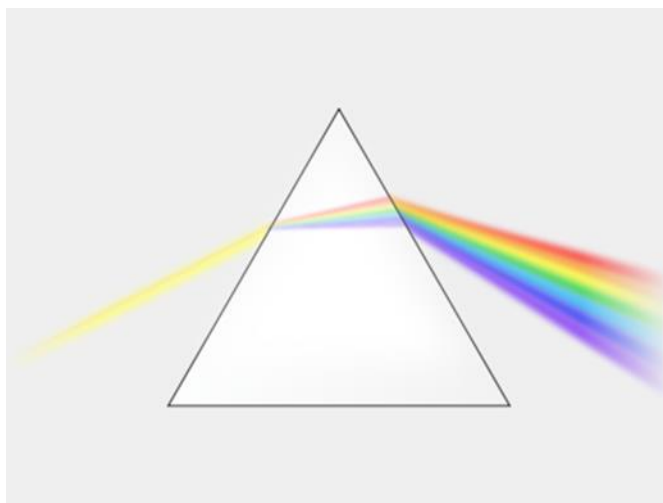
Barvilo je sredstvo za barvanje, ki so ga do srede 19. stoletja izdelovali iz naravnih snovi. Na primer škrlatno iz školjk, rumeno in oranžno iz žafrana, kurkuma, hene, modro iz indiga in oblačja, škrlatno rdečo pa iz posušenih mehiških žuželk coccus.

Umetna barvila so začeli uporabljati proti koncu 19. stoletja. Na primer anilinsko barvilo, ki ga je leta 1865 izdelal anglež William Perkin. Dokler niso odkrili sintetičnih barvil, so uporabljali barvila živalskega in rastlinskega izvora.

Barvilo je topna barvilna snov, ki materijale obarva s kemijsko reakcijo, adsorpcijo ali difuzijo. Difuzija je razširjanje barve, zaradi prostorske nehomogenosti fizikalnih snovi. Barvilo se na podlago trdno veže in se ne izpira.

Pigment je netopni prašek dispergirani v barvilni zmesi. Barva je zaznava določenega dela vidnega spektra svetlobe. Vidni ali optični spekter je del elektromagnetnega spektra, ki ga vidi človeško oko. Barva predmeta, ki jo opazovalec zazna, je odvisna od svetlobnega vira, ki opazovani predmet osvetljuje, lastnosti predmeta, ki vpadno svetlobo odbija ali prepušča, in tudi opazovalca samega. Osvetljenost je skupni vpadajoči svetlobni tok na enoto površine. Odboj je nenadna sprememba smeri valovnega čela na meji dveh različnih sredstev, pri čemer valovno čelo spremeni smer tako, da se vrne v sredstvo iz katerega je vpadla na mejo. Prozornost pa je optična lastnost snovi, ki označuje kako prosojna je snov. Spreminja se glede na valovno dolžino svetlobe. Od te je odvisno kako močno se svetloba prepušča oziroma vpija, absorbira. Barva je torej določena s spektrom svetlobe, ki ga zazna oko opazovalca.

Poznamo tudi fizikalne barve. Fizikalne barve nastanejo zaradi fizikalnih pojavov, kot so disperzija, interferenca in uklon svetlobe. Opazimo jih na primer pri mavrici, na tankih slojih razlite nafte na vodi, na površini milnih mehurčkov, v pavovem perju. Kemijska barva je snov, ki se uporablja za dodajanje barve materialom preko kemijskega procesa. Kemijska barvila se proizvajajo s kemično sintezo v laboratorijskih prostorih ali industrijskih obratih. Veliko jih je zasnovanih, tako da ne bledijo ali se razbarvajo pod izpostavljenostjo svetlobe pranja ali drugih okolijskih dejavnikov. Disperzija ali razklon je v optiki pojav, ki se kaže v tem, da je fazna hitrost valovanja odvisna od frekvence. Nastane ker je lomni količnik odvisen od valovne dolžine svetlobe (frekvence). Najbolj znan pojav, ki nastane zaradi disperzije svetlobe, je mavrica. Pojav je odkril Isaac Newton okoli leta 1672. Najenostavnejši zgled za prikaz disperzije je prehod bele svetlobe preko optične prizme (slika 1).



Slika 1: Pojav disperzije bele svetlobe na optični prizmi

Absorpcija je odvisna od predmeta, katere barvne dolžine absorbira ali odbija. Na primer rdeča barva jabolka absorbira druge barvne komponente svetlobe in odbija rdečo. Interferenca je pojav, ko se dve koherentni valovanji srečata na istem mestu in nastane nov valovni vzorec. Koherentni valovanji sta valovanji, ki imata enako frekvenco in enako polarizacijo (smer nihanja količine, ki valuje). Pri interferenci se skupna amplituda poveča.

Optična interferenca je pojav katerega je težko opazovati, ker ima valovno dolžino med 400 – 700 nanometrov. Uklon svetlobe je fizikalni pojav, ko valovanje naleti na oviro v senco in spremeni smer. Ta pojav je posledica lastnosti valovanja svetlobe. Opisal ga je Christiaan Huygens (nizozemski astronom in matematik). Huygensovo načelo pravi, da vsako točko valovne fronte obravnavamo kot izvor krožnih valov. Ko svetloba prehaja skozi odprtino se valovi razširijo v ogromno smeri. Območje, kjer se valovi prekrivajo tvori vzorec uklona. Uklon je bolj viden, ko je velikost odprtine ali ovire podobna valovni dolžini svetlobe. Če je ovira večja, se uklon zmanjša ali obratno.

Barvilne snovi se delijo glede na:

1. izvor:

- naravna in sintetična.

2. topnost:

- vodotopna barvila: se raztapljajo v vodi;
- netopna ali pigmentna barvila: sledeča se ne topijo v vodi in jih običajno uporabljamo za barve lakov, plastike ...

3. uporabno področje:

- barvila za tekstil;
- barvila za hrano;
- barvila za tiskanje (za ustvarjanje slik na različnih površinah);
- barvila za plastiko;
- barvila za lase ...

4. kemijsko strukturo:

- azobarvila: so sintetična barvila z rumenimi do rdečimi barvnimi odtenki. Njihova funkcionalna skupina je azo skupina. $-N=N-$ so obstojna za barvanje usnja, plastičnih mas in tekstila.
- antrakinonska barvila: imajo dobre kromatografske lastnosti in obstaja več kot 400 različnih odtenkov teh barvil. V vodi so težko topna in imajo koeficient absorpcije približno 10 000 – 25 000, kar je pol manj kot od azobarvil. Zato je moč barvanja v vlakno bistveno slabša od azo barvila.
- triarilmetalna barvila ...

5. način uporabe:

- reaktivna barvila: aromatske spojine, ki tvorijo kovalentno vez med C-atomi barvila in OH skupino druge spojine. So vodotopna.
- Disperzna barvila: rahlo topna v vodi in se uporabljajo za barvanje sintetičnih vlaken. V vodi se razpršijo z delovanjem disperzijskega sredstva. Disperzijsko sredstvo je snov v kateri je druga snov razpršena.
- Pigmentna barvila: uporabljajo se za tiskanje na površino tkanin. Zelo so obstojna.
- Kislinska barvila: je vodotopno barvilo, ki vsebuje kislinsko skupino. Uporabljajo se za barvanje in tiskanje proteinskih vlaken in poliamidnih vlaken. To so večinoma soli natrijevih in sulfonskih kislin.

2.2 Zaznavanje barve s človeškim očesom

Človeško oko je čutilo, ki nam omogoča zaznavanje elektromagnetnega valovanja oziroma svetlobe v območju od 390 nanometrov, kar je še vijolična barva, do 750 nanometrov, kar je v spektru rdeče barve.

Ostra slika predmeta nastane na mrežnici. Očesne mišice morajo prožno očesno lečo ukriviti tako, da usmerijo svetlobo točno na mrežnico. Bližišče je najmanjša razdalja, katero lahko oko prilagodi (od 10 do 15 centimetrov). V očesu zaznavamo barve s pomočjo vidnih čutnic ali fotoreceptorjev tako imenovanih čepnic in paličnic. To so celice, ki pretvarjajo svetlobni signal v živčni impulz. Te dobro zaznavajo svetlobo in razlikujejo svetlo od temnega. V očesu imamo tri vrste čepnic, ki zaznavajo rdečo, druga zeleno in tretja modro barvo.

Notranja zgradba očesa:

1. Šarenica uravnava količino svetlobe, ki vstopi v oko.
2. Zenica je odprtina, ki omogoča prehod svetlobe v oko in obdaja šarenico.
3. Očesna leča se nahaja za šarenico. Prilagaja svojo obliko, tako da oko izostri svetlobe žarkov na mrežnici. To nam omogoča videnje ostre slike (akomodacija).
4. Rumena pega je predel blizu središča mrežnice, kjer se nahaja rumena barva. Rumena barva nastane zaradi vsebnosti luteina. V sredini se nahaja jamnica, ki omogoča visoko ločljiv centralni vid. Omogočata branje, gledanje televizije,...
5. Slepa pega je predel, kjer se nahajajo občutljive celice in preidejo v optični živec. Ta živec na zadnji strani izstopi iz očesnega zrkla.
6. Vidni živec je živec, ki povezuje mrežnico z možgani.

2.3 Uporaba barvil v medicini – histologiji

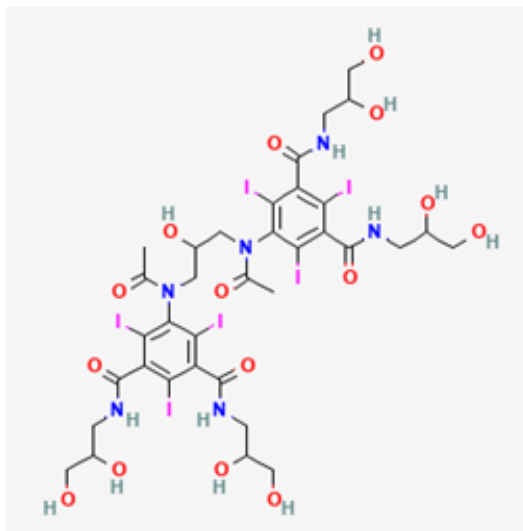
Histologija je veda, ki se ukvarja z preučevanjem mikroskopske strukture tkiv in organov ter njihovih celic. Izvira iz grških besed "histos", kar pomeni tkivo in "logos" kar pomeni študija ali znanost. Preučuje celične strukture, tkiva, organe, razvojno biološke procese, patologijo, barvanje in mikroskopiranje. Barvila so v histologiji ključna za raziskovanje strukture tkiv ter za diagnostične namene v medicinski praksi. To so kemikalije, ki povzročajo obarvanje in boljšo opazovanje pod mikroskopom. Pomagajo razlikovati različne strukture in celice. Razen pigmentov, ki imajo svojo lastno barvo, so vsa druga tkiva pod mikroskopom brezbarvna, zato pri mikroskopskem pregledu nebarvanega tkiva ne ločimo natančno posameznih tkivnih struktur. Z barvanjem razločimo dele tkiva. Barvila imajo izraženo afiniteto do celičnih sestavin, to pomeni, da barvne raztopine pronicajo v celice. Zaradi različnih pH količin, jih delimo v različne skupine: anionska, kationska, metakromatska, nevtralna, indiferentna ter fluorescenčna barvila. Poznamo več metod barvanja.

3 JODIKSANOL

3.1 Zgodovina uporabe jodiksanela

Leta 1890 sta Haschek in Lidenthal uporabila suspenzijo krede in zinoberja, živosrebrne spojine, da bi posode slikala v amputirani roki. Od takrat je bilo na tem področju opravljenih ogromno raziskav, da bi razvili manj strupena in učinkovitejša kontrastna sredstva z večjim zmanjšanjem rentgenskih žarkov. Idealno intravaskularno kontrastno sredstvo je topno v vodi, stabilno, biološko inertno, izotonično za plazmo, selektivno se izloča in je na voljo po razumni ceni. Vodotopna kontrastna sredstva, ki temeljijo na kovalentno vezanem jodu, sta prvič spoznala Binz in Rath v 1920-ih. Jod zlahka oslabi rentgenske žarke, saj je atomski polmer kovalentno vezanih atomov joda 133 pikometrov, kar je v območju rentgenskih valovnih dolžin (10 do 10.000 pikometrov). Kovalentna vezava na stabilno, funkcionalno skupino, kot je benzen, prav tako zmanjša toksičnost prostega jodida. Jodirana kontrastna sredstva so postala najpomembnejša za prakso radiologije in medicine na splošno. Približno 75 milijonov odmerkov jodiranih kontrastnih sredstev se vsako leto daje po vsem svetu in se še naprej povečuje z uporabo diagnostičnih modalitet.

3.2 Kemijske in fizikalne lastnosti jodixanola



Slika 2: 2D struktura jodixanola

Molekulska formula: $C_{35}H_{44}I_6N_6O_{15}$

Sinonimi:

1. Iodixanol;
2. Jodixanol;
3. 1,3-benzenedikarboksamid,
4. 5,5'-((2-hidroksi-1,3-propandiil)bis(acetilimino)bis(N,N'-bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodo-1,3-bis(acetilamino)-N,N'-bis[3,5-bis(2,3-dihidroksipropilaminokarbonil)-2,4,6-trijodofenil]-2-hidroksipropan;
5. 5,5'-[(2-hidroksitrimetilen)bis(acetilimino)bis[N,N'-bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodoizoftalamid];
6. 5,5'-[(2-hidroksi-1,3-propandiil)bis(acetilimino)]bis[N,N'-bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodo-1,3-benzendikarboksamid]

Molska masa: $M = 1548,71$ g/mol

Jodixanol je dimerično, neionsko, vodotopno, radiografsko kontrastno sredstvo, ki se uporablja zlasti v koronarni angiografiji. Ima vlogo radioneprozornega medija. Je neionska hidrofilna spojina, ki se običajno uporablja kot kontrastno sredstvo med koronarno angiografijo, zlasti pri posameznikih z ledvično disfunkcijo, saj naj bi bil manj toksičen za ledvice kot večina drugih intravaskularnih kontrastnih sredstev. Mehanizem delovanja je kot rentgenska kontrastna aktivnost.

Porazdelitveni koeficient: -3.4

Število donatorjev vodikovih vezi: 13
Število akceptorjev vodikovih vezi: 15
Število izotopov: 0
Določeno število atomskih stereocentrov: 0
Kovalentno vezano število enot: 1

Jodiksanol se navadno nahaja v trdnem agregatnem stanju.

Tališče: 240 – 250 °C
Je topen v vodi. Topnost v vodi 0,18 g/L
Gostota: 1.266 g/mL
Viskoznost: 11,1 mPa pri temperaturi 37 °C
pH: 7.2-7.6
Osmolarnost: 290 mOsm/kg H₂O
Vezava na beljakovine: zanemarljiva

Toksičnost, akutni učinki:

Pri molekuli jodiksanela (3724), so pri modelnem organizmu (podgani) s poskusom LD₅₀ znotraj venko injicirali 42757 mg (jodiksanela)/kg podgane.

Učinki: na pljučih, prsnem košu ali dihanju je prišlo do akutnega pljučnega edema, na ledvicah, sečevodu in mehurju je prišlo do spremembe tubulov (vključno z akutno ledvično odpovedjo, akutno tubularno nekrozo), prišlo je tudi do krvavitev.

Pri molekuli jodiksanela (3724), so pri modelnem organizmu (miški) s poskusom LD₅₀ znotraj venko injicirali 30512 mg (jodiksanela)/kg miši.

Učinki: zaspanost (splošna depresivna aktivnost), pri pljučih, prsnem košu in dihanju je prišlo do dispneje, pri ledvicah je prišlo do akutne odpovedi in akutne tubularne nekroze.

Toksičnost za ljudi: Vedno je treba upoštevati možnost reakcije, vključno z resnimi, življenjsko nevarnimi, smrtnimi, anafilaktoidnimi ali kardiovaskularnimi reakcijami. Povečano tveganje je povezano z anamnezo predhodne reakcije na kontrastno sredstvo, znano občutljivostjo na jod in znanimi alergijami (bronhialna astma, alergije na zdravila ali hrano), druge preobčutljivosti in osnovne imunske motnje, avtoimunost ali imunske pomanjkljivosti, ki so nagnjene k specifičnemu ali nespecifični sprostitvi mediatorja. Če se med dajanjem pojavijo znaki alergiji podobne reakcije, je treba injiciranje prekiniti in uvesti ustrezno zdravljenje.

3.3 Sinteza jodiksanela

V postopku priprave jodiksanela z dimerizacijo 5-acetamido-N,N'-bis(2,3-dihidroksipropil)-2,4,6-trijodo-izoftalamida ("spojina A") izboljšanje vključuje obarjanje nereagirane spojine

A po dimerizaciji iz reakcijske zmesi in zajem oborjene nereagirane spojine A za ponovno uporabo.

Postopek zahtevka 1, pri katerem se izvede faza dimerizacije z uporabo epiklorohidrina; 1,3-dikloro-2-hidroksipropan; ali 1,3-dibromo-2-hidroksipropan kot sredstvo za dimerizacijo v topilu, izbranim iz skupine, ki sestoji iz nevodnih topil, vode in mešanic vode ter enega ali več alkoholov.

Postopek trditve 2, pri katerem je sredstvo za dimerizacijo epiklorohidrin, topilo pa 2-metoksietanol ali metanol.

Postopek zahtevka 1, pri katerem se obarjanje spojine A izvede z vodo, po izbiri skupaj z alkoholnim sotopilom.

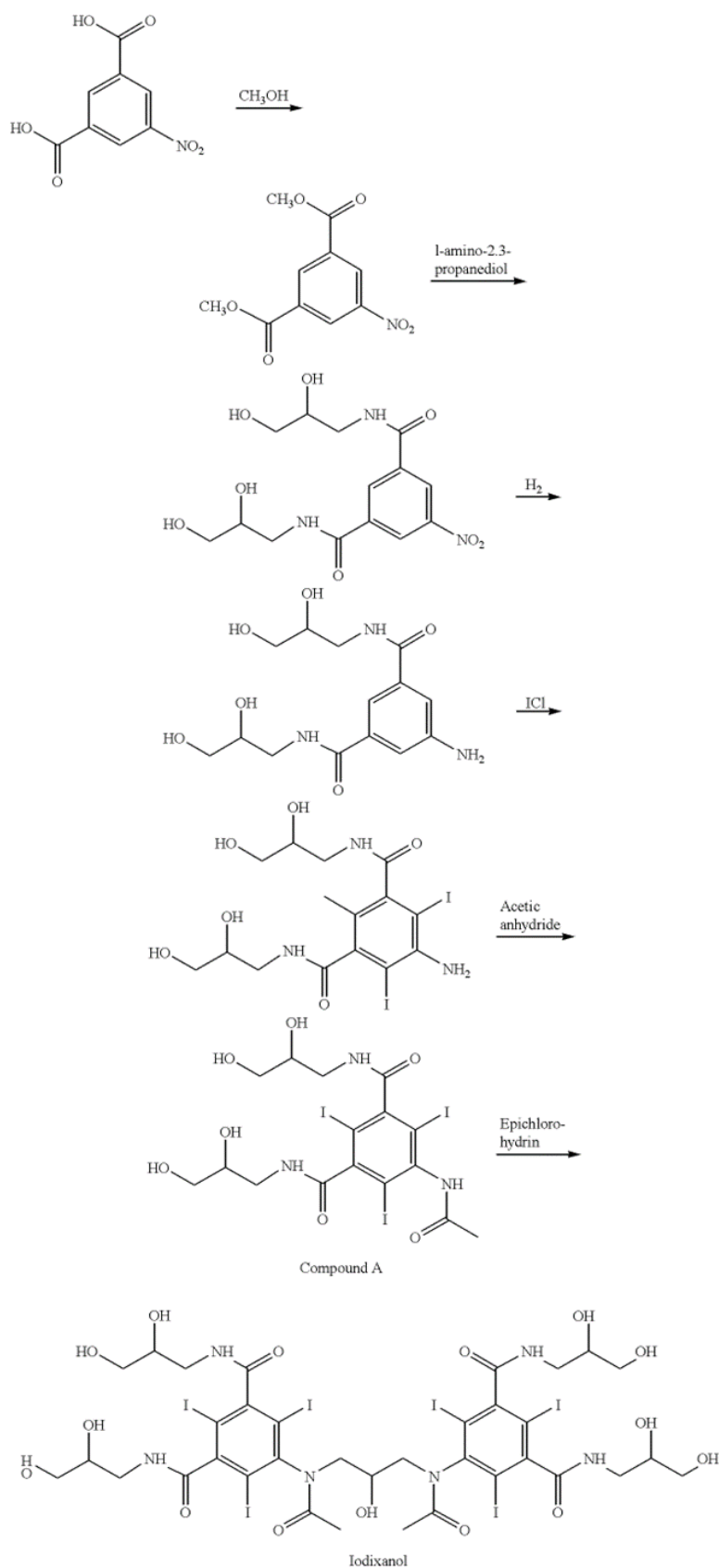
Postopek trditve 4, pri katerem se pH mešanice s kislino prilagodi na 10-11, da povzroči padavine, temperatura pa se po potrebi prilagodi na 15-40 ° C.

Postopek trditve 5, v katerem se doda nadaljnja kislina, da se pH mešanice prilagodi na 2-5.

Postopek zahtevka 1, pri katerem se pridobljena spojina A prekristalizira.

Postopek zahtevka 1, pri katerem se po obarjanju nereagirane spojine A jodiksanol očisti brez uporabe kromatografskih metod.

Postopek zahtevka 1, pri katerem se predelana spojina A ponovno uporabi v nadaljnjem postopku priprave jodiksanela.



Slika 3: Sinteza jodixanola

3.4 Uporaba

3.4.1 TERAPEVTSKA UPORABA

Jodiksanol je kontrastno sredstvo, ki se pogosto uporablja med koronarno angiografijo, zlasti pri posameznikih z ledvično disfunkcijo, saj naj bi bil manj toksičen za ledvice kot večina drugih intravaskularnih kontrastnih sredstev. Je slikovno kontrastno sredstvo z enako osmolalnostjo kot kri (290 mOsm/kg H₂O). Je indiciran za kontrastno izboljšano računalniško tomografijo, slikanje glave in telesa, izločilno urografijo in periferno venografijo. Indiciran je za angiokardiografijo (levo ventrikulografijo in selektivno koronarno arteriografijo), periferno arteriografijo, visceralno arteriografijo in možgansko arteriografijo. Indiciran je tudi za intraarterijsko digitalno odštevalno angiografijo, za kontrastno izboljšano računalniško tomografijo, slikanje glave in telesa ter izločilno urografijo.

Iodixanol 320mgI/ml je priporočljiv za intraarterijsko injiciranje pri radiografskem kontrastnem vrednotenju arterijskih lezij možganov, koronarnih arterij in levega prekata ter za intraarterijsko injiciranje pri radiografskem kontrastnem vrednotenju perifernih arterij. Jodiksanol se priporoča tudi za intraarterijsko digitalno odštevalno angiografijo, neoplastične in neoplastične lezije glave in telesa (intratorakalne, intraabdominalne in retroperitonealne regije), ocene delovanje ledvic in ocene perifernega venskega sistema.

3.4.2 ABSORCIJA, PORAZDELITEV IN IZLOČANJE

Pot izločanja

Pri odraslih se približno 97 % injiciranega odmerka jodiksanela nespremenjenega izloči z urinom v 24 urah, manj kot 2 % pa se izloči z blatom v petih dneh po injiciranju.

Obseg porazdelitve: 0,26

Absorpcija

Absorpcijo in izločanje jodiksanela 320 mg i/ml so raziskovali pri podganah po intragastričnem dajanju 2,5 g i/kg tm. Živali so opazovali do 96 ur po zdravljenju, kri, urin in blato pa so odvzeli v več časovnih točkah med poskusom. Koncentracije jodiksanela v serumu in urinu so merili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo. Fekalne koncentracije jodiksanela, ki temeljijo na meritvah joda, so bile določene z rentgensko fluorescenčna spektrometrija. Na izbranih tkivih so bile pridobljene serijske radiografije in opravljena histopatološka preiskava. Rezultati kažejo, da se manj kot 1% intragastričnega odmerka jodiksanela absorbira iz črevesja v krvni obtok. Neželenih kliničnih znakov niso opazili in histomorfoloških ugotovitev, povezanih z zdravljenjem, ni bilo.

Uporaba v medicini v obliki:

- zdravila
- kontrastnega sredstva
- eksogeni marker za merjenje hitrosti glomerularne filtracije

3.5 Alternativne možnosti in primerjava

JOHEKSOL: Izo-osmolarno kontrastno sredstvo jodiksanol je lahko povezano z manjšo incidenco srčnih dogodkov kot nizkoosmolarno kontrastno sredstvo (LOCM). Metaanaliza kaže, da ni prepričljivih dokazov, da je jodiksanol boljši od LOCM na splošno glede manjšega števila kardiovaskularnih dogodkov.

Molekulska formula: $C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$

Molekulska masa: 821.1 g/mol

Iohexsol je učinkovito neionsko, vodotopno kontrastno sredstvo, ki se uporablja v mielografiji, artrografiji, nefroangiografiji, arteriografiji in drugih radiografskih postopkih. Nizka sistemska toksičnost je kombinirana posledica nizke kemotoksičnosti in nizke osmolarnosti.

JOPROMID: V prejšnjih študijah so proučevali vpliv dveh ICM (jodiksanela proti jopromidu) na žilni sistem, razvoj zastoja krvi, spremembe ledvičnega uporovnega indeksa (RRI) in žilnih premerov ter post mortem porazdelitev joda kot markerja za ICM v izsajenih ledvicah. Način uporabe ICM v nadledvični aorti je sledil režimu intervencijske kardiologije, tako da je bilo 10 bolusnih injekcij danih v enakomernih intervalih (iopromid 4,32 ml / jodiksanol 5 ml), skupaj z infuzijo 500 ml izotoničnega NaCl - raztopine. In tej študiji je post-mortem rentgenska analiza pokazala, da po uporabi obeh ICM ni razlik v vsebnosti joda v regijah srednje skorje in medullo-medeničnega prehodnega območja ledvic. Izjemne razlike pa so bile ugotovljene v predelu kapsule blizu skorje, kjer je uporaba jopromida povzročila bistveno nižjo vsebnost joda v mikrocirkulaciji. To je v dobrem soglasju s prejšnjimi študijami, v katerih je bila ugotovljena nepravilna porazdelitev na tem področju, verjetno zaradi zmanjšanja arteriolarnega dotoka zaradi zastoja.

Molekulska formula: $C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$

Molekulska masa: 791.1 g/mol

Kontrastna sredstva, ki se uporabljajo v medicini, na splošno spadajo v dve skupini:

1. Kontrastna sredstva na osnovi joda:

- Jonska kontrastna sredstva: vsebujejo nabite delce in je večja verjetnost, da bodo pri nekaterih bolnikih povzročila neželene reakcije, kot so alergijski odzivi ali težave z ledvicami.
- Ne-jonska kontrastna sredstva: nimajo naboja in veljajo za varnejša od jonskih sredstev, z zmanjšanim tveganjem neželenih učinkov.

-

2. Kontrastna sredstva na osnovi gadolinija (GBCA):

- Linearni GBCA: Ti imajo linearno strukturo in so bili pogosteje uporabljeni, vendar so povezani z večjim tveganjem za nekatere stranske učinke, zlasti pri bolnikih z okvarjenim delovanjem ledvic.
- Makrociklični GBCA: imajo stabilnejšo strukturo, kar zmanjšuje tveganje neželenih učinkov, zlasti nefrogene sistemske fibroze (NSF), zaradi česar so bolj priljubljeni pri bolnikih z večjim tveganjem.

Vsaka vrsta ima svoje prednosti in slabosti, izbira pa je pogosto odvisna od dejavnikov, kot so specifični medicinski postopek, zdravje bolnika in morebitna tveganja neželenih učinkov.

4 METILENSKO MODRILO

4.1 Zgodovina

Metilensko barvilo je prvi pripravil nemški kemik Heinrich Caro leta 1879. Določil ga je kot anilinsko barvilo, pridobljeno za barvanje tekstila. V zgodovino pa se je zapisalo kot histološko barvilo, biokemični reagent in zelo pomembno sintetično zdravilo v medicini (Cwalinski idr., 2020). Barvno aktivnost metilenskega modrila je razvil Paul Ehrlich leta 1891, s čimer je postavil temelje za kemoterapijo. Od konca 19. in do začetka 20. stoletja so ga uporabljali za zdravljenje malarije pri ljudeh, ampak ker je povzročal hude stranske učinke, kot sta zelena barva urina in modra beločnica, so to prekinili. Ampak zanimanje za MM ni popustilo, saj je bil zelo poceni. Konec 20. stoletja se je modrilo začelo uporabljati kot protistrup pri zastrupitvi s cianidom. Preizkušali so njegovo delovanje tudi proti mnogo drugim strupom, pri čemer so ugotovili, da pozdravi metemoglobinemijo in ugodno učinkuje tudi pri drugih zastrupitvah ter da pomaga pri septičnem šoku in anafilaktičnem šoku (Wainwright in Crossley, 2013).

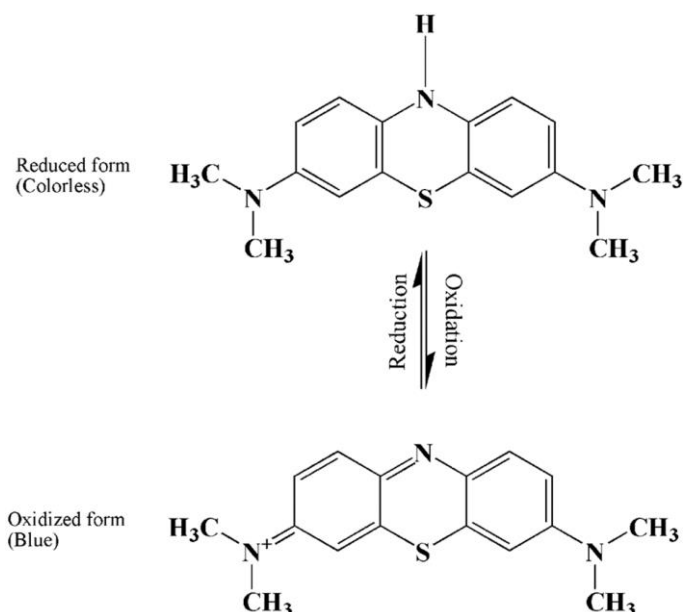
4.2 Kemične in fizikalne lastnosti

Metilensko modrilo (MM) je aromatsko heterociklično bazično barvilo z molekulsko formulo $C_{16}H_{18}ClN_3S$. Spada v skupino polimetinskih barvil. So skupina organskih spojin, ki imajo več metilnih skupin. Ima antioksidativne, antimalarične, antidepresivne in kardioprotektivne lastnosti.



Slika 4: Struktura molekule MM

Je jedko k in akutno strupno. Pri sobni temperaturi je trden temno zelen prah, ko se zmeša z vodo pomodri. Topno je v vodi, metanolu, propan-2-olu, etanolu, glicerolu, acetonu in v etil acetatu. Njegova topnost v vodi je 43,6 g/L pri 25 °C. Molska masa MM je 319,9 g/mol. Tvori lahko 4 vodikove vezi. Tališče je med 100–110 °C. MM ima modro barvo v oksidiranem stanju in je brezbarven v reducirani obliki, kot kaže slika 5.



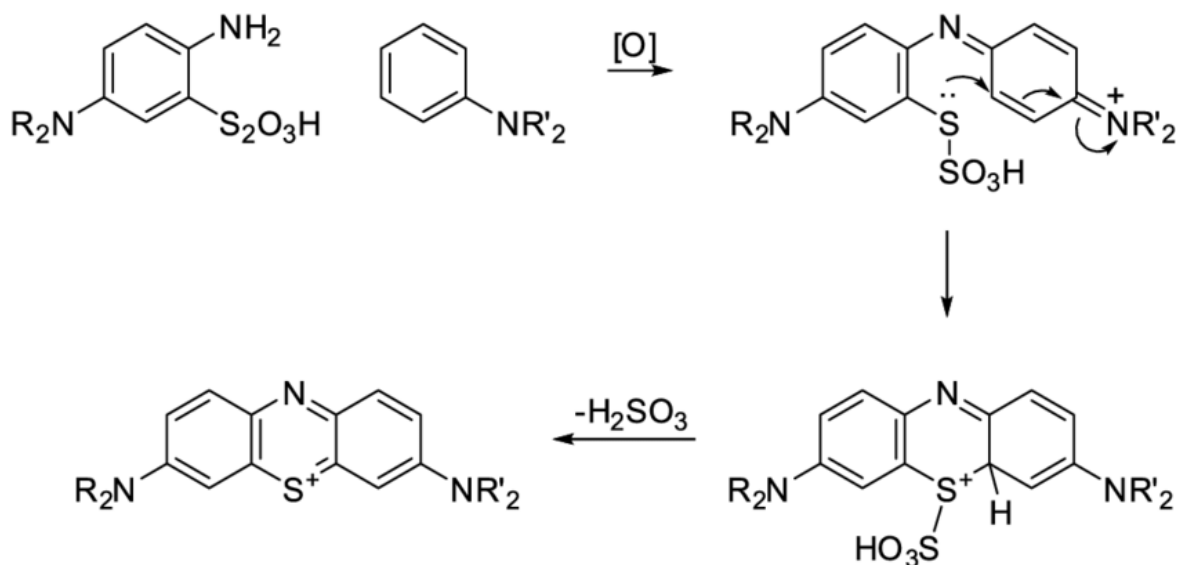
Slika 5: Oksidirana in reducirana oblika MM

Barva MM je odvisna od kromoforne skupne. Kromoforna skupina je N-S vez na osrednjem aromatskem heterociklu. Avksokromna skupina N z osamljenimi pari elektronov na benzenovem obroču. Ta pa prispeva k celotni strukturi molekule. MM je pozitivno nabita molekula.

MB je toksično, rakotvorno in nerazgradljivo v naravi. Človeku povzroča dihalne stiske, trebušne motnje, duševne motnje, motnje vida in slepoto, slabost, drisko, bruhanje, povečan srčni utrip, v stiku s kožo povzroči rdečino in srbečico. V vodi v zelo nizkih koncentracijah povzroči obarvanje vode. Ima visok molski absorpcijski koeficient, ki zniža prepustnost sončne svetlobe, zniža topnost kisika in negativno učinkuje na vodne organizme. Pri segrevanju MM, dokler se ne razgradi, oddaja zelo strupene hlape (dušikove okside, žveplove okside in kloride). Rezultati različnih raziskav so potrdili, da MM v nizkih odmerkih spodbuja delovanje možganov, saj izboljša spomin in zmožnost učenja, ter ugodno deluje proti občutkom strahu (Khan idr., 2022).

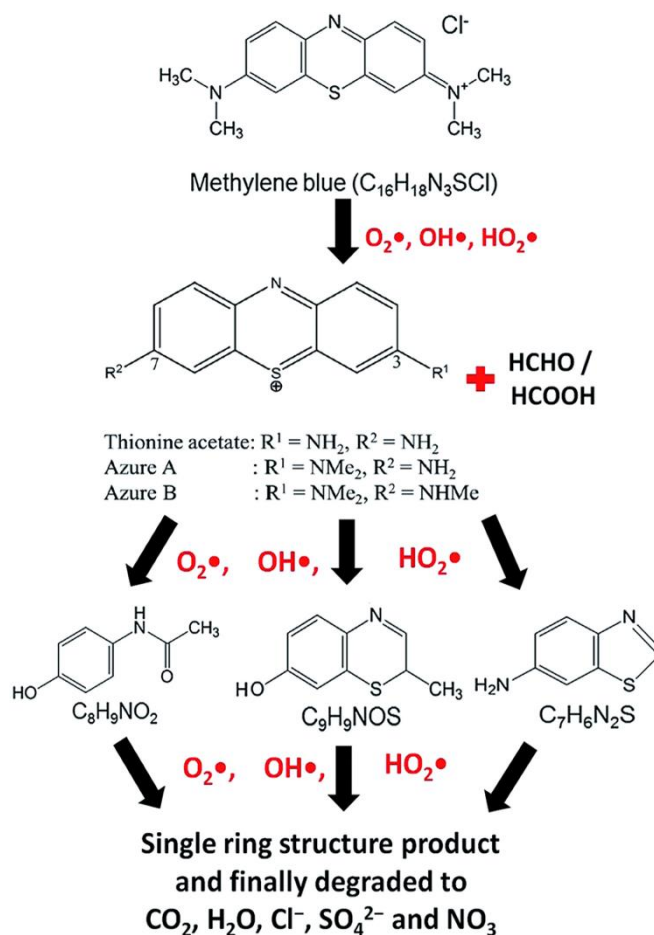
4.3 Sinteza in razgradnja

Prvi korak pri sintezi MM je oksidacija 4-aminodimetilanilina s katalizatorjem natrijevim trisulfatom. Oksidacija je kemijska reakcija pri kateri se določena snov spoji s kisikom in se oksidira. 4-aminodimetilanilin dobimo z aminacijo dimetilanilina s formaldehidom in amoniakom. Aminacija je uvajanje amino skupine v molekulo. Z oksidacijo dobimo trisulfonsko kislino. V drugem koraku navedena kislina reagira z dimetilanilinom v prisotnosti natrijevega dikromata. Dimetilanilin je sestavljen iz fenilne skupine in in dimetilamino skupine. Nastane vmesna spojina, ki se oksidira v indamin (benzenov obroč, na katerem je amino skupina in indium). Še zadnji korak je ciklizacija, pri kateri se tvori tiazin. To je benzenov obroč z žveplom in dušikom. Tiazinski obroč je značilen za metilensko modrilo. Pri oksidaciji uporabljamo H_2S in $FeCl_3$. Shema sinteze je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Sinteza MM

V vodi se MM razgradi v ogljikov dioksid; njegova atoma dušik in žveplo se pretvorita v anorganske ione nitrata ter amonijeve in sulfatne ione. Pri razgradnji sodelujejo reaktivni radikali, kot so $-OH$ in $-HO_2$. Ti razgradijo $N-CH_3$ vez in pozneje še $-CH_3$ oksidira v $-HCOOH$ in $-HCHO$. Te reakcije potekajo, dokler se MM popolnoma ne razgradi v manjše anorganske molekule. Ta razgradnja poteka med fotodegradacijo pod UV-spektrom. Stranski produkti procesa so spojine Azure A, Azure B in Azure C. Postopek je prikazan na sliki 4 (Khan idr., 2022).



Slika 7: Degeneracija MM

4.4 Reaktivnost metilenskega modrila z drugimi molekulami

MM lahko reagira z veliko molekulami, saj ima raznolike kemijske lastnosti. Reaktivnost je odvisna od pogojev reakcije in prisotnosti drugih spojin. Reagira z negativno nabitimi komponentami, kot so aminokisliline (se obarva). Inhibira aktivacijo nitroglicerina, natrijevega nitrita in amilnitrita, te povzročajo relaksacijo gladkih mišic. Zavira aktivacijo topne gvanilat ciklaze (encim, ki katalizira pretvorbo GTP-ja). Ublaži zastupitev s cianidom, ker reagira z cianidnim ionom. Reducira metemoglobin in zniža njegovo raven v krvi. Ima oksidacijske lastnosti in je reaktiven. Lahko prenaša elektrone na druge molekule in deluje kot reducent (PuChem).

4.5 Sorodne in nesorodne molekule

Azure A je en od derivatov MM. Je organska kloridna sol. Uporablja se pri izdelavi barvil za barvanje krvnih razmazov. Azure B je podoben Azuru A, samo da ima tudi vlogo histološkega barvila, fluorokroma, inhibitorja določenih reakcij in antidepresiva. Metilen

zelen je tudi organska kloridna sol in je protibarvilo rdečim in vijoličnim barvilom. Je tako kot ostali histološko barvilo. Tlonium klorid je organska kloridna sol, ki celice obarva modro. Uporablja se ga v metakromatskih in ortokromatskih tehnikah. Ima vlogo fluorokroma, histološkega barvila in diagnostičnega sredstva. Eosin YS je organska natrijeva sol in organsko bromirano spojino. Je histološko barvilo in fluorokrom. Uporablja se ga tudi v kozmetiki, farmacevtski industriji in v gojiščih. Obarva rdeče.

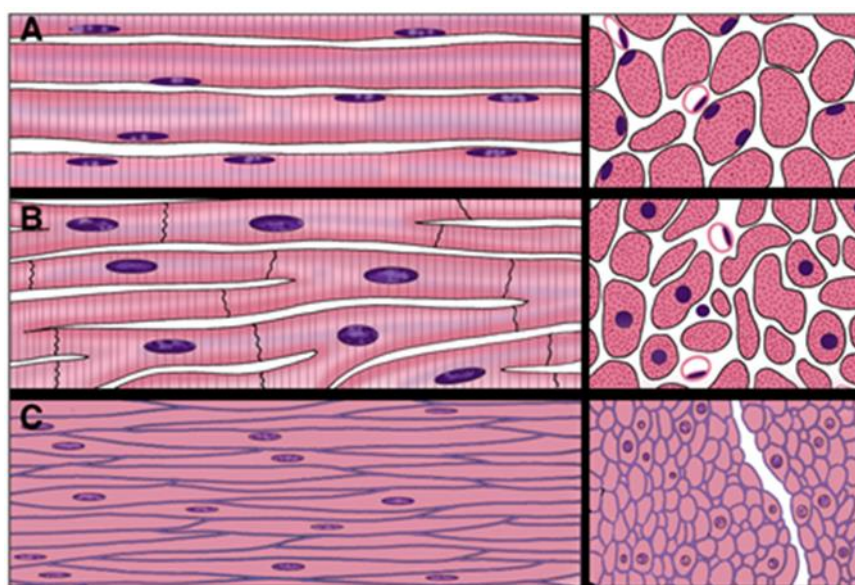
Propidium jodid je organska jodidna sol. Je fluorescenčno barvilo, ki se uporablja za razlikovanje med živimi in neživimi celicami. Akridin-oranžno barvilo je hidrokloridna sol sestavljena iz heterocikličnih obročev in treh amino skupin (aromatski amin). Je histološko barvilo in ima vlogo fluorokroma (barvila, ki fluorescira) (PubChem).

4.6 Uporaba MM

Uporablja se v različnih področjih kot so kemija, biologija, medicina in kmetijstvo. V kemiji se uporablja kot redoks indikator, generator peroksida in za analizo sulfidov. V biologiji je se uporablja kot barvilo za celice (v bakteriologiji). V medicini pa se uporablja za zdravljenje metemoglobinemije. Metemoglobinemija je stanje v krvi pri katerem pride do povečanje koncentracije metemoglobina v krvi .Lahko povzroči težave pri procesu kisika v tkiva. Uporablja se tudi kot antimalarično sredstvo. Je inhibitor polimerizacije. Polimerizacija je proces nastanka polimera iz monomerov. Je barvilo za tekstil, usnje, papir in začasno barvilo za lase. V bakteriologiji se uporablja kot reagent za kemikalij (indikator). Ima lastnosti oksidacijsko/redukcijskega oziroma redoks indikatorja. To pomeni da kaže značilno spremembo barve pri določenem elektrodnem potencialu. Nedolgo nazaj so ga začeli uporabljati za fluorescentno slikanje (identifikacijo obščitniških žlez, slikanje tumorjev trebušne slinavke in odkrivanje robov tumorja raka dojke). Uporablja se v številnih kliničnih postopkih z nizkim tveganjem za pacienta (Maleki in Nematllahi, 2009).

5 MIŠIČJE

Glavni lastnosti mišic sta krčenje (kontraktacija) in sproščanje (relaksacija). Omogočajo gibanje, vzdržujejo telesno držo in stabilizirajo sklepe. Mišičje sestavljajo gladke mišice, srčna mišica in skeletne mišice. Mišičje so iz različnih mišičnih tkiv. Mišično tkivo je specializirano za krčenje. Celice tega tkiva so nitaste ali vretenaste. Vsebujejo mišične beljakovine, ki se med seboj razlikujejo po obliki in funkciji. Po funkciji se delijo tudi katera živčna vlakna jih oživčujejo. Mišična tkiva delimo v tri skupine: prečno progasto, gladko in srčno mišično tkivo.



Slika 8: A: tkivo progaste skeletne mišice, B: tkivo progaste srčne mišice, C: tkivo gladke mišice

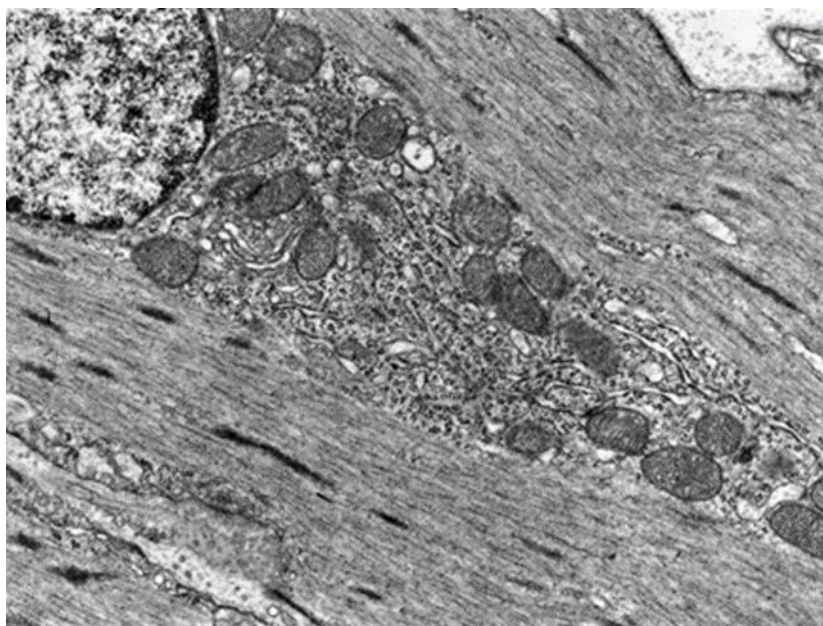
Celice progastih mišic so valjaste in večjedrne ter zložene ena ob drugo. Beljakovine prečno progastih tkiv se raztezajo v snopih in so vzporedne. Mišične celice ali mišična vlakna, t. i. vzdolžne celice imajo več jeder, citoplazmo in krčljiva vlakna (miofibrile). Med seboj se rahlo pokrivajo, zato v mišicah nastajajo progasti pasovi. Zaradi take razporeditve beljakovin se celice po dolžini krajšajo, širina pa ostane skoraj nespremenjena. V gladkih mišicah so nitaste beljakovine pritrjene na ploščice, na te pa se pripenjajo v različnih smereh. Po dolžini se med krčenjem ne krajšajo, ampak se spremenijo po širini. Srčno mišično tkivo je posebna prečno progasta mišica. Celice pri tem se razvejajo in njihovi konci se povezujejo z drugimi konci. Zato se tudi nitaste beljakovine ne postavljajo vzporedno, kot je to značilno za prečne progaste mišice (Plut, 2002).

5.1 Gladko mišično tkivo

Prvi zapisi o gladkih mišicah so iz leta 1958, ko je Christian Champy (1885–1962), francoski zdravnik, opisal celice gladke mišice kot podolgovate elemente s fibrilami, ki izgubijo svoje

značilnosti pri večkratni mitozii. Plasti gladkih mišičnih celic so v stenah različnih organov in cevi v telesu (krvne žile, želodec, črevesje, dihalne poti, mehur ...). Ko se krčijo, se celice skrajšajo in tako potiskajo vsebino organa ali pa spremenijo premer cevi. Imamo tudi snope gladkih mišic pritrjene na dlake kože. Ko se ti snopi skrčijo se dlake vzravnavajo.

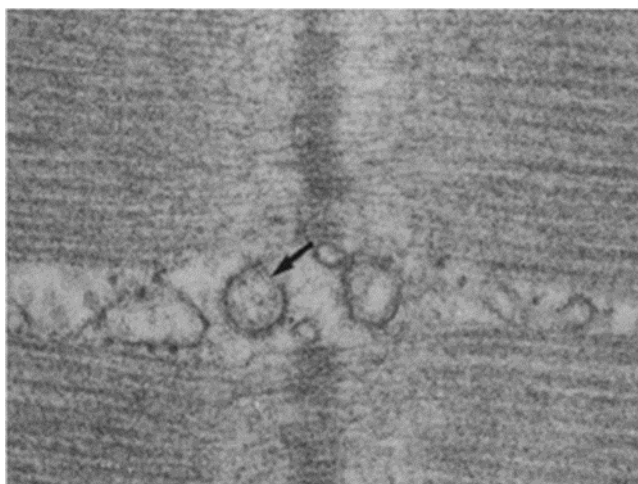
Glavna funkcija celic gladke mišice v notranjem organu je krčenje. Njihovo citoplazmo zapolnjujejo filamenti. Te sestavljajo miofibrile. Filamente lahko razdelimo v tri skupine glede na velikost, lokacijo, sestavo in obliko. Največ filamentov vsebuje aktin in tropomiozin. Druga vrsta filamentov vsebuje miozin in ti filamenti so debelejši. Debeli filamenti se ohranjajo samo v gladkih mišicah, njihova oblika in velikost se spreminjata glede na način fiksacije. Število debelih filamentov je odvisno od količine miozina, prisotnega v tkivu. Po miofilamentih so razpršeni majhni obliži, t. i. temna telesa. Ta temna telesa pa obkroža tretja skupina filamentov, to so skeletini. Po velikosti so uvrščajo med tanke filamente, ki vsebujejo aktin, in debelejšje elemente, ki vsebujejo miozin (Chamley-Campbell, 1979).



Slika 9: Celica gladke mišice

V gladki mišični celici so ob plazmalemi tudi dve vrsti veziklov. Najpogostejši so plazmalemski vezikli v obliki vrečke, pritrjeni z ozkim vratom. Ležijo v vzdolžnih vrstah in se izmenjujejo s temnimi telesi. Njihova funkcija naj bi bila za kopičenje kalcija. Druga vrsta veziklov so prevlečeni vezikli, delujejo pri absorpciji beljakovin v celicah.

Sarkoplazemski retikulum (oblika gladkega endoplazemskega retikuluma) gladke mišice je cevkastruktura locirana na obrobju celice in povezana s plazmalemskimi vezikli. Povezan je z zrnatim endoplazemskim retikulom. Ni povezan z Golgijevim aparatom, celičnim organom v večini evkariontskih celic. Njegova naloga je skladiščenje in sproščanje kalcijevih ionov.



Slika 10: Sarkoplazemski retikulum

Mitochondriji v gladki mišici je običajno na obrobju celice. Njihovo število je odvisno od določene mišice.

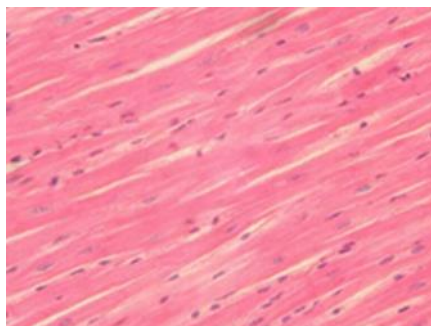
V gladkih mišicah je mehanizem krčenja reguliran z aktivacijo receptorjev in mehanskim aktiviranjem beljakovin miozina in aktina. Spremembo v membranskem potencialu povzroči sprožitev akcijskih potencialov ali ko se aktivirajo ionski kanali v plazmatski membrani. Te spremembe povzročijo krčenje. Miozinova kinaza lahkih verig mora za krčenje fosforilirati 20-kDa verigo miozina. Ta proces omogoča interakcijo med miozinom in aktinom. Pri tem procesu je potrebna ATP. Aktivnost povzroča tonus gladkih mišic (Grover in Daniels, 2021). Krčenje se prične s spremembo debelih filamentov, ki jo povzroči Ca^{2+} . Poveča se koncentracija kalcija, ta reagira s kisljo beljakovino. Ta kompleks aktivira miozinovo kinazo (Webb, 2003).

5.2 Prečnoprogasto mišično tkivo

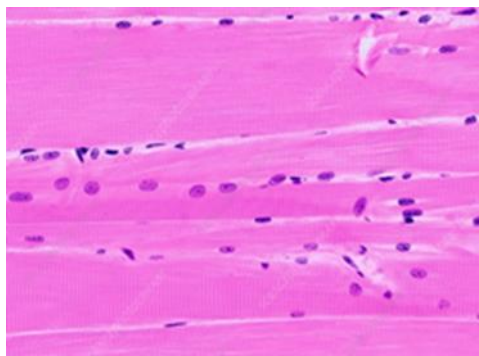
Telo ima dva tipa progastega mišičja: srčno in skeletno. Človeške skeletne mišice dodatno delimo na tip 1, tip 1la in tip 1lb. Progaste mišice oskrbujejo telo s kisikom, vzdržujejo presnovna ravnovesja in omogočajo gibanje. Srčna in skeletna mišica sta si strukturno in funkcionalno podobni, se pa razlikujeta po velikosti in regeneracijskih sposobnostih. Prečno progasto mišično tkivo je visoko organizirano tkivo, ki pretvarja kemično energij v fizično delo. Osnovna naloga tkiva je krčenje za gibanje, dihanje, vzdrževanje drže in črpanje krvi. Tkivo je sestavljeno iz sarkomerov, ki so osnovne enote in vsebujejo anizotropin. Ta trak je bogat z miozinom in dvema svetlima izotropna trakovima, kjer je aktin. Vse vrste progastih tkiv vsebujejo mrežo T-tubulov, ki omogočajo sprostitvev kalcija. T-tubuli se stikajo s sarkoplazemskim retikulumom med izotropnima trakovima .

Mikroskopske strukture skeletne in srčne mišice so različne. Skeletna mišična vlakna izhajajo iz mnogih mišičnih celic in tvorijo večjedrna linearna vlakna. Pri srčni mišici so celice razvejane in samovzdržljive. V srcu se sproži depolarizacija mišične membrane,

katero povzroči vdor natrijevih ionov v celice. Pri depolarizaciji ima pomembno vlogo tudi količina kalcija. Delovanje srca spodbujajo diferencirane mišične celice imenovane vozalne celice. Zbrane v desnem preddvoru v sinoatrialnem in atrioventrikularnem vozlu (Shardin idr., 2016).



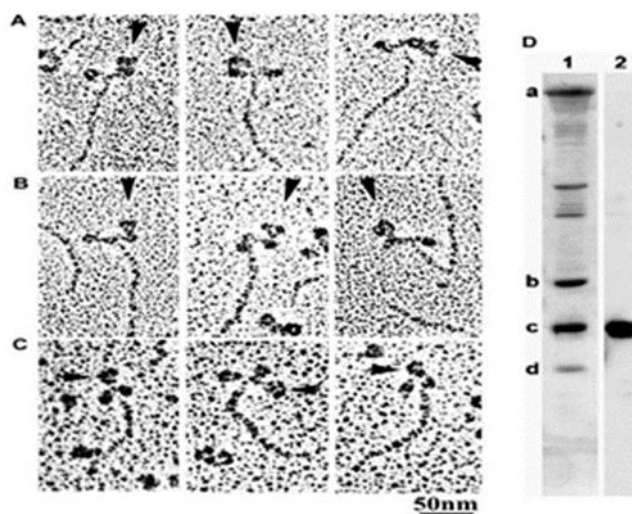
Slika 11: Srečna mišica



Slika 12: Skeletna mišica

5.3 Skeletna mišica

Skeletne mišice so sestavljene iz snopov mišičnih vlaken (celic). Njih obdajajo celične membrane (sarkoleme). V miofibrilah so tanjše enote sarkomere, ki so sestavljene iz aktina in miozina. Miozin mišic in večina nemišičnih miozinov so zgrajeni iz dveh glav, povezanih z α -heliksnim zvitim repom. Vsaka glava se imenuje subfragment, ima vezavno mesto za aktin in pokaže aktivnost ATP-ja, ki ga aktivira aktin. Rep se lahko združuje z repi drugih molekul miozin, kar tvori vlakno (Schiaffino in Reggiani, 2011). Miozin je lahko sestavljen iz težke verige (230 kDa) in dveh lahkih verig (20 kDa). Ena molekula iz dveh verig od naštetih (Hans idr., 1987).



Slika 13: Struktura miozina

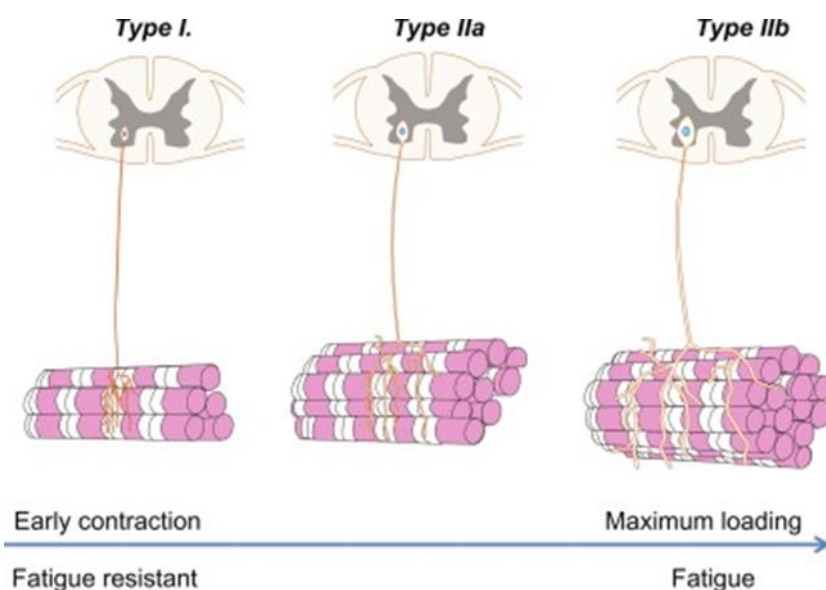
Sarkomere sestavljajo ploščice, diske, proge oziroma linije (Z, A, I in H). Med ploščicama Z ali diskoma je ena sarkomera. Ob vsakem disku Z je tubulus (uvihek celične membrane). Tubulus je napolnjen z zunajcelično tekočino. Poteka iz sarkoleme v sarkoplazmo in obdaja snope mišičnih vlaken. Pri krčenju miozinska in aktinska vlakna drsijo ena proti drugi, zato se skrči celica. Snope mišičnih celic ovija perimizij. Posamezne mišice ovijajo tudi opne fascije. Te prehajajo v kite. Aktivnost mišice nadzira živčni sistem, v obliki akcijskih potencialov

Poznamo več tipov vlaken skeletne mišice. Vlakna tipa I ali drugače imenovana počasna oksidativna vlakna vsebujejo ogromno mitohondrijev in mioglobina (mišični hemoprotein). Mioglobin je pigment, ki jim daje rdečo barvo. Specializirana so za neprekinjeno aktivnost. Za pridobivanje ATP oksidirajo maščobne kisline. Zaradi mitohondrijev prevladujejo aerobni energijski procesi

Vlakna tipa IIA ali hitra oksidativno-glikolitična vlakna vsebujejo veliko mitohondrijev in mioglobina, ki jim prav tako daje rdečo barvo. Za pridobivanje ATP uporabljajo anaerobni in aerobni metabolizem, pri katerem porabljajo maščobne kisline in glukozo.

Vlakna tipa IIB ali hitra glikolitična vlakna vsebujejo malo mitohondrijev in malo mioglobina, zato so bele barve. Aktivirajo se za krajša obdobja hudih naporov. So hitro krčljiva in za gorivo uporabljajo glukozo. Značilni so anaerobni energijski procesi. Laktat je končni produkt razgradnje glukoze in se lahko uporablja v številnih celicah telesa, kot gorivo. Uporabljajo ga organi in skeletne mišice tipa I in tipa IIA. Pri anaerobnih razmerah se pretvori v piruvat in nato v ogljikov dioksid in vodo.

Pri nizkih bremenih se prvo aktivirajo motorične enote sestavljene iz vlaken tipa I. Z večanjem bremena se prvo aktivira vedno več vlaken tipa II. Osebe, ki veliko trenirajo, so zmožne aktivirati več motoričnih enot kot netrenirani. Najhitrejša vlakna tipa IIB so navadno aktivirana pri refleksih min maksimalno hitrih hotenih kontrakcijah oz. velikih do največjih bremenih (Plemenitaš in Žakelj-Mvrič, 2022).



Slika 14: Tipi skeletnih mišičnih vlaken

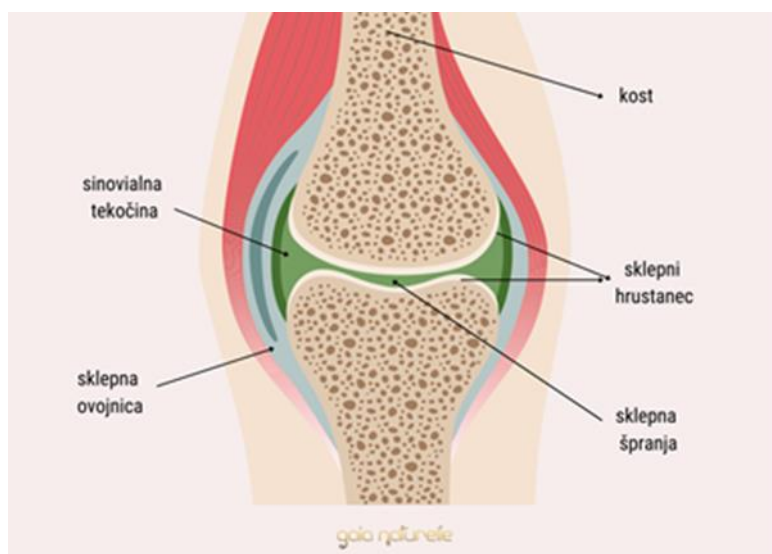
5.4 Povezava med kostmi in mišicami

Ogrodje in mišičje delujeta, kot gibalni sistem. Organizmom omogoča gibanje v zunanjem okolju. Opravlja homeostatsko regulacijo. Kosti so zaloga za rudninske snovi, ki se lahko sproščajo v telesne tekočine ali ostajajo v kosti. Ko se kosti razvijajo k temu prispeva krčenje mišic. Če imamo obremenitev mišičja se to pokaže tudi na kosteh. Mehanska obremenitev je ključni mehanizem, ki povezuje mišice in kosti. Na mestu, kjer se povezujeta mišica in kita je kontraktiln sila, ki jo proizvajajo mišična vlakna, ta se prenaša od miofilamentov do kitičnih vlaken. Razvoj kit zahteva prisotnost mišic in obratno. Kite so trdni vezivni trakovi, ki povezujejo mišice z kostmi. Sestavlja jih kolagen, elastin in druga vlakna. Sestavljene so iz več plasti. Iz epitenona, kateri je zunanji sloj sestavljajo ga celice in kolagena vlakna. Omogoča drsenje kite in ščiti notranje plasti. Endotenon je notranji sloj kite, ki vsebuje krvne žile, živce in kolagenske vlaknine. Endotenon oskrbuje kite s hranilnimi snovmi in vzdržuje strukturo. Peritenon je ovitek kite, ki jo ščiti pred zunanjimi poškodbami. Sestavljajo ga kolagenska vlakna in vezivna tkiva. Kite omogočajo gibanje sklepov. Ko se mišica krči se kite skrajšajo in povlečejo kosti, kar povzroči gibanje sklepa. Kite so glavne prenašalke sile iz mišic na kosti, kar povzroči gibanje.



Slika 15: Kita povezuje mišico in kost

Med kito in kostjo se nahaja hrustanec. Zagotavlja gladko površino, ki olajša drsenje kite čez kosti med gibanjem (omili trenje). Omogoča enakomerno porazdelitev tlaka med gibanjem sklepa. Prispeva stabilnost sklepa in mu daje strukturo. Nima krvnih žil, zato prejema hranila prek tekočine, ki obdaja sklep. Ključen je za ohranjanje zdravja sklepov (Sartori in Sandri, 2015).



Slika 16: Hrustanec in sklep

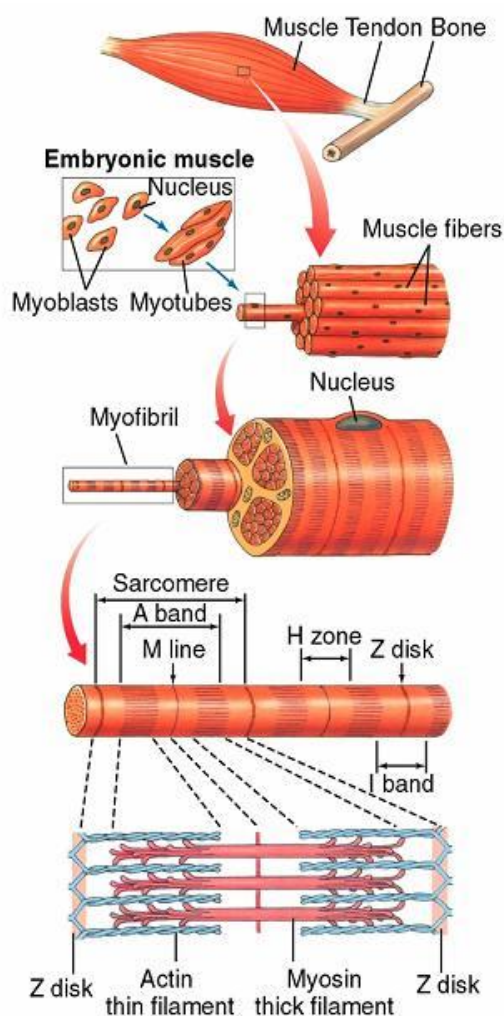
5.5 Zgradba prečno progastega mišičnega vlakna in njegovo delovanje

Prečno progasto mišično vlakno je tip mišičnine, za katero so značilne funkcionalne enote, imenovane sarkomere. Poznamo dva glavna tipa prečno progastih mišic: srčne in skeletne mišice.

Prečno progasta mišičnina vsebuje podaljške celične membrane, imenovane tubuli T ali T-tubuli. Te sarkoplazemskemu retiklu omogočajo sproščanje kalcijevih ionov.

Osnovna lastnost prečno progastih mišic je kontrakcija in relaksacija. Pri kontrakciji se mišice skrčijo skoraj za polovico in pri tem potegnejo cm^2 prečnega preseka okoli 10 kilogramov.

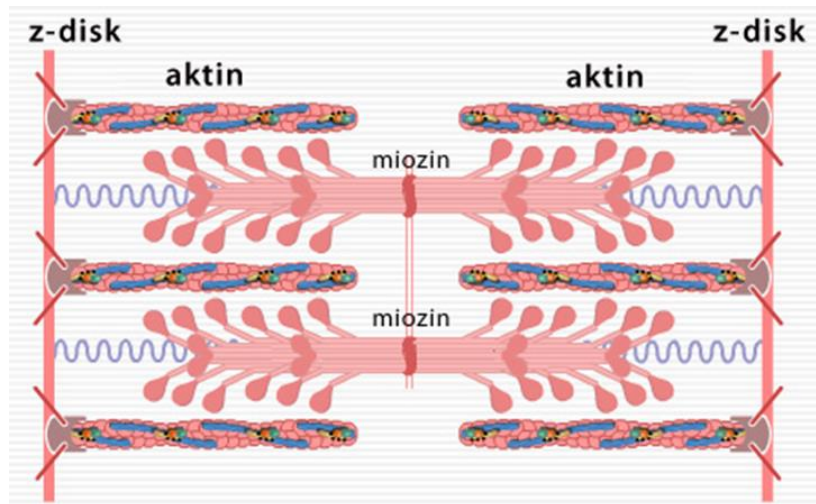
Skeletno mišico sestavljajo mišična vlakna. Mišično vlakno ima sarkolemo, celično membrano (po nekaterih je to vezivna opna vlakna) in sarkoplazmo, nediferencirano citoplazmo, ki polno prostore med kontraktilnimi vlakenci (miofibrilami). Pod sarkolemo je na periferiji (površini) vlakna nanizanih večje število jeder (Faber, 2023).



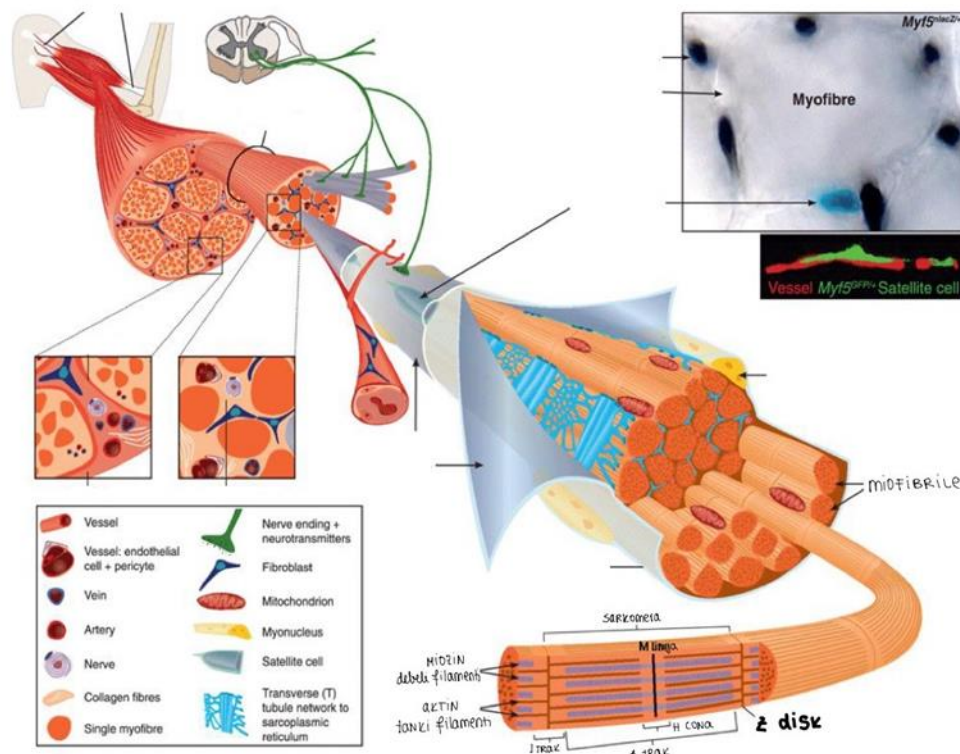
Slika 17: Sarkolema, sarkoplazma in miofibrile

Miofibrile so zložene iz enilomnih in dvolomnih členov, ki jih pod mikroskopom vidimo kot prečne svetle in temne proge. V miofibrilah so še tanjša vlakna, aktin in miozin.

/



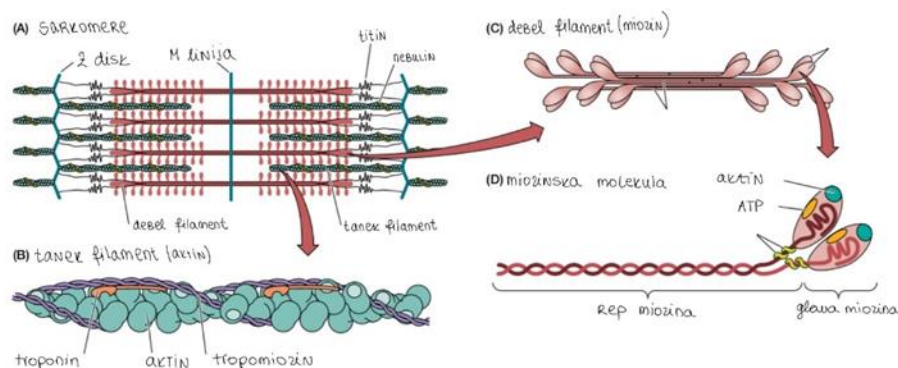
Slika 18: Aktin in miozin



Slika 19: Miofibrile

Nekatera mišična vlakna so bela (belo meso), druga pa rdeča (rdeče meso). V belih mišičnih vlaknih je mnogo miofibril in malo sarkoplazme, v rdečih vlaknih je malo miofibril in veliko sarkoplazme. Bele mišice so hitre in močne, rdeče mišice pa so počasne in vztrajne. Pri

človeku so mišice sestavljene iz obeh vlaken in nimamo čisto belih in čisto rdečih mišic (Faber, 2023).



Slika 20: A: sarkomere, B: aktin, C: miozin, D: miozinska molekula

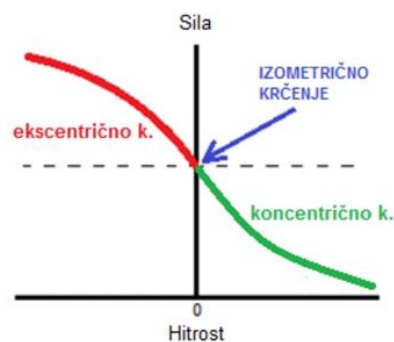
5.6 Začetek krčenja

Vsako mišično celico skeletne mišice inervira motorični nevron. Akcijski potencial se prenaša preko aksonov nevrona, na koncu katerega povzroči sproščanje acetilholina. Ta se veže na nikotinske receptorje mišičnih vlaken, kar povzroči depolarizacijo sarkoleme ali njene ekscitacije (Faber, 2023).

T-tubuli so nadaljevanje sarkoleme, zato je njihov lumen zapolnjen z zunajcelično tekočino. Z depolarizacijo sarkoleme vodijo T-tubuli vzbujanje globoko v noranjost mišičnega vlakna, do končnih cistern sarkoplazemskega retikuluma. Akcijski potencial, dostavljen preko T-tubulov do terminalnih cistern, povzroči sproščanje Ca^{2+} iz sarkoplazemskega retikuluma. Povečana koncentracija Ca^{2+} v citosolu pa omogoči vezavo aktina na miozin in vodi do kontrakcije (Faber, 2023).

5.7 Tipi mišičnega krčenja

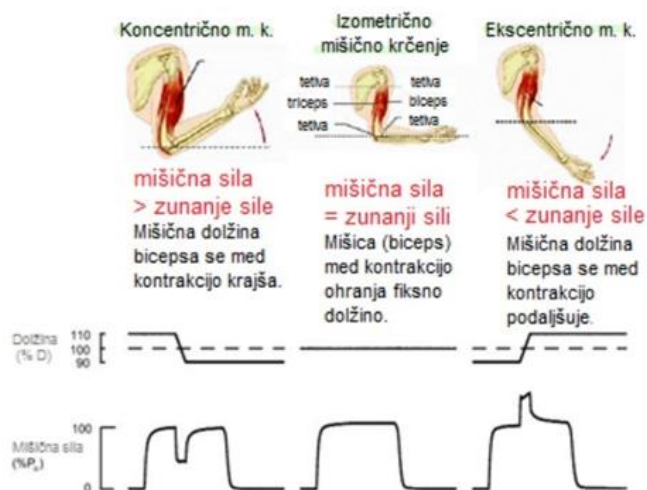
Izotonično mišično krčenje se zgodi, ko mišica ustvari gibanje ob konstantni napetosti. Koncentrično krčenje se zgodi, ko se mišica skrajša, medtem ko ekscentrično krčenje vključuje podaljšanje mišice pod obremenitvijo. Izometrično krčenje pa pomeni napetost mišice brez vidnega gibanja. O izometrični (statični) mišični aktivnosti govorimo takrat, ko mišična aktivnost deluje s silo na kost, ob tem pa ohrani svojo dolžino in tako ne pride do gibanja. Statično ali izometrično mišično aktivnost se zmotno, a pogosto označuje samo kot maksimalno silo kontrakcije in med izometrično mišično aktivnostjo se sila športnika enači s silo upora. Večji upor pomeni večjo zunanjo silo, zahteva večjo moč športnika, da ohrani razmerje med ročicami v aktivnem sklepu. Ko upor preseže statično moč športnika, mišična kontrakcija ni več izometrična, vadeči ob kontrakciji ni več sposoben ohraniti mišične dolžine (Novak, 2014).



Slika 21: Odnos med silo in hitrostjo krčenja mišice

Na sliki 21 je prikazan graf sile v odvisnosti od hitrosti krčenja. Hitrost krčenja ponazarja spremembo dolžine mišice v času ekscentrične, izometrične in koncentrične mišične aktivnosti. Odnos med hitrostjo in silo je obratno sorazmeren. Večja je hitrost mišičnega krčenja, manjšo silo mišica razvije. Velike sile pa doseže pri majhni hitrosti.

Vse tri oblike so ključne pri razvoju moči, stabilnosti in koordinacije. Koncentrično in ekscetrično krčenje se osredotočata na gibanje, medtem ko je izometrično bolj usmerjeno v stabilizacijo. Vsaka oblika ima svojo vlogo pri treningu in vsaka lahko prispeva k izboljšanju mišične moči in funkcionalnosti (Novak, 2014)



Slika 22: Prikaz koncentrične, izometrične in ekscetrične mišične kontrakcije

O ekscetričnem ali negativnem izotoničnem mišičnem krčenju govorimo takrat, ko je mišična sila manjša od zunanje sile, takrat se povečata dolžina mišice in kot v aktivnem sklepu. Ko mišica ustvari enako silo zunanji ali ko je predmet nepremičen (slika 8), med mišičnim krčenjem ne pride do giba, kot v sklepu pa ostaja enak. Mišična dolžina se ne spremeni pri izometrični mišični kontrakciji. Mišična aktivnost, pri kateri je mišična sila večja od zunanje sile in pride do krajšanja mišice in zmanjšanja kota v sklepu, predstavlja

koncentrično ali pozitivno izotonično kontrakcijo. Hitrost krčenja mišice je odvisna od velikosti zunanje sile, torej večja je zunanja sila, manjša je hitrost krčenja (Novak, 2014).

Na sliki 23 je prikazan primer nepremičnega predmeta, s pomočjo katerega lahko kontroliramo kot v sklepu in mišično dolžino. Ob tem povečamo mišično silo, napetost.



Slika 23: Nepremičen predmet in izometrična mišična kontrakcija

5.8 Vloga skeletnega mišičja pri termoregulaciji

Termoregulacija vključuje refleksne mehanizme, ki omogočajo, da v telesu vlada ničelna bilanca toplote. To pomeni, da je oddajanje toplote v okolico enako nastajanju toplote, kar omogoča ohranjanje stalne telesne temperature. Med telesno dejavnostjo v aktivnih skeletnih mišicah zaradi povečane oksidacije hranil za pridobivanje ATP močno naraste proizvodnja toplote. Pri reakcijah razgradenj v telesu se okoli 80% kemijske energije sprosti v obliki toplote, zato se med telesno aktivnostjo mišice močno segrejejo. Torej bi taka toplotna obremenitev povzročila, da se telo segreje za 1°C v 8 minutah. Zato ima telo razvite ustrezne termoregulatorne mehanizme. Količina sproščene toplote na časovno enoto je odvisna od intenzivnosti in trajanja telesne obremenitve. Na začetku zmerne vadbe temperatura v mišicah zaradi povečanega nastajanja toplote narašča približno 1 °C/min, mišice se torej hitro segrevajo. Zato nastane temperaturni gradient med mišičnim tkivom in krvjo, kjer je temperatura okoli 37°C. Toplota s prevajanjem prehaja iz mišic v kri. Hkrati se zaradi nevrogenih in lokalnih mehanizmov močno poveča pretok krvi skozi aktivne mišice, lahko do 20-krat glede na mirovanje. Večja konvekcija zaradi povečanega minutnega volumna srca, večja temperaturni gradient med mišicami in krvjo, zato je prehajanje toplote iz mišic v kri dodatno povečano. Kmalu se ustvari novo ravnotežno stanje, ko temperatura v mišicah ne narašča več. Ker kri s povišano temperaturo kroži po telesu, naraste temperatura v notranjosti telesa, kar zaznajo centralni termoreceptorji. Aktivirajo se termoregulatorni

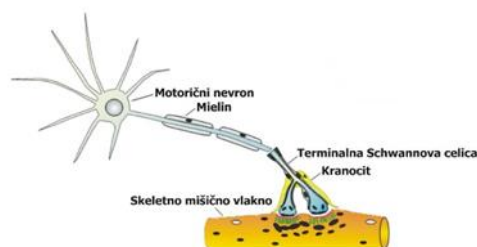
refleksi, ki omogočajo povečan pretok toplote iz jedra telesa na periferijo, kjer govorimo o temperaturi plašča (Lenasi, 2014).

Toplota zaradi temperaturnega gradienta torej prehaja od notranjosti telesa do periferije, od koder prehaja v okolico.

Drgetanje je ena od metod, ki jih telo uporablja pri termoregulaciji. Ko je organizem izpostavljen hladnemu okolju, se lahko mišice hitro krčijo in sproščajo, kar ustvarja toploto in pomaga pri ohranjanju telesne temperature. Ta proces, imenovan tresenje ali drgetanje, je refleksni odziv telesa. Pomaga pri ohranjanju toplote v primeru hipotermije ali nizkih temperatur. Ta mehanizem pomaga povečati metabolizem in proizvodnjo toplote, da bi ohranil normalno telesno temperaturo v hladnem okolju (Lenasi, 2014).

5.9 Prenos signala z nevronov na mišična vlakna

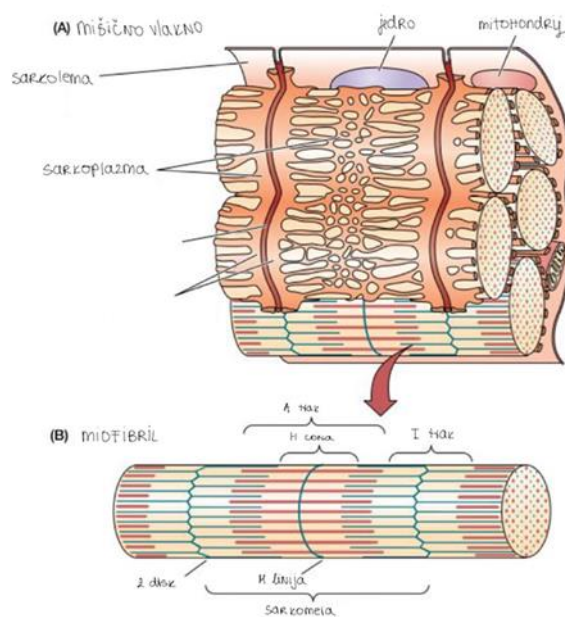
Živčno-mišični stik ali motorična ploščica je sinapsa med motoričnim nevronom in skeletno mišično celico. Vedno je ekscitatorna kemična sinapsa, v kateri se dražljaj z nevrna preko neurotransmiterja acetilholina prenese na mišično celico. Depolarizacija motoričnega nevrna sproži eksocitozo neurotransmiterja acetilholina iz živčnega končiča, ki se veže na nikotinski holiginerični receptor mišičnega tipa na postsinaptični membrani. Vezava acetilholina na nikotinski holinerični receptor na postsinaptični membrani povzroči konformacijske spremembe in odpiranje por, ki so prepustne za natrijeve in kalijeve ione. Tok Na^+ v celico, ki je bistveno večji kot tok K^+ v nasprotni smeri, povzroči depolarizacijo postsinaptične membrane motorične ploščice oziroma potencial motorične ploščice. Ta povzroči nastanek akcijskega potenciala mišične celice, ki aktivira njeno krčenje. Motorična ploščica je zgrajena iz presinaptičnega dela, sinaptične špranje in postsinaptičnega dela. V območju motorične ploščice najdemo tri tipe celic: mišično celico, motorični nevron in terminalno Schwannovo celico. Presinaptični del motorične ploščice je zgrajen iz betičasto zadebeljenega distalnega dela aksona motoričnega nevrna, ki ni mieliniziran, v njem pa se skladišči acetilholin. Živčni terminal oziroma končič se naprej razteza v mišično vlakno. Terminalna Schwannova celica lahko sintetizira in sprošča acetilholin (Trobec, 2018).



Slika 24: Motorična ploščica

5.10 Delovanje sarkomere na molekularni ravni

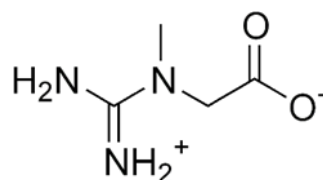
Predhodne strukturne in molekularne študije prečnoprogastih mišic so omogočile opazovanje podrobnosti osnovne organizacije proteinov, ki sestavljajo sarkomero. To je primarno strukturno enoto, ki se vedno znova ponavlja skozi mišico. Sarkomera je osnovna kontraktilna enota progastih mišic. Dolga je 2 do 2,5 μm . Razdeljena je na 4 cone. Kot sem že omenila poznamo izotropni pas (I-pas), kjer so prisotni le tanki aktinski filamenti. Anizotropni pas (A-pas), ki vsebuje oboje tanke aktinske filamente in debele miozinske filamente. M črta v središču pa določa meje sosednjih sarkomer. Tam se križno povezujejo miozinske niti in Z disk. Aktinski in miozinski filamenti sestavljajo sarkomerni citoskelet. Drsijo drug mimo drugega, da ustvarjajo mišično kontrakcijo. Tako, dajo prečno progastim mišicam tudi prepoznaven črtast izgled, z menjavanjem svetlih in temnih pasov. Dodatno, antiparalelni konci aktinskih filamentov (F-aktin) so zasidrani na Z-disku (Faber, 2023).



Slika 25: Zgradba sarkomere

Miozin pretvarja kemično energijo v mehansko, a z interakcijo z aktinom ustvarja mišično kontraktilno silo. A trak je območje sarkomere, v katerem je miozin in področje, kjer se miozin in aktin prekrivata. Cona H, ki se nahaja znotraj in proge vključujejo samo miozin in so prerezane na pol z linijo M. Večinoma I trak sarkomere vsebuje aktin, skozi sredino traku I poteka Z disk. Na Z disk so pritrjeni nebulinski proteini, aktinska vlakna, preko proteina pa titinska in miozinska vlakna. Sarkomere zavzemajo prostor med obema Z diskoma v

miofibrilah. Miozinska vlakna so zgrajena iz dveh verig, ki se ovijata druga okoli druge. Na svojih koncih imajo glavo z domeno, ki veže aktin in glavo, ki veže ATP. Aktinska vlakna so zgrajena iz dveh verig, ki tvorita tuljavo. Tropomiozinske verige pa se ovijajo okoli aktina. Tropomiozin, v sodelovanju z troponinom, nadzoruje dostop miozinskih glav do aktina. Ko se kalcijevi ioni vežejo na troponin, ga aktivira sprostitev tropomiozinskih verig, kar sprosti mesto na aktinu za vezavo miozina. po tej vezavi se sproži gibanje, tako da se aktinsko vlakno premakne za približno 10 nm proti središču sarkomera. Takrat pride do mišične kontrakcije. Sarkoplazemski retikulum, ki ovija miofibrile, ima glavno vlogo pri shranjevanju kalcijevih ionov. Na svoji membrani ima od ATP odvisne transportne črpalke kalcijevih ionov, ki s porabo energije prinašajo Ca^{2+} v lumen. Kreatin je telesu lastna dušikova organska kislina z molekulsko formulo $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ (Faber, 2023).



Slika 26: Strukturna formula kreatina

5.11 Energija za mišično delo

Kreatin je aminokislinski derivat, ki lahko v telesu nastane iz treh aminokislin: metionin, glicin in arginin. Ima pomembno vlogo v energijskem metabolizmu. Sintetizira (nastaja) v jetrih, ledvicah in trebušni slinavki. Prenaša se s krvjo do srca, možganov in mišic, ker se uporablja za sintezo fosfokreatina. 95% se ga nahaja v tkivu skeletnih mišic, kjer sodeluje v anaerobnem alaktatnem oziroma ATP-PCr sistemu za zagotavljanje energije za delovanje mišic. 40% zalog kreatina predstavlja prosti kreatin, 60% pa je shranjenega v obliki kreatin fosfata, ki se raztopi, ko v mišici zmanjka ATP-ja. Kreatin poleg tega tudi pospešuje sintezo mišičnih beljakovin (aktina in miozina), kar še povečuje sposobnost mišice, da opravlja fizično delo. Anaerobni procesi so zelo pomembni z vidika specifične vzdržljivosti. Energija za anaerobne procese se v največji meri sprošča s pomočjo dveh mehanizmov, in sicer fosfagenskega in glikolize. Anaerobne procese aktivira znižanje količine ATP-ja oziroma proizvodnje ADP-ja v celicah. To sproži reakcijo razgrajanja visoko energijske spojine kreatin-fosfata in anaerobno glikolizo, v kateri se razgrajajo ogljikovi hidrati. V začetnih 2-3 minutah se energija za motorično delo zagotavlja iz fosfagenskih in glikolitičnih virov. Istočasno povzročijo produkti anaerobnega metabolizma (kreatin in laktat) povečanje funkcije srca in cirkulacije, s čimer povečujejo potrebo po kisiku in relativnem deležu aerobnih procesov.

5.12 Mehanizmi

5.12.1 FOSFAGENSKI MEHANIZEM

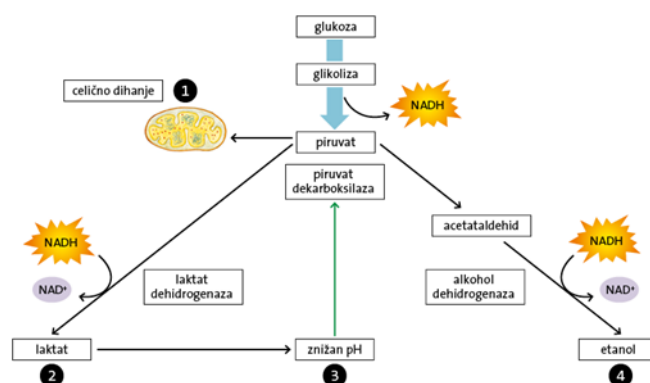
Te procese imenujemo tudi anaerobni alaktatni energijski procesi. Fosfagenski mehanizem predstavlja proces cepljenja visokoenergetske fosfatne spojine ATP. Zaloge ATP-ja v mišici so zelo majhne, okrog 0,7 mola. ATP se v tej kemični reakciji razcepi na ADP, fosfat in energijo za mišično krčenje s pomočjo encima atpeaze. Kreatinfosfat se, s pomočjo kreatinkinaze, razcepi na kreatin, fosfat in energijo. To je razgradnja oziroma hidroliza kreatin fosfata. Obnova kreatin fosfata po izčrpanju zalog poteka po eksponentni krivulji. Za obnovo polovice je potrebno približno 30 sekund, za obnovo več kot 90% zalog pa so potrebne približno 4 minute (Koron, 2009).

5.12.2 GLIKOLIZA

Anaerobne alaktatne procese je mogoče izkoriščati 8 do 10 sekund pri maksimalnem naporu. Potem pa se začne aktivnost glikolize naraščati. Pride do razgradnje molekul glukoze, ki spada med ogljikove hidrate, iz katerih dobimo največji delež energije. Ogljikovi hidrati se lahko takoj po zaužitju začnejo presnavljati in predstavljajo takoj razpoložljivo energijo. Druga možnost je, da se nalagajo v mišice in jetra kot glikogen. Tretja možnost je pretvarjanje v maščobo in nalaganje v maščobna tkiva. Ločimo dve vrsti glikolize, in sicer glikolizo brez prisotnosti kisika (anaerobna, hitra) in glikolizo s prisotnostjo kisika (aerobna, počasna). Med anaerobno glikolizo sta končna produkta razgradnje glikogena piruvat in laktat. Anaerobna glikoliza se pojavlja, ko je na voljo malo kisika. Med aerobno glikolizo ne nastaja laktat, piruvat pa je transportiran v mitohondrije, kjer se porabi v oksidacijskih procesih. Uravnavanje glikolize poteka prek encima fosforilaze in z uravnavanjem aktivnosti encima fosfofruktokinaze. Aktivnost encima fosforilaze povečata hormona glukagon in adrenalin, encima fosfofruktokinaze pa zmanjšan količnik ATP/AMP in zmanjšana koncentracija limonske kisline. Povečana koncentracija mlečne kisline pa inhibira aktivnost encima fosfofruktokinaze (Koron, 2009).

5.12.3 MLEČNOKISLINSKO VRENJE

Med intenzivno vadbo mišice porabljajo energijo. Ko telesu primankuje kisika med intenzivno dejavnostjo, mišične celice začnejo proizvajati energijo brez kisika s procesom imenovanim anaerobni metabolizem. Med tem procesom se glukoza pretvarja v energijo brez potrebe po kisiku, vendar se pri tem proizvaja mlečna kislina kot stranski produkt. Ko se kopiči, lahko mlečna kislina povzroči občutek utrujenosti, pekoč občutek v mišicah in krčenje, kar lahko zmanjša mišično zmogljivost. Mišice lahko tako delujejo le omejen čas. Ko se intenzivna vadba upočasni se mlečna kislina postopoma presnavlja in odstranjuje iz mišic (Koron, 2009).



Slika 27: Glikoliza in vrenje

5.12.4 CELIČNO DIHANJE

Celično dihanje je ključni proces za proizvodnjo energije v mišicah in drugih celicah telesa. Sestavljen je iz treh faz: glikoliza, ki sem jo že opisala, citronskega cikla in oksidativne fosforilacije.

Po glikolizi piruvična kislina, ki je produkt glikolize, vstopi v mitohondrije, kjer poteka citronska kislinska pot. Poteka razgradnja piruvične kisline v CO₂, sproščanje ATP in proizvodnjo nosilcev energije v obliki NADH in FADH₂. Oksidativna fosforilacija pa se zgodi v notranjih membranah mitohondrija. Tu se NADH in FADH₂ uporabljata za proizvodnjo ATP s pomočjo verige prenašalcev elektronov in končnega encima, imenovanega ATP sintaza.

Ta proces zagotavlja energijo v obliki ATP za mišično kontrakcijo.

Zapoznena mišična bolečina je simptom, ki je posledica z vadbo povzročene mikropoškodbe mišice in se običajno pojavi po vadbi. Vsebuje težke obremenitve v ekscentričnih ali ekscentrično-koncentričnih pogojih. Morfološki kazalci mišične poškodbe se kažejo v mikroraztrganih kontraktilnih in nekontraktilnih elementih ter v poškodovani celični membrani mišičnega vlakna. To stanje se potem izraža v prisotnosti mišičnih proteinov v krvi, otečeni mišici, spremembah strukture mišičnega tkiva in v padcu fizične zmogljivosti. Velika aktivnost anaerobnih laktatnih procesov povzroča kopičenje mlečne kisline (laktata) v mišicah in organizmu. O tem, kako veliko je povečanje vsebnosti laktata, govori podatek, da je koncentracija v mirovanju navadno manjša od 2 mmol/l, po tovrstnem naporu pa se poveča tudi do vsebnosti 23 mmol/l. V organizmu športnika in v mišicah se spremeni acidobazni status, ki je posledica kisle reakcije mlečne kisline. Športnik jo čuti kot utrujenost in otrdelost. Sprememba vpliva neposredno na kontrakcijski mehanizem med aktinskimi in miozinskimi vlakni mesto na aktinu, na katerega se veže kalcijev ion, ki sproži ta proces, zasede vodikov ion, ki pride iz mlečne kisline, tako da je cikel krčenja na tem mestu otežen ali onemogočen. Zgoraj navedena sprememba povzroča inhibicijo (zmanjšanje) aktivnosti nekaterih encimov, ki so ključni za potek reakcij v anaerobnih laktatnih energijskih procesih (Koron, 2009).

5.13 Odziv telesa na povečano telesno aktivnost

Telesno aktivnost lahko opredelimo kot opravljanje mišičnega dela. Kemična energija se pretvarja v mehansko. Mišice z energijo zadostimo tako, da se poveča raven presnove v telesu. Za to pa je potreben dotok hranil in kisika v aktivne mišice. Glavni vir hranil za mišice sta glukoza in maščobne kisline.

Telesna aktivnost izboljša dihalno funkcijo, poveča porabo kisika in vpliva na živčni sistem. Izboljšajo se biokemične in histološke lastnosti skeletnih celic. Redna telesna aktivnost izboljša funkcijo srčne mišice. Povečata se srčni volumen. Prehranske arteriole so bolj pretočne, izločevanje kisika na periferiji je izdatnejše. Mišice se povečajo in zmorejo večje napore. V krvi imamo manj laktata oziroma se izloča manj laktata.

Lahko pa pride do vročinske obremenitve, kar prepoznamo po utrujenosti in razdražljivosti. Lahko tudi do vročinski udar, sončarica, pregretje organizma (Lenasi, 2014).

6 DIFUZIJA IN KONVEKCIJA

Difuzija je posledica gibanja delcev v tekočini. Lahko so delci večji in plavajo po tekočini, ali pa so gradniki tekočine (njene molekule). Difuzijo takoj opazimo v snovi, katera ima razlike v koncentraciji ali gostoti delcev. Delci se premikajo iz območja višje koncentracije v območja nižjih koncentracij. Premikanje se dogaja zaradi naključnega termičnega gibanja delcev. Je pomemben proces v živih organizmih (Kosmač, 2017). Difuzija molekul v možganih in drugih tkivih je pomembna pri bioloških procesih kot so dostava zdravil in za slikanje z magnetno resonanco z utežno difuzijo. Razumevanje difuzije različnih kemikalij skozi porozno strukturo možganov in drugih tkiv, je pomembno za razumevanje intramolekulskega in intercelularnega signaliziranja (Sen, 2004). V mišičnem tkivu je tudi zelo pomemben koncept difuzije kisika s pomočjo mioglobina. Mioglobin je intracelični heme-beljakovinski protein za vezavo kisika. Prisoten je v mišičnem tkivu sesalcev in ima dve funkciji. Lahko deluje kot dolgoročna zalogovna postaja kisika (pri živalih med potopom). Pri pticah, kjer se krvni obtok zmanjša med ritmičnim krčenjem mioglobin deluje, kot kratkoročna zaloga kisika. Pri mirovanju mišic so arteriole primarno mesto difuzije kisika iz obtoka (Berry idr., 2018). Ko poteče mišična kontrakcija deluje difuzija (povečana pretočna površina kapilar) kot tudi konvekcija (povečan pretok rdečih krvnih celic). Difuzija je odgovorna za prenos kisika na kratke razdalje med kapilarami in celicami mišic. V mišicah je odvisna od same strukture tkiva (velikosti vlaken, prepustnosti), ter tenzorjem difuzije. To je bilo simulirano s pomočjo numerične simulacijske aplikacije. Voda lažje difundira vzdolž dolgih osi mišičnih vlaken. Anizotropijo difuzije je mogoče opisati z tenzorjem (tenzorski model izraža molekularno gibljivost v vsako smer in korelacije med difuzijskimi premiki v istih smereh), pri čemer je usmerjenost glavne lastne vrednosti dolga os mišičnega vlakna. V živem organizmu na difuzijo vode v tkivu vplivajo fizične ovire (npr. celične membrane in celične sestavine). Zato se meri učinkovit difuzijski koeficient, ki ga običajno imenujemo približni koeficient difuzije (ADC), ta je nižji od prostega koeficienta difuzije (Pittman, 2000). Pri tkivih z vlaknasto strukturo, kot so skeletne mišice, srčna mišica in osrednji živčni sistem, je difuzija bolj ovirana pravokotno na vlakna, kot vzporedno z njimi. Difuzija je v teh tkivih anizotropna (v določeni smeri bolj omejena), pri čemer so vrednosti $2,2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ vzporedno z mišičnimi vlakni in kadar pravokotno na vlakna $1,3 \times 10^{-32} \cdot \text{s}^{-1}$. (Heemskerk, Damon, 2015). Možno jo je preučevati z difuzijsko občutljivo MRI. Za MRI uporabljamo poljsko gradientno tehniko. Difuzija v podolgovatem tkivu je anizotropna in odvisna od difuzijskih gradientov.

Konvekcija je proces prenosa toplote ali snovi, pri katerem se premikajo delci tekočine ali plina. Premik delcev je posledica razlik v temperaturi ali koncentraciji v snovi. Ustvarja tok ali gibanje, ki omogoča prenos toplote in snovi na daljavo. Mehanizem konvektivnega pretoka je odgovoren za oceanske pretoke in globalno cirkulacijo ozračja. V telesu sesalcev sta difuzija in konvekcija tesno povezane. Zadostna oskrba s kisikom je ključna za normalno delovanje vseh celic. Ker imajo celice skeletnih mišic sposobnost, da prilagajajo svojo

potrebo po kisiku med počitkom in močno kontrakcijo, je pomembno, da so vzpostavljeni mehanizmi, ki zagotavljajo, da je oskrba s kisikom vzdrževana na zadostnih ravneh. Mikrocirkulacija igra kritično vlogo v tem procesu, saj končne veje tega zapletenega omrežja krvnih žil določajo distribucijo perfuzije in strukturni okvir za difuzijo. Oskrba s kisikom je odvisna od pravilnega delovanja tako konvektivnih, kot tudi difuzijskih komponent prevoznega sistema. Konvekcija je odgovorna za prenos kisika na dolge razdalje z masnim tokom krvi (od 10 mm do 10 metrov), predvsem v arterijskih in venskih žilah. Konvektivni prenos je pomemben za premikanje rdečih krvnih celic, saj je kisik vezan na hemoglobin (kateri je v rdečih krvnih celicah). Ko je kri oksigenirana in premaknjena iz centralne cirkulacije v periferne tkivne predele s konvekcijo, se kisik premika na kratke razdalje z difuzijo iz arteriol, kapilar in venul do mitohondrija. Med kontrakcijo mišice je težko kvalificirati kognitivno in difuzijsko gibanje kisika (Hochachka, 2003).

6.1 Efekti zmrzovanja in odmrzovanja tkiv

Najbolj razširjena metoda dolgoročnega shranjevanja biološkega materiala, tudi matičnih celic, je krioprezervacija. Celice se zamrzne v parah tekočega dušika pri zelo nizkih temperaturah pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odmrzovanju na taki temperaturi se še ohranijo vse vitalne funkcije celic. Poznamo dve metodi krioprezervacije, hitro in počasno. Najbolj uporabljena je počasna metoda zmrzovanja. Takrat se celice ohlaja na $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ na minuto do temperature $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dovgan, 2020).

Počasno zmrzovanje ima prednosti in slabosti. Tvorjenje znotrajceličnih kristalov je upočasnjeno, saj je dovolj časa, da voda difundira v zunajcelični prostor in s tem ustvari novo osmotsko ravnotežje. Po drugi strani pa celice pri tej metodi dlje časa izpostavljene krioprotektantom. Te so lahko toksični za celico in to privede do poškodbe celice. Poleg tega se lahko celice poškodujejo, saj pri počasnem zmrzovanju kristali v zunajceličnem prostoru zrastejo večji in tako celice stisnejo med seboj (Dovgan, 2020).

Nasprotno pa pri hitrem zmrzovanju, se hitreje ohlaja, iz $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ na minuto. Pri tako hitrem zmrzovanju voda nima dovolj časa, da difundira izven celice, zato pride do tvorjenja znotrajceličnih kristalov in poškodb v celici. Te poškodbe zmanjšajo celično viabilnost (parameter za merjenje celotne dejavne celične populacije), poškodujejo celično membrano, morfologijo ali citoskelet. To se kaže v spremenjeni celični funkciji (Prento, 1997).

Učinke počasnega zmrzovanja in odmrzovanja na encimsko razdelitev in ultrastrukturo so proučevali na rezinah jeter podgan, zamrznjenih v suhem ledu ali tekočem dušiku in shranjenih pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čas zmrzovanja je bil 1 do 14 dni. Nezamrznjene rezine pa so služile kot kontrole. Zamrznjene rezine jeter so bile odmrznjene v fiksativu Karnovsky in obdelane za transmisijsko elektronsko mikroskopijo. Po poskusu je bilo zamrznjeno in odmrznjeno tkivo zelo podobno kontrolnemu tkivu (nezamrznjenih jeter). Proti sredini tkiva se je ultrastruktura postopno slabšala. Primerjava s $50\text{ }\mu\text{m}$ kriostatskimi odseki, pripravljenimi za transmisijsko elektronsko mikroskopijo, je pokazala, da je odmrzovanje škodljiv korak za

ohranitev ultrastrukture. Po odtajanju, homogenizaciji in diferencialnem centrifugiranju smo analizirali vzorce porazdelitve topnih encimov (citosol, laktat dehidrogenaza, mitohondrijski matriks, glutamat dehidrogenaza, lizosomi). Shranjevanje 2 tedna ni vplivalo na aktivnost encimov. Porazdelitve aktivnosti so pokazale, da je bilo le minimalno povečano uhajanje beljakovin (encimov) iz predelkov v zamrznjenem in odmrznjenem tkivu, v primerjavi z kontrolnim tkivom. Dokazali so tudi, da so rezultati enaki ne glede na metodo zamrzovanja (Fischer, 1905).

6.2 Zmrzovalni artefakti in shranjevanje

Zmrzovalni artefakti lahko predstavljajo nezaželene ali nepredvidene učinke, ko je material zamrznjen. Lahko vključujejo strukturne spremembe, poškodbe ali spreminjanje lastnosti zamrznjenega materiala. Na primer, pri ohranjanju bioloških vzorcev lahko zmrzovalni artefakti vključujejo tvorbo kristalov, kar lahko negativno vpliva na celovitost vzorca. Poleg tega lahko predstavljajo razpoke v celicah ali spremembe v strukturi tkiva. To tudi vpliva na funkcije posameznih celic. Lahko tudi pride do poškodb organov ali tkiv zaradi ishemičnih poškodb, ki so posledica slabe prekrvavitve (Prento, 1997).

Preprečevanje zmrzovalnih artefaktov je v sodobnem času dobro rešljivo. Obstaja več metod in načinov kako lahko preprečimo poškodbe zamrznjenih tkiv, celic in drugega biološkega materiala. Za ohranjanje tkiv in organov poznamo različne strategije, kot so podhladitev, kontrolirano delno zamrzovanje in enakomerna prezervacija pod 0 °C brez zamrzovanja.

Pri podhladitvi se tkivo ohladi na nekaj stopinj pod ničlo. Pri tem se uporabi visoke koncentracije nizkomolekularnih sladkorjev. Te nadomestijo izgubljeno vodo, stabilizirajo fosfolipidni dvosloj, predvsem pa zmanjšajo nastanek kristalov.

Preprečujemo jih lahko z uporabo krioprotektantov, da celice lahko ohranijo svojo funkcijo. Krioprotektani so snovi, ki preprečujejo nastanek kristalov v celici s tem, da zmanjšajo koncentracijo topila, hkrati pa preprečijo osmotski šok s povečanjem koncentracije topljenca. Primeri krioprotektantov so DMSO, gliceroli, glikoli, glukoza in drugi sladkorji kot so disaharidi. Poznamo dve vrsti krioprotektantov, znotrajcelični in zunajcelični. Znotrajcelični so manjše molekule, ki lahko prehajajo skozi celično membrano. Zunaj celični pa so večji polimeri kot so sladkorji. Te ne prehajajo celične membrane.

Drugi način preprečevanja je kontrolirano delno zamrzovanje. To zajema postopno zamrzovanje, pri katerem se izloča voda in tvori kristale zunaj celične membrane. Stem zmanjšamo možnost poškodbe celice in tkiv. Pri tem se tudi izločeno vodo nadomešča z uporabo krioprotektantov.

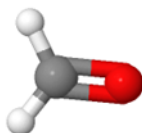
Poznamo tudi enakomerno prezervacijo pod 0 °C brez zamrzovanja, pri kateri se tudi uporablja krioprotektane. Med procesom ohlajevanja, zvišujemo koncentracijo krioprotektantov. Tako zmanjšamo osmotski šok.

Krioprotektani so substance, ki ščitijo celice pred poškodbami, ki lahko nastanejo med postopkom zamrzovanja ali odmrzovanja (Prento, 1997).

6.3 Formalin



Slika 28: 3D struktura formalina



Slika 29: Kristalna oblika formalina

Formalin ima molekulska formulo CH_2O ali H_2CO .

Molekulska masa je 30.026 g/mol.

(PubChem release 2021.10.14)

Pri sobni temperaturi je formaldehid brezbarven, vnetljiv plin, ki ima izrazit oster vonj.

IUPAC ime: formaldehide

(Lexichem TK 2.7.0 (PubChem, objava 14. 10. 2021))

XLogP3-AA = 1.2

(XLogP3 3.0 (PubChem, objava 14. 10. 2021))

Točna masa = 30.010564683 g/mol

(PubChem 2.2 (PubChem, objava 14. 10. 2021))

Vrelišče pri $-19.5\text{ }^\circ\text{C}$

Tališče pri $-92\text{ }^\circ\text{C}$

Plamenišče pri $85\text{ }^\circ\text{C}$ kot formaldehid

Topnost v vodi pri $25\text{ }^\circ\text{C}$, 4.00×10^5 mg/L pri $20\text{ }^\circ\text{C}$

Topen v etanolu in kloroformu, meša se z etrom, acetonom in benzenom.

Relativna gostota (voda = 1): 0.8

Relativna gostota plina 1.04

Relativna gostota hlapov (zrak = 1): 1.03 do 1.08

Parni tlak: 3.890 mm Hg pri $25\text{ }^\circ\text{C}$, 100% formaldehid

0.2 kPa pri $20\text{ }^\circ\text{C}$

Konstanta Henryjevega zakona = $3,37 \times 10^{-7}$ atm-cu m/mol pri 25 °C

Stabilnost in rok uporabnosti: ko stoji, predvsem na mrazu, lahko postane moten, pri zelo nizkih temperaturah pa nastane ppt trioksimetilena.

Na zraku počasi oksidira v mravljično kislino (40% raztopina)

Formaldehid je stabilen v odsotnosti vode.

Temperatura samovžiga: 430 °C

Viskoznost: 0.1421 cP pri 25 °C

Zgorevalna toplota: 570.7 kJ/mol (plin)

Toplota uparjanja: 23.3 kJ/mol pri 19 °C

pH: 2.8 do 4.0 – formaldehidna raztopina

Površinska napetost: 27.3797 dyn/cm pri 25 °C

Ionizacijski potencial: 10.88 eV

Formalin deluje kot fiksativ na tkivo, kar pomeni, da ga ohranja in preprečuje razgradnjo. Ko se tkivo izpostavi formalinu, pride do kemične reakcije, imenovane formaldehidna reakcija, ki križno povezuje beljakovinske strukture v celicah. Ta postopek ohranja strukturo tkiva, preprečuje razgradnjo celic ter ustavi in prepreči biokemične procese, ki bi sicer povzročili propadanje tkiva. Med tem postopkom se lahko zmanjša prepustnost celičnih membran, kar lahko vpliva na difuzijo molekul skozi celice. Zmanjša sposobnost molekul, da se prosto premikajo skozi tkivo. Vpliva na hitrost prehajanja molekul.

Na konvekcijo pa vpliva tako, da s križnim povezovanjem beljakovinskih struktur lahko zmanjša sposobnost tekočega dela tkiva. Na primer celičnih tekočin, da se prosto giblje. To vpliva na konventni prenos molekul in delcev v teh tekočinah. Te vplivi so odvisno kako formalin vpliva na fizikalne lastnosti tkiva. Najbolj vpliva na elastičnost in optično prosojnost. To pa se spreminja glede na vrsto tkiva.

Formalin se uporablja v postopkih histologije in patologije za ohranjanje tkivnih vzorcev za mikroskopsko analizo. Spremembe v jetrih po absorpciji formalina so sestavljene iz blage ali hude stopnje otekanja. Spremlja ga vakuolizacija protoplazme, spremembe v jedrih in levkocitna infiltracija. Formalin je neposredno ali posredno kemiotaktik za levkocite. Tkiva, ki po injiciranju formalina niso infiltrirana z levkocitit so tista, ki jih je kemikalija tako poškodovala, da je vnetna reakcija nemogoča.

Fiksacija s formalinom je široko uporabljen postopek za ohranjanje tkivnih vzorcev. Lahko pa vodi do poškodbe DNK zaradi aktivnosti zamreženja. Dejavniki, ki bi lahko vplivali na fiksacijo in celovitost DNK so lahko inkubacijski čas, vrsta tkiva, koncentracija formalina, temperatura, pH in viskoznost (PubChem, 2024).

6.4 Vpliv pH

6.4.1 VPLIV Ph NA SOLVATACIJSKO ENERGIJO MM IN JODIKSANOLA

Solvatokromna barvila kažejo absorpcijske pasove v vidnem območju. V zadnjih letih se ta barvila uporabljajo kot sonde za merilo polarnosti medija. Topila igrajo tako pomembno

vlogo v fizikalnih in kemijskih procesih ter lahko določijo spremembo položaja, intenzivnosti in oblike absorpcijskih pasov pri spreminjanju energijske razlike med tlemi in vzbujenem stanju kromoforja. Konstante kislosti (pKa) so pomemben parameter, ki označuje stopnjo ionizacije molekul v raztopini pri različnih vrednostih pH. Veliko fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti naravnih in sintetičnih spojin urejajo bazične oziroma kisle lastnosti (Hemdan, 2023).

6.4.2 Ph ZUNAJCELIČNE IN ZNOTRAJCELIČNE TEKOČINE PRI ŽIVIH ORGANIZMIH

Kislina je snov, ki disocira v vodi in je dajalec H^+ ionov, baza pa je prejemnik H^+ ionov. Puferska raztopina je kombinacija šibke kisline in konjugirane baze. Ta funkcionira tako, da zmanjša spremembe v pH do katerih bi prišlo ob dodajanju močne kisline ali baze v sistem. Pufri imajo sposobnost sprejemanja protonov oziroma H^+ ionov, če dodajamo kislino, in oddajanja protonov, če dodamo bazo. Tako uravnavajo kislost in bazičnost raztopin. Organizem pa ima zunajcelične in znotrajcelične pufre (Leković, 2022).

Najpomembnejši zunajcelični pufer je sistem ogljikova kislina/bikarbonat oziroma tako imenovan bikarbonatni pufer. pH tega puferskega sistema določa Henderson – Hasselbalchova enačba. Ta povezuje pH, HCO_3^- in H_2CO_3 .

$$pH = \frac{pK + \log_{10} [HCO_3^-]}{H_2CO_3}$$

K – disociacijska konstanta

$$pK = \log_{10} K$$

Razvidno je, da je H^+ v telesnih tekočinah odvisna od razmerja med koncentracijo baze in kisline. Bikarbonatni pufer ima pK 1.6.

Lahko pa uporabimo tudi naslednjo enačbo, saj je večina ogljikove kisline v obliki raztopljenega CO_2 .

$$\text{pH} = \frac{6,1 + \log_{10}[\text{HCO}_3^-]}{0,225 \text{ PaCO}_2}$$

0,225 = topnosti koeficient CO₂ v krvi (ml/kPa)

[HCO₃⁻] = koncentracija bikarbonata v krvi, normalno znaša 24mmol/L

PaCO₂ = delni tlak CO₂ v arterijski krvi, ki je normalno 5,3 kPa

Iz tega po enačbi dobimo normalen pH arterijske krvi, kar je 7,4. Torej pH krvi določata dve determinanti, in sicer koncentracija bikarbonata in delni tlak CO₂ v krvi. Plazemski bikarbonat predstavlja alkalno rezervo krvi. V normalnih pogojih so vrednosti pH krvne plazme med 7,36 in 7,44. Mehanizmi, ki omogočajo ozko homeostazo koncentracije H⁺ ionov so pufranje, regulacija izločanja H⁺ in regeneracija bikarbonata (ledvice), ter regulacija koncentracije CO₂ z alveolarno ventilacijo. Bikarbonatni pufer je učinkovit vendar šibek pufer. Uravnavajo ga pljuča, ledvice in jetra. To so odprti puferski sistemi.

Najpomembnejši znotrajcelični pufri pa so beljakovinski in fosfatni ter bikarbonatni pufer. V krvi je najpomembnejši pufer hemoglobin. Nahaja se v eritrocitih, te pa so odgovorni za 85% puferske kapacitete polne krvi (Leković, 2022).

Ko pa se v raztopini pojavi več različnih pufrov, pride do medsebojnega pufranja. V praksi se najbolj uporabljajo podatki vezani na bikarbonatni puferski sistem.

6.5 Anizotropija

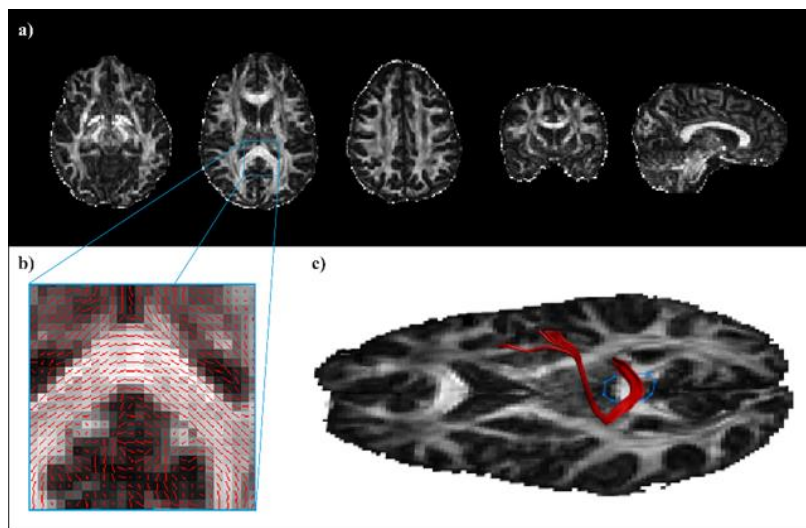
Anizotropija je pojav, ko ima neka struktura v različnih smereh različne lastnosti.

V 19.stoletju so bili prepričani, da je za delovanje možganov pomembno povezovanje informacij iz različnih predelov, pri čemer imajo ključno vlogo asociacijske povezave vlaken bele možganovine (BM). Razmah difuzijskega magnetnoresonančnega (MR) slikanja, na osnovi katerega za sklepanje o usmerjenosti živčnih vlaken izkoriščamo termično gibanje molekul vode, je omogočil neinvazivno proučevanje strukture možganov živih preiskovancev.

Difuzija molekul vode je odraz mikrostrukture tkiva. Molekul vode se v raztopinah naključno gibljejo, odmik molekule od začetnega položaja pa je odvisen od časa opazovanja in difuzijskega koeficienta. V človeškem telesu pri stalni telesni temperaturi, celične membrane omejujejo difuzijo. Omejitev difuzije se odraža v višji jakosti signala. Ko pa skušamo opisati urejenost tkiv, nam samo informacija o difuzivnosti ne zadošča. Zato si pomagamo z difuzijskim tenzorjem. Tega si lahko predstavljamo kot elipsoid, pri katerem podaljšana os kaže prevladujočo smer difuzije molekul vode.

To MR slikanje imenujemo slikanje difuzijskih tenzorjev. Torej, če gradient usmerimo v različne smeri v prostoru, pridobimo informacijo o difuziji molekul vode v posamezni smeri. Nato rekonstruiramo difuzijski tenzor in sklepamo o usmerjenosti vlaken BM (Pršlja, 2018).

Difuzija je izotropna, ko je enakomerna v vse smeri. Lahko pa je anizotropna, kadar je difuzija v določene smeri omejena. Pogosto tudi uporabljamo mero frakcijske anizotropije (FA), ki ocenjuje razmerje med prevladujočo usmerjenostjo difuzije in velikostjo celotne difuzije. Indeks frakcijske anizotropije se giblje med vrednostma 0. takrat je difuzija izotropna in 1, ko je usmerjena izključno vzdolž ene osi.



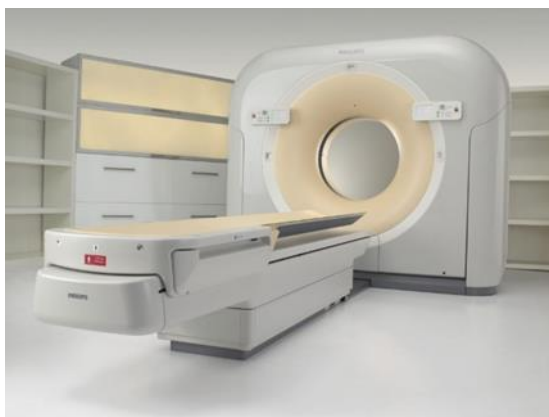
Slika 30: a) Mape frakcijske anizotropije v človeških možganih. b) prevladujoča usmerjenost difuzijskega tenzorja v posameznih vokslih c) Primer deterministične traktografije

6.6 CT – Računalniška tomografija

Medicinsko slikanje je sestavni del medicinskih postopkov, uporablja se za zgodnje odkrivanje, diagnosticiranje, spremljanje in oceno zdravljenja različnih zdravstvenih stanj na neinvaziven način (Berlot, 2023).

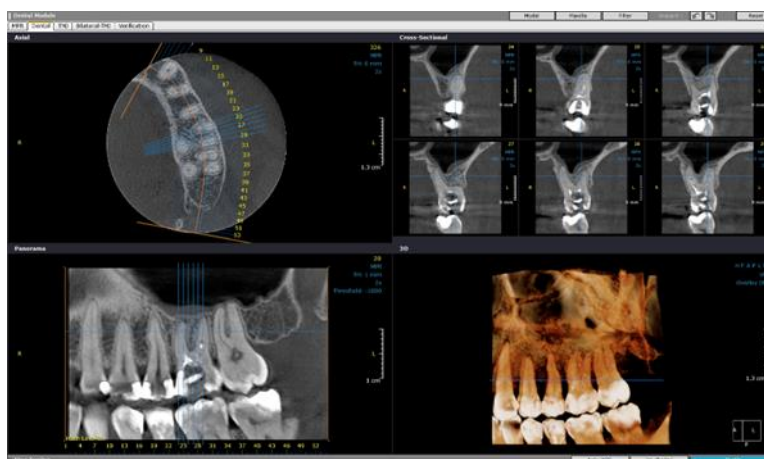
Računalniška tomografija (CT) je slikovna tehnika v radiologiji, ki zajema podatke s pomočjo rentgenske cevi in detektorjev, ki se vrtijo okoli slikanega predela. CT uporablja računalnik za procesiranje informacij, ki jih je prejel detektor. CT tehnologija omogoča različne tehnike slikanja (Domingues, 2020).

CT slikanje deluje tako, da izkorišča lastnost, da različni deli telesa absorbirajo rentgenske žarke v različnem obsegu. Razlika v absorpciji med posameznimi organi omogoča natančen prikaz in razlikovanje med posameznimi organi. Intenzivnost slikovnih pik na slikah CT predstavlja linearni koeficient slabljenja rentgenskih žarkov posnetih materialov po linearnem skaliranju koeficientov v količino, znano kot števila CT, ki se posreduje v Hounsfieldovih enotah. Slabljenja rentgenskih žarkov je predvsem funkcija rentgenske energije in sestava materiala, ki se slika (Berlot, 2023).



Slika 31: CT naprava

CBCT je nova tehnologija. Slikanje se izvede z uporabo vrtljivega portala, na katerega sta pritrjena vir rentgenskih žarkov in detektor. Divergentni vir ionizirajočega sevanja je usmerjen skozi sredino območja zanimanja na območni detektor rentgenskih žarkov na nasprotni strani. Vir rentgenskih žarkov in detektor se vrtita okoli fiksne rotacijske točke v središču interesne regije. Ta postopek pa se razlikuje od tradicionalnega CT, ki uporablja pahljačasti rentgenski žarek v vijačnem napredovanju za pridobitev posameznih rezin slike in nato zloži rezine, da dobi 3D predstavitev. Vsaka rezina pa zahteva ločeno skeniranje in ločeno 2D rekonstrukcijo (Berlot, 2023).



Slika 32: CBCT slikanje

Ena izmed njih je na primer dvospektralno CT slikanje. Temelji na zajemu podatkov z dvema različnima energijama (Plečko, 2022). S tem dobimo dve seriji slik z različnimi stopnjami atenuacije (zmanjšanje, razredčitev) istih struktur. Omogoča nam združitev obeh spektrov in s tem izboljššan prikaz anatomskih struktur in možnost odpravljanja artefaktov. Poznamo različne načine dvoenergijskega CT slikanja (DECT). Vsem je enako, da se uporablja kombinacija napetosti 80 kV in 140 kV.

Prvi način je uporaba ene rentgenske cevi z dvema različnima energijama. Najprej uporabimo nižjo napetost in posnamemo serijo slik. Nato pa uporabimo višjo serijo in

posnamemo serijo slik. Drugi način je hiter preklop napetosti med enkratnim zajemanjem podatkov. Tretji način je uporaba razdeljevalnega filtra. Četrty način pa je uporaba naprave, ki ima dve rentgenski cevi in dva detektorja. Peti način pa je uporaba dvoplastnih detektorjev. Zgornja plast zazna fotone nižjih energij, spodnja plast pa zazna fotone višjih energij (Berlot, 2023).

7 METODE DE LA

PRIPRAVA INJEKTATA

Naredili dva različna poizkusa, in sicer zanimala nas je razlika v difuziji v svežem zamrznjenem in odmrznjenem tkivu piščanjčjih prsi in piščanjčja prsa namočena v formalinu. Za to smo pripravili najprej injektat. Injektat je zmes metilenskega modrila, jodiksanaola in destilirane vode. V epruveto smo dali 12 ml 1% metilenskega modrila, 2 ml 10% jodiksanaola in 12 ml destilirane vode. Na koncu smo dobili 26 ml 0,5% zmesi. Zmes v epruveti smo dali v vortex, da se vse snovi dobro premešajo.

INJICIRANJE

Prsa namočena v formalinu pa smo iz posode vzeli z kovinski pinceto. Iz zmesi v epruveti smo nato z injekcijo vzeli 0,5 ml zmesi in injecirali v vsako pišančjo prso.



1.



2.



3.



4.



5.



6.



7.



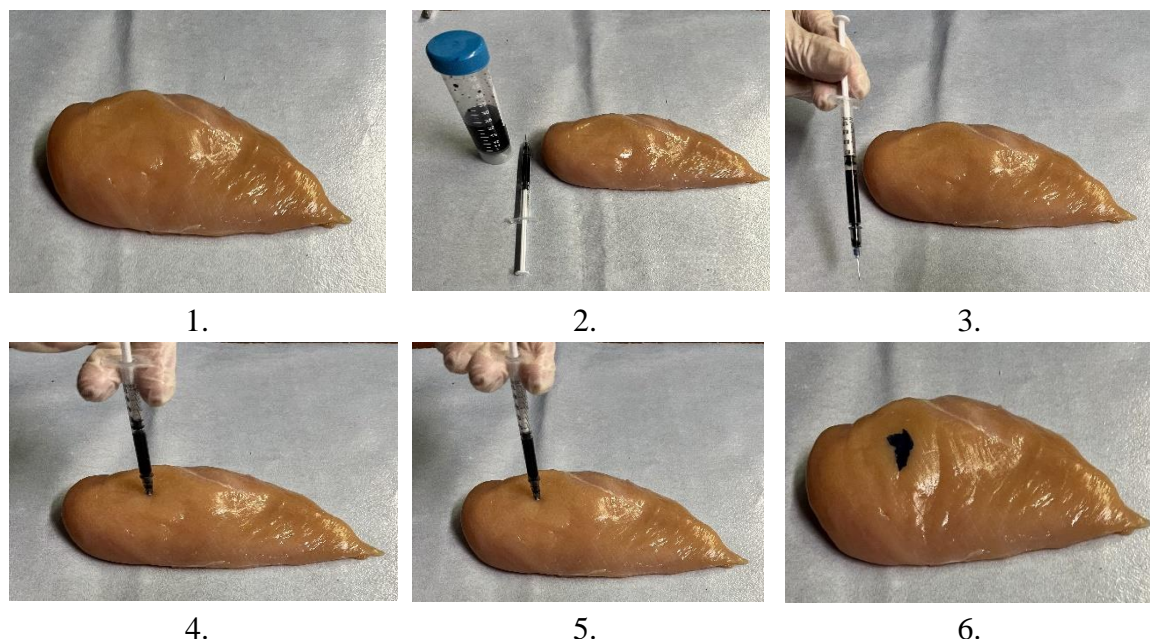
8.



9.

Slika 33: Postopek vnosa injektata v formalinsko prso

Sveža piščančja prsa smo vzeli iz vreče ter jih splahnili pod destilirano vodo, popivnali z papirnati brisačkami, nato pa jih dali na pult in injicirali 0,5 ml injektata.



Slika 34: Postopek vnosa injektata v sveže prso

Injecirali smo v najdebelejši del piščančjega prsa. Nato pa smo opazovali, kako se zmes porazdeli oziroma širi po tkivu. Pozorni smo bili tudi na to ali je zmes difundirala skozi in na drugi strani tkiva prikapljala ven. Nekje je zmes na vrhu malo prikapljala ven, nekje je pronicala skozi, v nekaterih ponovitvah pa se je zmes porazdelila znotraj tkiva.

Tabela 1: Difundiranje injektata skozi prsa v formalinu

Prsa v formalinu	Difundiralo skozi	Ni difundiralo skozi
1.	X	
2.	X	
3.		X
4.	X	
5.	X	
6.	X	
7.		X
8.	X	

Na tabeli 1 je prikazano difundiranje injektata skozi piščančja prsa hranjena v formalinu. V večini ponovitev je injektat pronical skozi prsa, to so ponovitve 1, 2, 4, 5, 6, 8. V dveh

primerih pa injektat ni pronical skozi, to je v primeru 3 in 7. V tretji ponovitvi smo injecirali preblizu roba piščančje prse, zato je večino injektata steklo mimo. V sedmem primeru je pronicalo skozi vendar v zelo majhni količini.

Tabela 2: Difundiranje injektata skozi sveže odmrznjena prsa

Sveža prsa	Difundiralo skozi	Ni difundiralo skozi
1.		X
2.		X
3.		X
4.		X
5.		X
6.		X
7.		X
8.		X

Na tabeli 2 je prikazano difundiranje injektata skozi sveža piščančja prsa. Pri vseh osmih ponovitvah injektat ni pronical skozi, vendar se je razširil po tkivu prs.

Imeli smo dva vzroca piščančjih prsi, katera primerjamo med seboj.

1. Sveža piščančja prsa, ki so bila zamrznjena in nazaj odmrznjena na sobno temperaturo
2. Piščančja prsa, ki so bila 1 mesec namočena v 4% formalinu (te nimajo žive barve, kot jo imajo sveža prsa, so bele barve)

Za vsaki vzorec smo naredili 8 ponovitev. Nato smo vsako piščančjo prso oštevilčili in jih zložili v škatlo, tako, da se noben vzorec ni prekrival.



1.



2.

Slika 35: Skladiščenje oštevilčenih prsi

V škatlo smo dodali še marker, po katerem smo se orientirali in je bil primer za vsa ostala prsa (da smo lažje opazili razliko). Odnegli smo jih na CT.



Slika 36: CT slikanje

Najprej smo naredili topogram CT. Ta se nanaša na vrsto slike, ki nastane med računalniško tomografijo (CT). Gre za osnovno sliko, ki pomaga radiologu načrtovati dejanski pregled s tem, da ponuja pregled območja, ki ga bo pregledal. Uporabna je za določitev pravilnega položaja in obsega za CT. V tem času se nastavi tudi napetost in tok. Nato 3D piksel določi vrednost gostote. Voda ima vrednost 0, -1000 ima zrak, 6000 pa ima kovina. Po tem postopku, je sledila venska faza, ki je trajala 70 sekund. Venska faza CT se nanaša na fazo slikanja med postopkom računalniške tomografije, ko se uporablja kontrastno sredstvo, ki kroži skozi veno. Ta faza omogoča boljše prikazovanje ožilja.

Na računalniških slikah smo opazili, da imajo prsa, ki so namočena v formalin ozko, trakasto razporeditev kontrastnega sredstva, za razliko od svežih prs, ki imajo debelo trakasto razporeditev kontrastnega sredstva. Po tem lahko sklepamo, da so sveža prsa bolj anizotropna.

Po CT-ju smo prsa odnesli nazaj v laboratorij, kjer smo vsako posebjaj z rokavicami dali na desko in z nožem prerezali najprej prečno na tkivo. Izmerili smo dolžino in višino

difundiranja skozi tkivo. Nato smo še pravokotno na to prerezali, da smo izmerili debelino razporeditve kontrastnega sredstva. To smo izmerili za vsako prso posebj.



Slika 37: Meritve z geotrikotnikom

Tabela 3: Meritve distribucije injektata v prsah v formalinu

Prsa v formalinu	dolžina [mm]	višina [mm]	širina [mm]
1.	35	3	35
2.	30	5	1
3.	35	4	38
4.	25	3	20
5.	30	2	24
6.	25	2	17
7.	15	4	24
8.	20	3	33

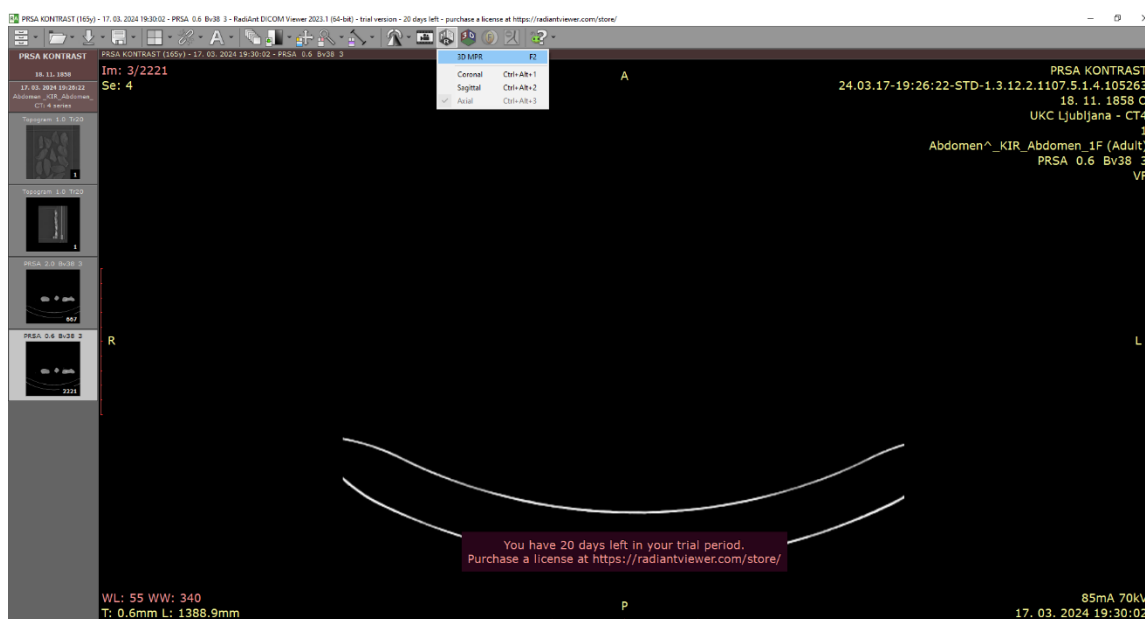
Na tabeli 3so meritve razporeditve injektata v piščančjih prsah hranjenih v formalinu.

Tabela 4: Ročne meritve svežih prs

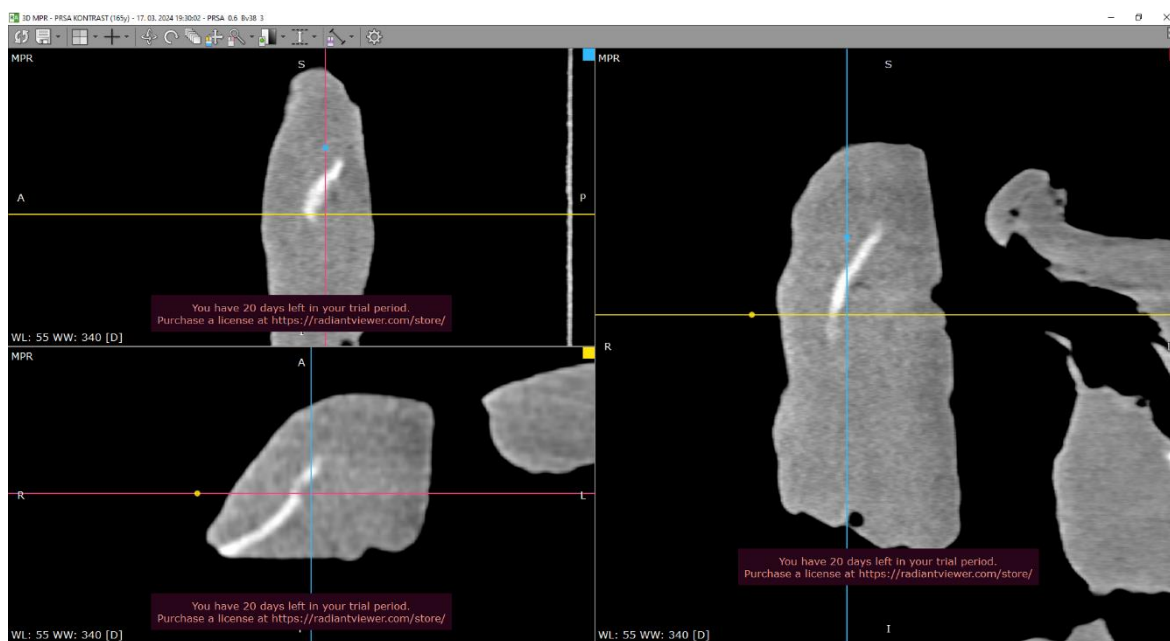
Sveža prsa	dolžina [mm]	višina [mm]	širina [mm]
1.	40	3	21
2.	20	8	19
3.	55	6	17
4.	35	10	10
5.	40	10	15
6.	20	10	15
7.	40	10	20
8.	25	8	20

Na tabeli 4 so meritve razporeditve injektata v svežih piščančjih prsih.

Potem smo izvedli meritve še iz CT slik v programu RadiAnt. Izmerili smo višino, dolžino in širino. Za meritve smo uporabili sliko, ki je bila najbolj natančna (slika verzija 0,6). Okvir si moramo primerno prilagoditi, da lahko najboljše izmerimo. Uporabimo funkcijo 3D MPR, ki nam omogoča večplastni pregled medicinskih slik v treh dimenzijah (navpično, vodoravno in prečno) ter prilagaja položaj in debelino rezin.



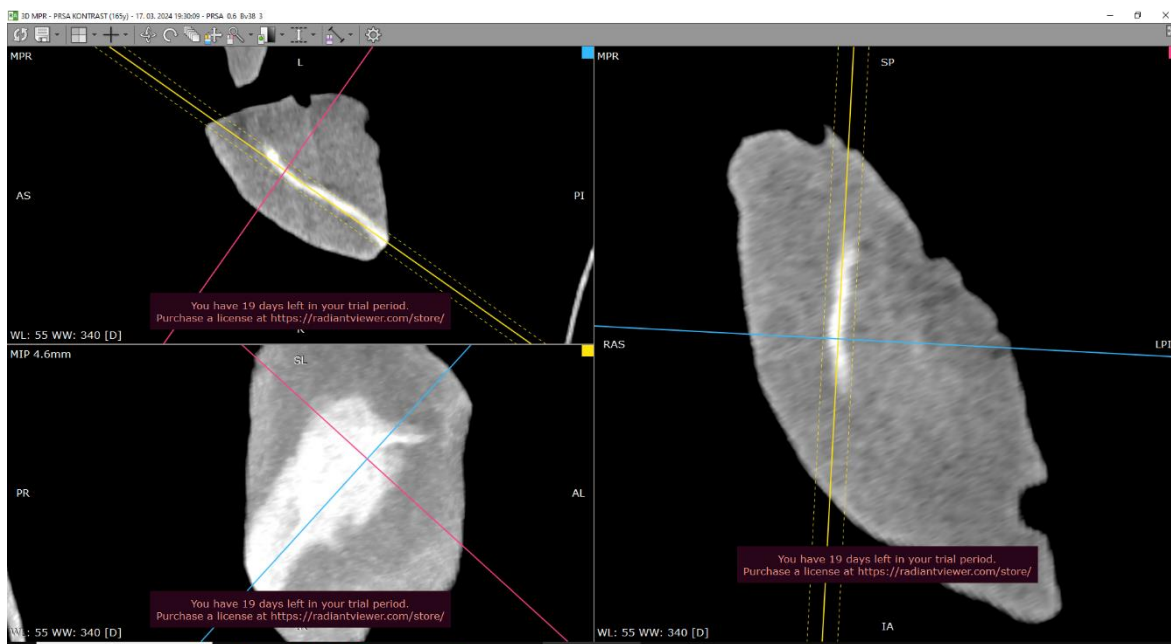
Slika 38: Začetna stran



Slika 39: 3D MRP okno

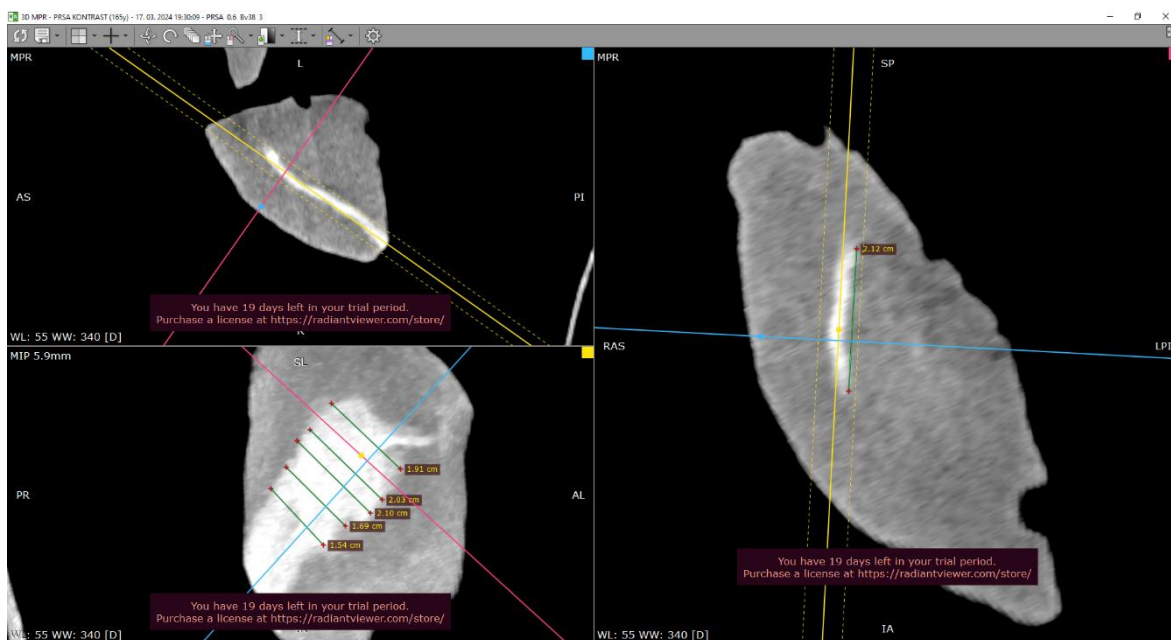
Odpre se nam novo okno, ki je razdeljeno na tri dele. Za meritev izberemo prvo prso, ki je označeno z žebličkom. Glede na to prso se potem orientiramo za kasnejše meritve. Da povečamo in premaknemo uporabljamo desno in levo tipko, tako kakor je označeno v levem zgornjem kotu.

Prso smo postavili v ortogonalno ravnino in longitudinalno ravnino. Na zgornji levi sliki poravnamo roza črto vzporedno kontrastu. Kontrast se razširja različno za to uporabimo srednjo tipko. Ko poravnamo vzporedno uporabimo funkcijo MIP (Maximum Intensity Projection). To je tehnika, ki nam omogoča tridimenzionalno vizualizacijo, ki nam da boljši pogled na strukturo širjenja našega kontrasta. Črtkane črte moramo poravnati vzporedno z kontrastom.



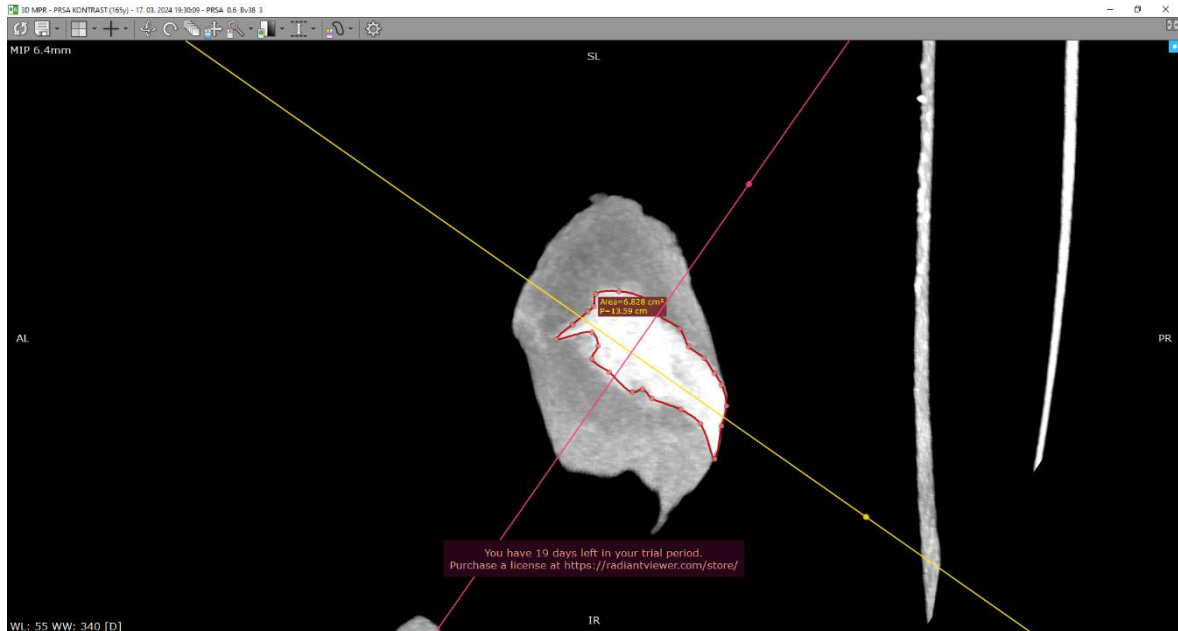
Slika 40: MIP nastavev vzporedno s kontrastom

Ko si pravilno nastavimo vse funkcije in imamo najboljši pogled nad kontrastom, lahko pričnemo z mirjenjem. Za mirjenje uporabimo merilo. Izračunati moramo povprečno meritev, saj se je kontrast širil različno. Izvedli smo pet meritev za dolžino in izračunali povprečje. Tako smo naredili tudi za višino in širino.



Slika 41: Meritev z ravnilom

Izmerili smo tudi ploščino (oris). To smo naredili s funkcijo zaprtega mnogokotnika («closed polygon»), ki nam omogoča izmeriti površino in obseg.



Slika 42: Meritev ploščine s funkcijo zaprtega mnogokotnika

Vse meritve smo zapisali v tabelo in izračunali indeks elipsičnosti CT ter pripravili statistično analizo.

8 SKLEPI

Ugotovili smo, da je širjenje injektata vzdolžno in v eni smeri prečno po mišičnem tkivu podobno med fiksirano in sveže odmrznjeno mišico. Nasprotno smo ugotovili, da je širjenje injektata v eni smeri prečno na mišico v debelino značilno večje pri sveže odmrznjeni mišici kot v formalinu fiksirani mišici. Naše CT meritve se ne razlikujejo značilno od meritev z ravnilom. To potrди, da je merjenje na CT dobra nadomestitev ročnih meritev. CT je lahko dobra nadomestitev v medicini, predvsem ko se merijo enote, potencialno toksične občutljive, ki bi jih lahko pri ročni manipulaciji poškodovali. Poleg tega vzorca na CT meritvah ne uničimo in/ali prerežemo, tako lahko meritev istega vzorca ponavljamo. S tem tudi pripomoremo k večji zanesljivosti meritev. Pri naših meritvah smo ugotovili, da je indeks elipsičnosti (vzdolžno/prečno) večji od 1, kar pomeni, da je širjenje injektata v mišici anizotropno, torej odvisno od poteka mišičnih vlaken v mišici. Anizotropija je pojav, ko ima mišično vlakno v različnih smereh različne lastnosti. To nakazuje, da je integriteta mišice v smeri vzdolžno manjša kot v prečni smeri. Mišica je sestavljena iz snopov mišičnih vlaken, katera so sestavljena iz tankih nitk, imenovanih miofibrili. Te vsebujejo proteine, najpomembnejša sta aktin in miozin, ki omogočata kontrakcijo mišice.

Raziskave v medicini, ki preučujejo širjenje injektatov na fiksiranih tkivih verjetno sistematično podcenjujejo širjenje injektatov na tkivih pri pacientih. Zato posledično lahko podcenimo verjetnost in/ali možnost neželenih učinkov na določenih tkivih zaradi širjenja posameznih snovi. Zaradi nedokazanega dosega določene želene tarče pri uporabi fiksiranih tkiv, je mogoče tudi, da raziskave ne bi pokazale učinkovitosti določene tehnike vbrizgavanja injektatov v tkiva.

V raziskavi smo uporabili kurja prsa, ker smo želeli, da bi bile med tkivi čim manjše interindividualne razlike. Pri človeških tkivih iz darovanih teles so te razlike velike, kar bi lahko povzročalo velik problem.

Tabela 5: CT in ročne meritve svežih prsi

sveža prsa	vzdolžno CT [mm]	debelina CT [mm]	prečno CT [mm]	vzdolžno [mm]	debelina [mm]	prečno [mm]
1.	44,50	5,30	42,20	40,00	3,00	21,00
2.	19,90	7,20	17,30	20,00	8,00	19,00
3.	42,90	5,50	19,80	55,00	6,00	17,00
4.	39,10	7,70	15,30	40,00	10,00	15,00
5.	39,40	8,60	15,90	20,00	10,00	15,00
6.	39,80	8,70	20,90	40,00	10,00	20,00
7.	33,00	8,00	16,80	25,00	8,00	20,00
8.	31,20	9,40	11,20	35,00	10,00	10,00

Do največjega odstopanja med CT in ročnimi meritvami je prišlo pri tretjem, petem in sedmem prsu. Ostale meritve se razlikujejo le za milimetre.

Tabela 6: indeks elipsičnosti CT

indeks elipsičnosti CT
1,05450237
1,150289017
2,166666667
2,555555556
2,477987421
1,90430622
1,964285714
2,785714286

Indeks elipsičnosti je numerična mera oblike elipse, ki je razmerje med polosi elipse. Izračuna se kot razmerje med daljšo polosjo in krajšo polosjo.

Tabela 7: Izračun povprečja in standardni odklon svežih prsi

Povprečje	Standardni odklon	sveža prsa
34,8	10,27	vzdolžno CT
7,55	1,231	debelina CT
19,9	9,335	prečno CT
34,4	8,479	vzdolžno ročno
8,13	1,084	debelina ročno
17,1	13,02	prečno ročno

Tabela 8: CT in ročne meritve fiksiranih prs

Fiksirana prsa	vzdolžno CT [mm]	debelina CT [mm]	prečno CT [mm]	vzdolžno [mm]	debelina [mm]	prečno [mm]
1.	45,00	3,00	18,40	35,00	3	35,00
2.	43,70	2,00	21,80	30,00	5	17,00
3.	42,60	4,00	40,80	38,00	4	35,00
4.	45,30	5,70	18,30	25,00	3	20,00
5.	34,30	3,01	28,20	30,00	2	24,00
6.	26,30	4,30	14,30	25,00	2	17,00
7.	27,90	3,90	19,10	24,00	4	15,00
8.	34,30	3,60	19,90	33,00	3	20,00

Do največjega odstopanja med CT in ročnimi meritvami je prišlo pri prvem in četrtem prsu. Pri ostalih so meritve podobne.

Tabela 9: Izračunan indeks elipsičnosti CT meritev pri fiksiranih prsah

Indeks elipsičnosti CT
2,445652174
2,004587156
1,044117647
2,475409836
1,216312057
1,839160839
1,460732984
1,72361809

Tabela 10: Izračunano povprečje in standardni odklon fiksiranih prsi

Povprečje	Standardni odklon	fiksirana prsa
34,1	7,742	vzdolžno CT
3,69	1,093	debelina CT
22,6	8,348	prečno CT
30,0	6,205	vzdolžno ročno
3,25	2,622	debelina ročno
20,9	9,069	prečno ročno

8 PREDLOGI NADALJNJEGA DELA

Da bi potrdili učinkovitost distribucije zmesi injektata metilenskega modrila in jodiksanela, bi bilo potrebno opraviti dodatne raziskave v laboratoriju tudi na drugih predstavnikih. V nadaljevanju je na kratko povzeto in naštetu nadaljno laboratorijsko delo, s katerim bi lahko natančneje določili učinkovitost.

Za raziskavo bi razširili nabor različnih barvil in bi uporabili tudi druge zmesi injektatov z drugimi kontrastnimi sredstvi, ki delujejo na podoben princip. Poleg tega bi morala biti kontrastna sredstva občutljiva na CT slikanje oziroma računalniško tomografijo.

Raziskavo bi lahko tudi razširili na druge predstavnike. Tako bi namesto ptičev izbrali sesalce, pri katerih bi preskusili distribucijo na prečno progastem mišičnem tkivu. Kot primer bi lahko uporabili govedo ali prašiče. S tem bi primerjali distribucijo v različnih tkivih.

Da bi bili izidi raziskave zanesljivejši, bi morali uvesti večje število preiskovancev. To bi pripomoglo k posplošitvi rezultatov.

Za izboljšanje raziskave bi lahko poleg različnih tkiv uporabili enako vrsto tkiva, le da bi tkiva hranili v različnih snoveh in pod različnimi pogoji. Na primer piščančja prsa bi lahko hranili samo v hladilniku na običajni temperaturi 4 °C ali na sobni temperaturi okoli 21 °C. Problemi, ki bi se lahko pojavljali pri raziskavi, bi lahko bili, da se kontrastna sredstva ne bi med seboj mešala, ne bi se distribuirala po tkivu ali pa ne bi bila občutljiva na CT slikanje.

V nadaljevanju so mišljene nadaljne statistične preiskave, ki bodo potrdile.

9 LITERATURA

- BERLOT R., (2023), *Difuzijsko magnetnoresonančno slikanje*, Spletna revija za znanstvenike, strokovnjake in nevroznanstvene navdušence. Dostopno na naslovu: https://www.sinapsa.org/eSinapsa/stevilke/last/168/difuzijsko_magnetnoresonančno_slikanje
- BERRY, D. B., REGNER, B., GALINSKY, V., WARD, S. R., & FRANK, L. R. (2018). Relationships between tissue microstructure and the diffusion tensor in simulated skeletal muscle. *Magnetic resonance in medicine*, 80(1), 317-329. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mrm.269>
- BINZ, A., & RÄTH, C. (1928). *Über biochemische Eigenschaften von Derivaten des Pyridins und Chinolins*. *Biochem. Ztschr*, 203, 218-222.
- BRUCE L. MCCLENNAN MD: *Intravascular Contrast Media Ionic Versus Nonionic: Current Status*, (1991), 29, 437-454. Dosegljivo na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0033838922027117>
- CHAMLEY-CAMPBELL, J. U. L. I. E., CAMPBELL, G. R., & ROSS, R. U. S. S. E. L. L. (1979). *The smooth muscle cell in culture*. *Physiological reviews*, 59(1), 1-61., <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.1979.59.1.1>
- CHRISTENSEN, J. D., MEYER, L. T., HURWITZ, L. M., & BOLL, D. T. (2011). *Effects of iopamidol-370 versus iodixanol-320 on coronary contrast, branch depiction, and heart rate variability in dual-source coronary MDCT angiography*. *American journal of roentgenology*, 197(3), W445-W451.
- CWALINSKI, T., POLOM, W., MARANO, L., ROVIELLO, G., D'ANGELO, A., CWALINA, N., ... & POLOM, K. (2020). *Methylene blue—current knowledge, fluorescent properties, and its future use*. *Journal of clinical medicine*, 9(11), 3538. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147796/>
- DOMINGUES, I., PEREIRA, G., MARTINS, P., DUARTE, H., SANTOS, J., & ABREU, P. H. (2020). *Using deep learning techniques in medical imaging: a systematic review of applications on CT and PET*. *Artificial Intelligence Review*, 53, 4093-4160. Dostopno na naslovu: <https://www.cse.unr.edu/~bebis/CS791/Fall2023/Papers/OtherModalities/2020%20-%20Using%20deep%20learning%20techniques%20in%20medical%20imaging%20a%20systematic%20review%20of%20applications%20on%20CT%20and%20PET.pdf>

- DOVGAN, B. (2020). *Krioprezervacija humanih mezenhimskih matičnih celic in tkiva popkavnice v kombinaciji krioprotektanta trehaloze in reverzibilne elektroporacije: doktorska disertacija* (Doctoral dissertation, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta). Dostopno na naslovu: https://lbk.fe.uni-lj.si/pdfs/phd_bd.pdf
- ERIC A. BETTERTON, MICHAEL R. HOFFMANN, (1988), Henry's law constants of some environmentally important aldehydes, 22, 12, 1415–1418. Dostopno na naslovu: <https://doi.org/10.1021/es00177a004>
- FABER, Bruna. UNIVERSITY OF ZAGREB. FACULTY OF SCIENCE. DEPARTMENT OF BIOLOGY. *Mišično pamčenje*. (2023). *PhD Thesis*. Dostopno na naslovu: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:085972>
- FISCHER, M. H. (1905). *The toxic effects of formaldehyde and formalin. The Journal of experimental medicine*, 6(4-6), 487. Dostopno na naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2124506/pdf/487.pdf> - 25.01.2024
- GERBERICH HR, SEAMAN GC; (1990-2014), *Formaldeyde. Kirk-Othmerjeva enciklopedija kemijske tehnologije*. Dostopno na naslovu: <http://dx.doi.org/10.1002/0471238961.0615181307051802.a01.pub2>
- GROVER, A. K., & DANIELS, E. E. (Eds.). (2012). *Calcium and contractility: smooth muscle* (Vol. 5). Springer Science & Business Media.
- HASCHEK, E., & LINDENTHAL, O. T. (1896). *A contribution to the practical use of the photography according to Röntgen. Wien Klin Wochenschr*, 9, 63.
- HANS, M., WARRIC IN JAMES A. SPUDICH (1987) *Myosin structure and function in cell motility* (dostop 1.1.2024) Dostopno na naslovu: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cb.03.110187.002115?journalCode=cellbio.1>
- HAYNES, WM (ur.). CRC priročnik za kemijo in fiziko. 95. izdaja. CRC Press LLC, Boca Raton: FL 2014-2015, str. 3-278
- HEGLUND, I. F., MICHELET, A. A., BLAZAK, W. F., FURUHAMA, K., & HOLTZ, E. (1995). *Preclinical pharmacokinetics and general toxicology of iodixanol. Acta radiologica. Supplementum*, 399, 69–82. Dostopno na naslovu: <https://doi.org/10.1177/0284185195036s39909>

- HEEMSKERK, A. M., & DAMON, B. M. (2007). *Diffusion Tensor MRI Assessment of Skeletal Muscle Architecture. Current medical imaging reviews*, 3(3), 152–160. <https://doi.org/10.2174/157340507781386988>
- HEMDAN, S.S. *The Shift in the Behavior of Methylene Blue Toward the Sensitivity of Medium: Solvatochromism, Solvent Parameters, Regression Analysis and Investigation of Cosolvent on the Acidity Constants. J Fluoresc* 33, 2489–2502 (2023). Dostopno na naslovu: <file:///C:/Users/Laura/Downloads/s10895-023-03234-y.pdf>
- HILL, A. V. (1948). *On the time required for diffusion and its relation to processes in muscle. Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 135(881), 446–453. Dostopno na naslovu: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspb.1948.0022>
- HOCHACHKA, P. W. (2003). *Intracellular convection, homeostasis and metabolic regulation. Journal of experimental biology*, 206(12), 2001–2009. Dostopno na naslovu: <https://journals.biologists.com/jeb/article/206/12/2001/9253/Intracellular-convection-homeostasis-and-metabolic>
- JOHN A. PICKRELL, BRIAN V. MOKLER, LARRY C. GRIFFIS, CHARLES H. HOBBS, AMBIKA. BATHIJA, (1983), *Formaldehyde release rate coefficients from selected consumer products*, 17, 12, 753–757. Dostopno na naslovu: <https://doi.org/10.1021/es00118a012>
- KOBE, V., A. DEKLEVA, I.F. LENART, A. ŠIRCA, M. VELEPIČ, ANATOMIJA, *Skripta za študente medicine I.del*, (1990), stran 140
- KORON, M., UNIVERZA V LJUBLJANI, FAKULTETA ZA ŠPORT: *Razvoj specifične vzdržljivosti v rokometu*, (2009). Dostopno na naslovu: <https://www.fsp.uni-lj.si/COBISS/Diplome/Diploma22055790KoronMartin.pdf>
- KOSMAČ, D. (2017). *Omejena difuzija v poroznih snoveh* [Diplomsko delo]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. Dostopno na naslovu: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=97779>
- KHAN, I., SAEED, K., ZEKKER, I., ZHANG, B., HENDI, A. H., AHMAD, A., ... & KHAN, I. (2022). *Review on methylene blue: Its properties, uses, toxicity and photodegradation. Water*, 14(2), 242. <https://doi.org/10.3390/w14020242>

- LEKOVIĆ, D., & GRZYNYUK, A. *motnje kislinsko-baznega ravnovesja in metabolna acidoza. šola anesteziologije, reanimatologije in perioperativne intenzivne medicine deseti modul intenzivna medicina ii*, 19. Dostopno na naslovu: <https://www.szaim.org/wp-content/uploads/2021/03/Modul-10-IM2.pdf#page=19>
- LENASI, H., *Telesna dejavnost in termoregulacija*, (2014). Dostopno na naslovu: https://medrazgl.si/arhiv/mr14_4_02.pdf
- MAK, R. S. P., & LIEBELT, E. L. (2021). *Methylene blue: an antidote for methemoglobinemia and beyond. Pediatric Emergency Care*, 37(9), 474–477. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34463662/>
- MALEKI, A., & NEMATOLLAHI, D. (2009). *An efficient electrochemical method for the synthesis of methylene blue. Electrochemistry communications*, 11(12), 2261–2264. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.09.040>
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2024). *PubChem Compound Summary for CID 3724, Iodixanol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Iodixanol> (dostop 11. 3. 2024)
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2024). *PubChem Compound Summary for CID 712, Formaldehyde*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1301098/>
- NOLOGY INFORMATION (2024). *PubChem Compound Summary for CID 13735, Azure A*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azure-A>.
- NEBAL, I., MUNTASER, S.A., SANAA, G. A., MOHAMMAD, H., (2023) *Gadolinium contrast agents- challenges and opportunities of a multidisciplinary approach: Literature review, European Journal of Radiology Open*. Dostopno na naslovu: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352047723000291>
- NOVAK, A. (2014). *Uporaba izometrične vadbe pri bolnikih s povišanim krvnim tlakom: diplomsko delo*. Pridobljeno po: <http://www.fsp.uni-lj.si/COBISS/Diplome/Diploma22100137NovakAna.pdf>
- O'NEIL, M. J. (ED.). (2013). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. RSC Publishing. Str. 873–874
- PAPADOPOULOS, S., JÜRGENS, K. D., & GROS, G. (2000). *Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction*.

Biophysical. Dostopno na naslovu:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1301098/>

PITTMAN, R. N. (2000). Oxygen supply to contracting skeletal muscle at the microcirculatory level: diffusion vs. convection. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168(4), 593-602. Dostopno na naslovu:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-201x.2000.00710.x>

PLEMENITAŠ A., ŽAKELJ-MAVRIČ M., (2022). *Metaolizem tkiv in organov pri človeku*. Str 216-218

PLUT, Š. (2002). *Anatomija in filozofija človeka: učbenik* . str. 48-52.

PRENTØ, P., (1997), *The effects of freezing, storage, and thawing on cell compartment integrity and ultrastructure*. *Histochemistry* **108**, 543–547. Dostopno na naslovu:

<https://doi.org/10.1007/s004180050195>

PRIEBE H, DUGSTAD H, GACEK M, et al. *Synthesis and Characterization of Iodixanol*. *Acta Radiologica*. 1995;36(399_suppl):21-31. doi:10.1177/0284185195036S39903

PRŠLJA, M. (2018). *Strukturna anizotropija svetlobno občutljivih tekočerkristalnih elastomerov* [Magistrsko delo]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. Dostopno na naslovu: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=106073>

PLEČKO, C. (2022). *Dvospektralno CT slikanje* : diplomsko delo [Diplomsko delo, C. Plečko]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. Dostopno na naslovu:

<https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=140290>

SANGOR, F. I., & AL-GHOUTI, M. A. (2023). *Waste-to-value: Synthesis of nano-aluminum oxide (nano- γ -Al₂O₃) from waste aluminum foils for efficient adsorption of methylene blue dye*. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 8, 100394. Dostopno na naslovu:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15563650.2018.1429615>

SARTORI, R., & SANDRI, M. (2015). *BMPs and the muscle–bone connection*. *Bone*, 80, 37-42. Dostopno na naslovu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26036170/>

SCHIAFFINO, S., & REGGIANI, C. (2011). *Fiber types in mammalian skeletal muscles*. *Physiological reviews*, 91(4), 1447-1531. Dostopno na naslovu: <https://sci-hub.se/https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00031.2010>

- SEN, P. N. (2004). *Diffusion and tissue microstructure*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(44), S5213. Dostopno na naslovu:
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/16/44/018/meta>
- SHADRIN, I. Y., KHODABUKUS, A., & BURSAC, N. (2016). *Striated muscle function, regeneration, and repair*. *Cellular and molecular life sciences*, 73, 4175-4202.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27271751/>
- SHIELS, H. A. (2011). *Design and physiology of the heart| Cardiac Excitation-Contraction Coupling: Routes of Cellular Calcium Flux*. In *Encyclopedia of Fish Physiology/ Encyclopedia of Fish Physiol.* (pp. 1045-1053). Elsevier BV.
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/sarcoplasmic-reticulum>
- SOODAK, H., & IBERALL, A. (1978). *Osmosis, diffusion, convection*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 235(1), R3-R17. Dostopno na naslovu:
<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpregu.1978.235.1.r3>
- SPENCER, C.M.; GOA, K.L. *Iodixanol: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and diagnostic use as an x-ray contrast medium*. *Drugs* 1996, 52, 899–927.
- STANIČ, K. OZ GORENJSKE, OE ZD KRANJ, PREHOSPITALNA ENOTA NUJNE MEDICINSKE POMOČI: *Akcidentalna stanja na terenu, Povečana fizična aktivnost kot vzrok pregrevanja organizma*, (2014, maj). Dostopno na naslovu:
https://www.zbornica-zveza.si/sites/default/files/publication_attachments/akcidentalna_stanja_na_terenu_2014.pdf#page=29
- TEMPERATURI, F. F. N. N., & DNK, O. B. P. I. I. *formalin fixation at low temperature provides better yield and integrity of dna*. Dostopno na naslovu:
[file:///C:/Users/Laura/Downloads/18949-Tekst%20rukopisa-114435-2-10-20190911%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Laura/Downloads/18949-Tekst%20rukopisa-114435-2-10-20190911%20(1).pdf)
- TROBEC, T.: *Vpliv rutenijeve spojine Cl_a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema*, (2018). Dostopno na naslovu:
<http://knjiznica.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/Document.aspx?id=219>
- WAINWRIGHT, M., & CROSSLEY, K. B. (2002). *Methylene blue-a therapeutic dye for all seasons?.* *Journal of chemotherapy*, 14(5), 431-443.

WAINWRIGHT, M. (2015). *Tricyclic cationic chromophores as models for new photoantimicrobials*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26, 2390-2404.

WEBB, R. C. (2003). *Smooth muscle contraction and relaxation*. *Advances in physiology education*, 27(4), 201-206. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14627618/>

VIRI SLIK

CENIM.SE. Dostopno na naslovu:

<https://www.cenim.se/UserFiles/image/kontrakcija/sarkomera.jpg> (dostop 15. 1. 2024)

DENTISTUDIO. Dostopna na naslovu:

<https://www.dentis.si/images/CBCT/CBCT%20segment.jpg> (dostop 22. 2. 2024)

DOCPLAYER. Dostopno na naslovu:

<https://docplayer.gr/docs-images/58/41418821/images/6-0.png> (dostop 15. 1. 2024)

GIAGA NATURELLE. Dostopno na naslovu:

<https://www.gaianaturelle.com/blog/bolecine-v-sklepih.html> (dostop 12. 12. 2023)

HISTOLOGY. Smooth muscle Cell EM. Dostopno na naslovu:

https://medcell.org/histology/muscle_lab/smooth_muscle_cell_em.php (dostop 9. 12. 2023)

HISTOLOGY PHOTOMICROGRAPHS, Cardiac muscle. Dostopno na naslovu:

<https://eugraph.com/histology/cardiova/cardiac.html> (dostop 9. 12. 2024)

JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY. 2015. Dostopno na naslovu:

<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150188> (dostop 9. 12. 2023)

LIBRETEXTS MEDICINE. Muscle tissue, Dostopno na naslovu:

https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Human_Anatomy_%28Lange_et_al.%29/03%3A_Tissue_Level_of_Organization/3.05%3A_Muscle_Tissue

(dostop 8. 12. 2023)

MDPI. 2022. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. Dostopno na naslovu:

<https://doi.org/10.3390/w14020242> (dostop 7. 12. 2023)

MDPI. 2022. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. Dostopno na naslovu:

<https://doi.org/10.3390/w14020242> (dostop 7. 12. 2023)

MDPI. 2022. Review on Methylene Blue: Its Properties, Uses, Toxicity and Photodegradation. Dostopno na naslovu:

<https://doi.org/10.3390/w14020242> (dostop 7. 12. 2023)

MDPI. Electron Microscopic Recording of the Power and Recovery Strokes of Individual Myosin Heads Coupled with ATP Hydrolysis: Facts and Implications. Dostopno na naslovu:

<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/5/1368> (dostop 10. 12. 2023)

PHYSIO DIRECT. Dostopno na naslovu:

<https://physiodirectnz.com/author/taryn/page/2/> (dostop 13. 12. 2023)

PUBCHEM. Dostopno na naslovu: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (dostop 3. 1. 2024)

PUBCHEM. Dostopno na naslovu:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/img3d.cgi?&cid=712&t=s> (dostop 14. 2. 2024)

PUBCHEM. Dostop na:

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/pug_view/data/key/30788168_1 (dostop 17. 2. 2024)

REPOZITORIJ PRIRODOSLOVNOG-MATEMATIČNOG FAKULTETA. Dostopno na naslovu: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:085972> (dostop 16. 1. 2024)

REPOZITORIJ PRIRODOSLOVNOG-MATEMATIČNOG FAKULTETA. Dostopno na naslovu: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:085972> (dostop 16. 1. 2024)

REPOZITORIJ PRIRODOSLOVNOG-MATEMATIČNOG FAKULTETA. Dostopno na naslovu: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:085972> (dostop 16. 1. 2024)

RESEARCHGATE. Dostopno na naslovu:

<http://dx.doi.org/10.3891/acta.chem.scand.49-0737> (dostop 3.1. 2024)

SCIENCEDIRECT. Fast muscle fiber. Dostopno na naslovu:

<https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/fast-muscle-fiber> (dostop 13. 12. 2024)

SCIENCEDIRECT. Sarcoplasmic reticulum. Dostopno na naslovu:

<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/sarcoplasmic-reticulum>

SCIENCEPHOTOLIBRARY Skeletal muscle. Dostopno na naslovu:

<https://www.sciencephoto.com/search?q=striated+skeletal+muscles&p=2> (dostop 9. 12. 2023)

SiNAPSA. Dostopno na naslovu: https://www.sinapsa.org/eSinapsa/media/pics/2015-10/Berlot_Slika1.jpg (dostop 22. 2. 2024)

SPECIALISTIČNA KLINIKA DVOREC LANOVŽ. Dostopno na naslovu:

https://www.dvorec-lanovz.si/wp-content/uploads/2019/04/Philips_Elite_128-1024x768.jpg (dostop 22. 2. 2024)

UNIVERZA V LJUBLJANI, FAKULTETA ZA ŠPORT, KINEZIOLOGIJA. Uporaba izometrične vadbe pri bolnikih s povišanim krvnim tlakom. Dostopno na naslovu:

<https://www.fsp.uni-lj.si/COBISS/Diplome/Diploma22100137NovakAna.pdf> (dostop 15. 1. 2024)

UNIVERZA V LJUBLJANI, FAKULTETA ZA ŠPORT, KINEZIOLOGIJA. Uporaba izometrične vadbe pri bolnikih s povišanim krvnim tlakom. Dostopno na naslovu:

<https://www.fsp.uni-lj.si/COBISS/Diplome/Diploma22100137NovakAna.pdf> (dostop 15. 1. 2024)

UNIVERZA V LJUBLJANI, FAKULTETA ZA ŠPORT, KINEZIOLOGIJA. Uporaba izometrične vadbe pri bolnikih s povišanim krvnim tlakom. Dostopno na naslovu:

<https://www.fsp.uni-lj.si/COBISS/Diplome/Diploma22100137NovakAna.pdf> (dostop 15. 1. 2024)

UNIVERZA V LJUBLJANI, VETERINARSKA FAKULTETA. Vpliv rutenijeve spojine C1a na funkcijo perifernega živčno-mišičnega sistema. Dostopno na naslovu:

<http://knjiznica.vf.uni-lj.si/PortalGenerator/Document.aspx?id=219> (dostop 16. 1. 2024)

WIKIPEDIJA. Dostopno na naslovu:

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Prism-rainbow.svg/800px-Prism-rainbow.svg.png> (dostop 12. 12. 2023)

WIKIPEDIJA. Dostopno na naslovu: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kreatin> (dostop 17. 1. 2024)

ZAHVALA

K tej projektni nalogi sva pristopili predvsem zaradi zanimanja za področje medicine in kemije.

Zahvaljujeva se mentorjema:

- (1) doc. dr. Mihi Slapničarju, prof. kem. in biol. ter
- (2) doc. dr. Nejc Umecku, dr. Med., ki sta naju sprejela pod svoje okrilje, za vso pomoč pri usmerjanju in popravljanju projektne naloge ter svetovanju.

Zahvaljujeva se tudi Gimnaziji in veterinarski šoli BIC Ljubljana, ker je omogočila sodelovanje s Pedagoško in Medicinsko fakulteto Univerze v Ljubljani.