

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Vanja LAVK

**ANALIZA ODZIVA TKIV NA MEHANSKA POŠKODOVANJA
PRI NAVADNEM DIVJEM KOSTANJU
S TRIDIMENZIONALNIM MAGNETNO REZONANČNIM
SLIKANJEM**

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij – 1. stopnja

**ANALYSIS OF TISSUE RESPONSE
OF MECHANICALLY WOUNDED HORSE CHESTNUT
WITH THREE-DIMENSIONAL MAGNETIC RESONANCE IMAGING**

B. Sc. THESIS
University studies – 1st level

Ljubljana, 2010

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija lesarstva prve stopnje. Terenski del poskusa je bil opravljen v neposredni bližini Gozdarskega inštituta Slovenije. 3D magnetno resonančna slikanja so bila opravljena na Institutu Jožef Stefan, v laboratoriju Odseka za fiziko trdne snovi (F5) v Ljubljani. Priprave vzorcev pa so bile opravljene na Katedri za tehnologijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorja diplomskega projekta imenoval prof. dr. Primoža Ovna, za somentorja dr. Maksa Merele in za recenzenta doc. dr. Igorja Seršo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vanja Lavk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du1
DK UDK 630*852:630*812.210
KG navadni divji kostanj/mehanske poškodbe/3D MR slikanje/poranitveni les/kalus/vlažnost
AV LAVK, Vanja
SA OVEN, Primož (mentor)/MERELA, Maks (somentor)/SERŠA, Igor (recenzent)
KZ SI- 1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo
LI 2010
IN ANALIZA ODZIVA TKIV NA MEHANSKA POŠKODOVANJA
PRI NAVADNEM DIVJEM KOSTANJU S TRIDIMENZIONALNIM
MAGNETNO RESONANČNIM SLIKANJEM
TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij – 1. stopnja)
OP IX, 42 str., 4 pregl., 17 sl., 22 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Pri navadnem divjem kostanju (*Aesculus hippocastanum* L.) smo spremljali odziv tkiv na mehanska poškodovanja in vlažnostne spremembe. Vejice smo poškodovali tako, da smo skozi premer z baterijskim vrtalnikom zavrtali luknjo premera 3 mm. Vse vejice smo poškodovali 8. aprila 2010. Poškodovane segmente vejic smo preiskovali s pomočjo 3D MR slikanja, kar smo opravili v tedenskih intervalih. Takoj po mehanskem poškodovanju smo s 3D MR slikanjem opazili izsušitev tkiv v neposredni bližini rane. Med 7. in 14. dnem se tkivo pod izsušeno skorjo navlažuje. Med 14. in 28. dnem se na območju stržena pojavi tkivo s povišano vlažnostjo. Okrog rane je opaziti poranitveni les. 35. dan je opaziti progresivno odmiranje kambija in skorje, prav tako se je izsušil in odmrl del tkiva ob rani. Opaziti je bilo tudi nastanek kalusa. V notranjosti je izginila vlažna plast. 49. dan je poranitveno tkivo začelo preraščati poškodbo. 56. dan je bilo opaziti obsežen nastanek poranitvenih tkiv in s tem preraščanje poškodbe v prečni smeri. Vlažna reakcijska cona tukaj ni nastala.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du1
DC UDC 630*852:630*812.210
CX horse chestnut/mechanical wound/3D MRI/wound wood/callus/moisture
AU LAVK, Vanja
AA OVEN, Primož (supervisor)/MERELA, Maks (co-supervisor)/SERŠA, Igor (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology
PY 2010
TI ANALYSIS OF TISSUE RESPONSE OF MECHANICALLY WOUNDED HORSE CHESTNUT WITH THREE-DIMENSIONAL MAGNETIC RESONANCE IMAGING
DT B. Sc. Thesis (University studies – 1st level)
NO IX, 42 p., 4 tab., 17 fig., 22 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We monitored the response of tissues to mechanical wounding, and changes of moisture content of common horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). Branches were wounded by drilling a hole with a diameter of 3 mm through the complete diameter using the battery-powered drill. All branches were wounded on April 8, 2010. The wounded segments of branches were examined by 3D MR imaging, performed in weekly intervals. Immediately after the mechanical wounding, the 3D MR imaging revealed a dehydration of tissues in the immediate vicinity of the wound. During 7th and 14th day the tissue under the dehydrated bark was moistened. During 14th and 28th day a tissue with increased moisture content appeared in the pith area. Wound wood was detected around the wound. Progressive cambium and bark necrosis, as well the dehydration and necrosis of the part of the tissue near the wound, was detected on 35th day. The occurrence of callus was also visible. The moist layer in the interior disappeared. On 49th day the wound tissue started to overgrow the wound. An extensive occurrence of wound tissues, and consequently the overgrowth of the wound in the transverse direction, were detected on 56th day. Here, the moisture reaction zone did not occur.

KAZALO VSEBINE

str.

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	V
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OPIS NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA	2
2.2 ZGRADBA LESA NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA	4
2.2.1 Makroskopski opis	4
2.2.2 Mikroskopski opis	4
2.3 VLAŽNOST LESA	5
2.4 ODZIV DREVESNIH TKIV NA MEHANSKE POŠKODBE	6
2.4.1 Posledice mehanskih poškodovanj	6
2.5 TEORETIČNI MODELI, KI POJASNJUJEJO ODZIV ŽIVIH TKIV DREVESA NA MEHANSKO POŠKODOVANJE	9
2.5.1 Kompartimentalizacija	9
2.6 SLIKANJE TKIV Z JEDRSKO MAGNETNO REZONANCO	12
2.6.1 Potek slikanja s 3D MR	13
2.6.2 NMR preiskave na lesu	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 IZBOR TESTNIH DREVES ZA POSKUS	15
3.2 ZASTAVITEV POSKUSOV – MEHANSKA POŠKODOVANJA IN VZORČENJE	15
3.3 PRIPRAVA VZORCEV	17
3.3.1 Priprava segmentov vejic za 3D MR slikanje	17
3.3.2 Priprava vzorcev za anatomske raziskave	17
3.4 RAZISKAVA TKIV Z JEDRSKO MAGNETNO REZONANCO	18
3.4.1 Slikanje poškodovanih segmentov vejic s 3D MR	18
3.5 GRAVIMETRIČNO DOLOČANJE VLAŽNOSTI RAZISKOVANIH TKIV	20
3.6 KALIBRACIJA INTENZITETE MR SIGNALA NA SLIKI PROTONSKE GOSTOTE Z GRAVIMETRIČNO DOLOČENO VLAŽNOSTJO PREISKOVANIH TKIV	20
4 REZULTATI	22
4.1 VLAŽNOST INTAKTNIH TKIV	22
4.2 ODZIV VEJIC NA MEHANSKA POŠKODOVANJA	23
4.2.1 Analiza ranitvenega odziva in spremembe vlažnosti v mehansko poškodovanih tkivih	23
5 RAZPRAVA	34

6	SKLEPI	36
7	POVZETEK	38
8	VIRI	41

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Označba segmentov vejic za 3D MR slikanje, vključno z datumom povzročitve mehanske poškodbe (8.4.2010) in številom dni po poškodovanju, ko smo vzorec slikali s 3D MRI.....	16
Preglednica 2: Nastavitve parametrov za visokoločljivo slikanje.....	19
Preglednica 3: Podatki gravimetrično določene vlažnosti na intaktnih vzorcih.	22
Preglednica 4: Vrednosti povprečnih intenzitet pikslov (PIP) za vsako slikano vejico s 3D MR in pripadajoči korekcijski faktorji (KF).....	23

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Časovni model zaporedja abiotskih in biotskih sprememb v beljavi po mehanskem poškodovanju (Oven, 1997).	10
Slika 2: Prostorska razporejenost sten po konceptnem modelu CODIT (Shigo, 1979).	11
Slika 3: Prikaz povzročitve poškodbe z baterijskim vrtalnikom.	16
Slika 4: a) prikaz oznake poškodovanih vejic in b) poškodbe vejic.	17
Slika 5: a) 10 mm RF tuljava, v katero je bil nameščen vzorec in b) horizontalni magnet, v katerega je bila nameščena in fiksirana RF tuljava s poškodovanim segmentom vejice.	19
Slika 6: Prikaz dvajsetih zaporednih virtualnih prečnih MR prerezov, iz katerih je bila izračunana povprečna intenziteta pikslov (primer: rezine od 119 – 138).	21
Slika 7: Radialni vlažnostni profil intaktnega dela vejice izračunan iz MR slike.	24
Slika 8: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); kontrolni nepoškodovani vzorec, odvzet dne 7.4.2010: a) 3D MR slika nepoškodovane vejice, b) reliefni diagram vlažnosti na lokaciji virtualnega vzdolžnega MR prereza, c) virtualni vzdolžni MR prerez in d) virtualni prečni MR prerez.	24
Slika 9: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); vzorec Ah 1; na dan poškodovanja (8.4.2010): a) 3D MR slika poškodovane vejice; b) reliefni diagram vlažnosti na lokaciji virtualnega vzdolžnega MR prereza in c) virtualni vzdolžni MR prerez poškodovane vejice.	25
Slika 10: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); vzorec Ah 2; sedmi dan po poškodovanju (15.4.2010): tako virtualni vzdolžni MR prerez kot tudi reliefni diagram vlažnosti na lokaciji vzdolžnega MR prereza prikazujeta manjše spremembe v vlažnosti v neposredni bližini rane.	26
Slika 11: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); vzorec Ah 3; štirinajsti dan po poškodovanju (22.4.2010): viden povečan obseg nekroznega tkiva v območju skorje (puščica v navpični smeri), v območju stržena je prisotno tkivo, ki je posledica vrtnja (puščica v vodoravni smeri).	27
Slika 12: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); vzorec Ah 4; enaindvajseti dan po poškodovanju (29.4.2010): vidno povečanje obsega odmrlih tkiv in novonastali poranitveni les ter kalus. Na reliefnem diagramu vlažnosti na lokaciji vzdolžnega MR prereza je mogoče opaziti obsežnejšo izsušitev v vzdolžni smeri le na zgornji strani vejice, medtem ko ima tkivo na spodnji strani še nekoliko višjo vlažnost (puščica v navpični smeri).	28
Slika 13: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); vzorec Ah 5; osemindvajset dni po poškodovanju (6.5.2010): vzdolžni MR prerez razločno prikazuje pojav vlažnega tkiva v neposredni bližini rane, kar predstavlja ostanek tkiva ob samem poškodovanju vejice. Drugih bistvenih vlažnostnih sprememb ni bilo opaziti.	29
Slika 14: Navadni divji kostanj (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.); vzorec Ah 6; petintrideset dni po poškodovanju (13.5.2010): vzdolžni MR prerez jasno prikazuje nastanek kalusa (siva puščica). V notranjosti je še vedno prisotna vlažna cona, iz 3D MR slik pa je mogoče razbrati povečanje obsega poškodbe in poranitvenega lesa.	30

- Slika 15:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 7; dvainštirideset dni po poškodovanju (20.5.2010): 3D MR slika razločno prikaže prirastek poranitvenega tkiva, katerega vidni del prekriva mrtva skorja. Na vzdolžnem MR prerezu je mogoče opaziti, da je vlažna cona (glej sliko 13) v notranjosti izginila.....31
- Slika 16:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 8; devetinštirideset dni po poškodbi (27.5.2010): poranitveno tkivo je začelo priraščati poškodbo. V primerjavi s 35. dnem se je vlažnost tkiv bistveno znižala. Prečni prerez razločno prikazuje povečanje obsega poranitvenih tkiv in preraščanje poškodbe.32
- Slika 17:** Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 9; šestinpetdeseti dan po poškodbi (3.6.2010: na 3D MR slikah je mogoče opaziti vretenasto obliko poškodbe na periferiji ter njen povečan obseg. V notranjosti se zopet pojavi tkivo z višjo vlažnostjo, kar je mogoče razbrati tudi iz reliefnega diagrama na lokaciji virtualnega prečnega MR prereza.....33

1 UVOD

Drevesa navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) se zelo pogosta v urbanem okolju, kjer so tudi nenehno izpostavljena mehanskim poškodbam, ki jih lahko povzročajo dejavniki nežive (snegolom, vetrolom, požari) in žive narave (rastlinojeda divjad, insekti, glive) ter ljudje (vandalizem, obžagovanje, sečnja). Mehanska poškodba je prva faza v zaporedju kompleksnih procesov, ki v lesu sprožijo razvoj lokaliziranih sprememb. Te spremembe so biotska in/ali abiotska diskoloracija, biološki razkroj in nenazadnje izvotlitev drevesa (Shigo in Marx, 1977; cit. po Oven, 1999).

Prostorsko omejitev neugodnih učinkov poškodovanj in infekcije v lesu je mogoče razložiti z modelnim konceptom kompartmentalizacije CODIT (angl. Compartmentalization of Decay in Trees), ki predpostavlja, da lahko drevesa z obstoječimi in novonastalimi tkivi ter biokemičnimi snovmi ozko omejijo poškodovana tkiva (Oven, 2004). Anatomija obstoječih in novonastalih kompartmentalizacijskih tkiv je dokaj dobro raziskana, slabo pa je poznan njihov nastanek. Slabo je predvsem raziskana zveza med spremembami v vlažnosti in nastankom kompartmentalizacijskih tkiv. Nekateri avtorji menijo, da je vlažnost v drevesih ključni dejavnik, ki spremlja in tudi narekuje procese kompartmentalizacije (Merela, 2008). Spremljanje poranitvenih procesov in njihovo raziskovanje s klasičnimi raziskovalnimi metodami ni mogoče, ker s tem posežemo v njihovo mikrookolje, zato uporabljamo nedestruktivne metode, kakršna je tudi slikanje z jedrsko magnetno resonanco (Nuclear Magnetic Resonance – NMR Imaging) (Pearce, 1990). Visokoločljiva metoda slikanja NMR omogoča nedestruktivno in nekontaktno raziskovanje bioloških tkiv na osnovi vlažnostnih sprememb (Pearce in sod., 1994; cit. po Merela, 2008).

Cilji diplomskega projekta je bil s pomočjo tridimenzionalnega magnetno resonančnega slikanja (ang. Three-dimensional magnetic resonance imaging, MRI) raziskati odziv tkiv navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) na mehanska poškodovanja. V okviru diplomskega projekta smo želeli:

- raziskati vlažnostne spremembe v mehansko poškodovanih tkivih;
- pojasniti anatomijo poranitvenih tkiv pri navadnem divjem kostanju;

- pojasniti morebitno povezavo med vlažnostnimi spremembami v mehansko poškodovanih tkivih in nastankom novih tkiv;
- ugotoviti morebitne specifične značilnosti ranitvenega odziva pri proučevani drevesni vrsti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA

(Povzeto po Brus, 2005)

Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.) spada v družino *Hippocastanaceae*, rod *Aesculus* L. Je poligamna in žužkocvetna vrsta, ki cveti maja in junija kmalu po olistanju. Najbolj mu ustrezajo globoka, hranljiva, zračna, sveža do vlažna peščeno-illovnata tla, uspeva pa tudi na drugih vrstah tal. Ker je toploljubna vrsta, najbolje raste na sončnih mestih, čeprav dokaj dobro prenaša tudi zasenčenje. Brez poškodb prenese tudi temperature do -30 °C. Pozeba prizadene mlade rastline na premočenih tleh. Suša ga ne prizadene hitro, prav tako pa tudi dobro prenaša onesnažen zrak.

Navadni divji kostanj je eden najznačilnejših endemitov Balkanskega polotoka. Njegov naravni areal se deli na dva dela, kjer prvi, večji del obsega severozahodno Grčijo, del Makedonije in del Albanije, drugi, manjši del, pa je v Bolgariji. Raste v vlažnih nižinskih gozdovih in doseže nadmorsko višino do največ 1300 metrov. Že zgodaj so ga razširili po Evropi. Leta 1557 so ga Turki prinesli v Carigrad, leta 1576 pa so ga prvič dobili na Dunaju. V Sloveniji ni samonikel, po mestih in naseljih je eno najpogostejše sajenih okrasnih dreves. Najdemo ga v vrtovih, parkih, drevoredih in drugih zelenih površinah v urbanem okolju po celotni Sloveniji. Ponekod napol podivjano raste tudi v naravi.

Je listopadno drevo, ki je debelo do 1 metra in zraste v višino do 30 metrov. Največkrat ima kratko in gosto deblo ter pravilno in široko razvejeno okroglasto krošnjo. Veje so debele in krhke. Koreninski sistem je dobro razvit in večinoma površinski, katerega glavna korenina je šibka, stranske pa močne. Skorja je sivorjava, z nje pa odstopajo majhne

okrogle luske. Poganjki so debeli, gladki in sivorjavi, na njih pa so opazne velike polkrožne listne brazgotine. Brsti so jajčasti, zašiljeni, rdečerjavi in gladki, spomladi lepljivi ter dolgi do 3 cm in debeli do 1,5 cm. Med njimi je največji terminalni brst. Listi so navzkrižno razporejeni in dlanasto sestavljeni iz 5 do 7 lističev, ki so skupaj pritrjeni na 15 do 20 cm dolg pecelj. So podolgovato narobe jajčasti, sedeči, na robu nažagani, dolgi 10 do 25 cm in do 10 cm široki. Cvetovi so beli in združeni v pokončna, 20 do 30 cm dolga latasta socvetja, v katerih so moški, ženski in dvospolni cvetovi. Cvet je širok do 2 cm, ima 5 zraslih čašnih listov in 5 belih, pogosto rdeče pegastih, neenakih, zmečkanih, po robu valovitih venčnih listov, 5 do 8 dolgih prašnikov in pestič s 3-delno plodnico. Plodovi so 5 do 6 cm debeli, okrogle, zelene glavice z redkimi bodicami. Zrele razpadejo na tri dele, v vsakem plodu pa so 1 do 3 bleščeča, okroglasta, nekoliko ploščata in kostanjevo rjava semena z značilno belo liso. Najpogostejše je razmnoževanje s semenom, uporabno pa je tudi vegetativno razmnoževanje s cepljenjem.

Navadni divji kostanj je izredno priljubljeno in zelo pogosto okrasno drevo. Sadimo ga zaradi lepih listov, cvetov, včasih semen in globoke sence. Semena za ljudi niso užitna, imajo pa več zdravilnih lastnosti. Nekatere učinkovine zdravijo obolenja žil, druge razna vnetja. Turški vojaki so semena uporabljali za krmo konjev in za zdravljenje nekaterih konjskih bolezni. Drevesna skorja vsebuje aesculin, ki ima sposobnost odbijanja ultravijoličnih žarkov in jo včasih uporabljajo kot eno izmed sestavin v kremah za sončenje.

Les je srednje gost in se zmerno krči ter ima slabšo stabilnost. Je mehak, njegova trdnost je nizka, prav tako pa je neodporen proti glivam in insektom. Les se uporablja za rezljanje in struženje, za gumbe, kuhinjske pripomočke, krivljen les, za nevidne dele pohištva, ortopedske pripomočke, cikle ter za kemično predelavo. Občasno se uporablja tudi za rezane furnirje zaradi značilne dekorativne progavosti, ki jo povzročijo odkloni aksialnih elementov. Pretežno se prodaja kot žagan les. Z vsemi orodji se obdeluje brez posebnih težav. Sušenje poteka dobro, nevarnost pokanja in zvijanja pa je majhna. Prav tako se dobro lepi in površinsko obdeluje (Čufar, 2006).

2.2 ZGRADBA LESA NAVADNEGA DIVJEGA KOSTANJA

(Povzeto po Pirnat, 2009)

2.2.1 Makroskopski opis

Navadni divji kostanj spada med difuzno porozne listavce. Nima obarvane jedrovine (črnjave), v osrednjem delu debla pa se pogosto razvije rjavkasto-rdeče obarvana diskoloracija. Les je svetel, rumenkasto bel, rahlo rdečkasto rjave barve. Letnice v prečnem prerezu so vidne kot svetle linije. Traheje in trakovi so v prečnem prerezu komaj vidni. Na vzdolžnih površinah ima les fine reže in je rahlo progast zaradi nekoliko temnejšega kasnega lesa. Je zavite rasti, mehak in lahek ter srednje gost ($r_0 = 510 \text{ kg/m}^3$).

2.2.2 Mikroskopski opis

V prečnem prerezu so traheje difuzno razporejene, posamič in v radialnih skupinah tudi do 7 celic ter v manjših gnezdih (100 do 150 trahej na mm^2 oziroma 60 do 105 trahej na mm^2). V prečnem prerezu so rahlo oglate in majhne, s tangencialnim premerom od 40 do 60 μm , redkeje tudi do 80 μm . V vzdolžnem prerezu so vidne enostavne perforacije in spiralne odebelitve. V trahejah lahko zasledimo gumozne depozite ter posamezne tile, ki se pojavljajo v diskoloraciji. V lesu navadnega divjega kostanja je 5,5 do 12,7 % por. Razpored aksialnega parenhima je apotrahealen – difuzen.

Trakovi v lesu navadnega divjega kostanja so enoredni, v povprečju visoki do 10 celic, največja višina pa obsega od 25 do 30 celic oziroma od 60 do 540 μm . Širina trakov je 8 do 14 μm , v tangencialni smeri lahko tudi do 19 μm . Trakovno tkivo je homogeno. V lesu navadnega divjega kostanja se na 1 mm dolžine v povprečju nahaja 12 do 16 trakov.

Osnovno tkivo divjega kostanja so libriformska vlakna, ki so razporejena v skoraj pravilnih radialnih nizih. Debelina stene vlakna je 2,5 do 4,5 μm (tudi 5,5 μm), premer pa 640 do 1660 μm . V lesu divjega kostanja je 74 do 78 % vlaken.

2.3 VLAŽNOST LESA

V tehnologiji lesa je vsebnost vode v materialu izražena kot masa vode na maso absolutno suhega lesa in občasno tudi kot masa vode na maso svežega lesa. Najpogosteje vlažnost določimo z gravimetrično metodo in jo izračunamo po enačbi:

$$u (\%) = \frac{m_{vl} - m_0}{m_0} \cdot 100 \% = \frac{m_{vode}}{m_0} \cdot 100 \% , \quad \dots(1)$$

kjer je m_{vl} masa svežega lesa, m_{vode} je masa vode v svežem lesu in m_0 je masa absolutno suhega lesa, ki jo dobimo s sušenjem pri temperaturi 103 ± 2 °C do konstantne mase.

Botanično je les zelo variabilen heterogen tkivni kompleks, fizikalno pa heterokapilarni sistem. Teoretično je točka nasičenja celičnih sten (TNCS, U_f), definirana kot lesna vlažnost, pri kateri so celične stene nasičene, medtem ko v lumnih in piknjah ni proste (kapilarne) vode. Nemogoče je jasno ločiti obe vrsti vode. Zelo verjetno vezana in prosta voda soobstajata v relativno širokem vlažnostnem območju. Smiselno je interpretirati TNCS kot vlažnost U , ki ustreza spremembi naklona $\delta P / \delta U$, kjer je P poljubna fizikalna lastnost (cit. po Torelli, 2000).

Les je kapilarna porozna snov, ki je zgrajena iz različnih celic. K poroznosti poleg lumnov prispevajo še manjše razpoke v celični steni, pikenjski sistem, smolni žepi in kanali ter intercelularni prostori.

Svež les takoj po poseku vsebuje velike količine vode, ki pa ne zagotavlja biološke odpornosti in dimenzijske stabilnosti in tako omejuje njegovo nadaljnjo predelavo in obdelavo. Delež vode v svežem lesu se med drevesnimi vrstami (in tudi v okviru iste) močno razlikuje. Svež les vsebuje vodo kot:

- vezano ali higroskopno vodo v celičnih stenah,
- prosto ali kapilarno vodo v celičnih lumnih in
- paro v celičnih lumnih.

Porazdelitev vode v živem drevesu je odraz prevajalne vloge sekundarnega ksilema, ki prevaja vodo iz koreninskega sistema v krošnjo.

Zaradi različne porazdelitve vode v živem drevesu vsebuje les tudi po poseku različne količine vode na različnih mestih. Vlažnost lesa v svežem stanju je odvisna od časa sečnje

in transporta, vrste lesa, starosti, velikosti krošnje, radialne in vertikalne distribucije v drevesu (beljava-jedrovina-višina).

Poleti in zgodaj jeseni je vlažnost debla nižja, največja a je spomladi in zgodaj poleti. Sezonska nihanja so značilna predvsem za beljavo, velik vpliv nanjo pa ima tudi intenzivnost transpiracije z listne površine, vlažnost tal in permeabilnost beljave (Gorišek, 2009). V drevesu se variabilnost vlažnosti lahko pojavi tudi zaradi travmatskih razlogov (Merela, 2008).

V zgodnjih osemdesetih letih prejšnjega stoletja so gozdovi dramatično propadali. Najhitreje je ginevala navadna jelka (*Abies alba* Mill.). Bauch et al. (1975) so raziskovali pojav mokrega srca pri navadni jelki ter na podlagi mikroskopskih preiskav, vsebnosti sladkorjev in respiracijske aktivnosti ugotovili, da jelka tvori normalno, neobarvano jedrovino. V procesu transformacije beljave v jedrovino nizkomolekularne jedrovinske snovi penetrirajo v celično steno in zmanjšujejo prostor za vezano vodo. Posledica tega je nižja ravnovesna vlažnost in točka nasičenja celičnih sten jedrovine v primerjavi z beljavo. Povišana vlažnost mokrega srca naj bi bila posledica bakterijske okužbe, vendar ni povsem jasno ali je okužba posledica mokrega srca ali vzrok za nastanek (Torelli s sod., 2005).

2.4 ODZIV DREVESNIH TKIV NA MEHANSKE POŠKODBE

2.4.1 Posledice mehanskih poškodovanj

Mehanska poškodovanja so običajno povezana z izgubo tkiva oziroma celic ali z razpoko v tkivu. Majhen del sprememb, ki so povezane z mehansko poškodbo, je definiran s celično smrtjo – apoptozo, večji del pa je povezan z regeneracijo in celjenjem tkiv, kar je prvotnega pomena pri dolgoživih lesnih vrstah. Posledice poškodb je v splošnem mogoče pojasniti z dogodki, ki se zgodijo zaporedno ali istočasno po poškodovanju.

Prvi dogodek po poškodbi je odmiranje neposredno poškodovanih celic. Vsebina poškodovanih celic lahko koagulira in tvori prvi zaščitni sloj ter tako prekrije rano. Sosednje celice, ki niso bile neposredno poškodovane, lahko odmrejo zaradi izsušitve, s tem pa tvorijo novo zaščitno plast. Temu dogodku sledi iztekanje predhodno nastalih zaščitnih substanc (smole, gumozni izcedki, lateks), katerih naloga je tvorba zaščitne plasti, ki preprečuje izsuševanje, prav tako pa deluje antimikrobno. Sosednjim, nepoškodovanim celicam se poveča metabolična aktivnost, kar vodi v izločanje drugih

zaščitnih substanc (fenoli, terpenoidi). Sklepni dogodek v odzivu tkiv na poškodovanje je nastanek poranitvenega tkiva (poranitveni periderm, kalus), čemur sledi ponovna diferenciacija novonastalih meristemskih področij in celične delitve. Zadnji dogodek odziva tkiv na neugodne učinke poškodovanj je obnavljanje ali nadomeščanje ranjenih tkiv (Merela, 2008).

2.4.1.1 Posledice poškodovanj v kambijeви coni in živi skorji

Kambijeva cona se na poškodbe in infekcije odziva s kompleksnimi časovnimi in prostorskimi procesi nastajanja zaščitnih tkiv in obnavljanja sistema sekundarnih vaskularnih tkiv. Odziv na robu rane zaradi povečane intenzitete rasti celic vodi v razvoj kalusa, nastanek primarnega zaščitnega ligno-suberinskega sloja ter novega vaskularnega kambija v osrednjem delu kalusa in novega periderma na površini kalusa. Z delitveno aktivnostjo novonastalega vaskularnega kambija se začne proces preraščanja rane (Oven, 1999). V poranitvenem lesu iglavcev se pojavijo travmatski smolni kanali, listavci pa tvorijo manj in manjše traheje ter več aksialnega parenhima. Te spremembe so intenzivnejše v neposredni bližini rane, medtem ko novonastalo tkivo postaja vedno bolj normalno tem bolj oddaljeno je od rane (Merela, 2008).

2.4.1.2 Posledice poškodovanj v ksilemskem tkivu

Prva opazna sprememba v ksilemskem tkivu po poškodovanju je nastanek diskoloriranega lesa (les se razbarva). Zaradi poškodbe so diskoloracije dokaj hiter odziv tkiva, ki pa jo v začetnih tednih spremljajo anatomske spremembe v največji meri. Takšen les je ponavadi bolj svetel od nepoškodovanega lesa, vendar celice, ki ga tvorijo, v kratkem času postanejo temnejše od beljave. Diskoloriran les vsebuje tudi okluzije v parenhimskih celicah, skupaj z njimi pa izginjajo iz tkiva tudi škrobna zrna (Shain, 1979). Nekateri avtorji navajajo, da so takoj po poškodovanju v neposredni bližini poškodbe odkrili povečano respiratorno aktivnost parenhimskih celic. Količina diskoloriranega lesa in intenziteta obarvanja je odvisna od globine in velikosti poškodbe in časa poškodovanja, v vsakem primeru pa je za nastanek diskoloracije pomembna prisotnost zraka. Diskoloriran les poleg til vsebuje tudi gele in gumozne depozite (Merela, 2008). Tile niso značilne samo za poškodovan ksilem, ampak se pojavijo tudi pri normalnem, nepoškodovanem lesu (Blanchette, 1992; cit. po Merela, 2008). Predpogoj za nastanek tile je znižan tlak vodnega stolpca v lumnu traheje,

kar je posledica izgube vode. Tile lahko delno ali povsem blokirajo lumen traheje (Dimond, 1970; cit po Merela, 2008).

2.4.1.3 Spremembe v vlažnosti po poškodbi

Prva posledica mehanske poškodbe je izpostavitve tkiva atmosferskemu zraku, ki povzroči izsuševanje. Hitrost in obseg dehidracije sta v največji meri odvisna od tega ali so vodni stolpci pod pozitivnim ali negativnim tlakom (Zimmerman, 1983 in Leben, 1985; cit. po Merela, 2008). Če so vodni stolpci pod negativnim tlakom in je rana globoka, bo voda takoj odstranjena iz vaskularnih elementov in jo bo nadomestil zrak. Ta lahko v prvi fazi prodre tako globoko kot mu dopuščajo odprte pikenjske povezave, vse dokler ne pride do prekoračitve površinske napetosti meniska z aspiracijo pikenj ali otiljenja. Pojavi se tudi radialni tok vode iz notranjih tkiv proti periferiji. Sama oblika in razširjenost dehidracije je odvisna tudi od stopnje tenzije (negativni tlak) in njenega trajanja v vodnih stolpcih ter od velikosti, distribucije in povezanosti prevodnih elementov. To pa je med drugim razlog, da je dehidracija obsežnejša pri listavcih kot pri iglavcih.

Plitve rane na bazi drevesa se odražajo le v majhnih perifernih aeracijah, čeprav lahko višje v drevesu povzročijo dehidracije klinaste oblike. V primeru izgube večjega dela skorje obstaja možnost, da postane dehidriran celoten ksilemski obroč, ki je obstajal v času poškodbe. Pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.) se po odstranitvi skorje na izpostavljeni površini lesa in pod skorjo ter na robu rane razvije zelo učinkovit zaščitni les, ki je sestavljen iz tanke izsušitvene cone in 4,5 – 6,5 mm debele diskoloracijske cone pod njo. Zaščitni les lahko nekaj let uspešno ščiti les pod seboj. Ko pade njegova vlažnost pod točko nasičenja celičnih sten (TNCS), se začne krčiti in prekinejo ga radialne razpoke. Lahko ga predrejo tudi insekti (Torelli, 2001). Ne glede na sam obseg poškodbe, postane aerirano tkivo postopoma ločeno od sosednjega ksilema s formiranjem til in/ali gumoznih depozitov, suberiziranih plasti in smol (Blanchette, 1992; povzeto po Merela, 2008).

Različne anatomske in kemične ločnice ter visoka vlažnost vsaj začasno preprečijo širjenje patogenov. Pomembno pa ni le izoliranje poškodovanih tkiv, temveč tudi njihovo hkratno nadomeščanje z novimi. Odmiranje ostarelih ali poškodovanih tkiv pomeni zmanjšanje respiracijske porabe in tako več energije za kambijevo aktivnost, tvorbo semen in obrambne reakcije (Torelli, 2001).

2.5 TEORETIČNI MODELI, KI POJASNJUJEJO ODZIV ŽIVIH TKIV DREVEŠA NA MEHANSKO POŠKODOVANJE

2.5.1 Kompartimentalizacija

Živo drevo omejuje neugodne učinke poškodovanj na način, ki ga predpostavlja (a) teorija kompartimentalizacije ali (b) teorija sukcesije (Torelli, 2006).

Funkcija procesov, ki po poškodovanju potekajo v obstoječem ksilemu, je oblikovanje obrambnih področij (barier), ki ščitijo živa tkiva stoječega drevesa (Merela, 2008). Po kompartimentalizacijski teoriji se lahko drevo na poškodovanja odzove bodisi s produkcijo fizikalnih barier (tile, suberizirane plasti, gumozni depoziti) bodisi s produkcijo kemičnih barier (alelopatov). Tvorbo teh barier opisuje modelni koncept CODIT, ki ga je leta 1977 razvil Shigo s sodelavci (Torelli, 2006), Shain pa je leta 1979 temu dodal še model reakcijskih con, ki naj bi vzdrževale integriteto funkcionalne beljave (Merela, 2008). Poleg teh dveh modelov poskušata razvoj in obseg razkroja ter razbarvanja v drevesu pojasniti še koncept zaščitne vloge integralne vlažnosti beljave in model zaščitnega lesa, ki nastaja na površini razkrite beljave (Oven, 1997).

Teorija sukcesije predpostavlja, da les po poškodovanju zaporedno kolonizirajo različni organizmi. Diskoloracija se nahaja na periferiji razkroja, bazidiomicete pa je možno izolirati le v neposredni bližini poškodbe. Iz tega je možno sklepati, da do razkroja pride le, če se v drevesu po poškodovanju razvije diskoloracija. Ta teorija torej pojasnjuje, da glive razkrojevalke in glive, ki razkroja ne povzročajo, skupaj z drugimi organizmi vplivajo na sposobnost živega drevesa, da kompartimentalizira infekcijo (Torelli, 2006).

2.5.1.1 Model CODIT

Model omejitve razkroja v drevesu (Compartmentalization Of Decay In Trees) se deli na dva dela, pri čemer prvi pojasnjuje časovno zaporedje sprememb v tkivu po poškodovanju, drugi ali prostorski del pa v drevesu predpostavlja stene (prepreke), ki omejujejo razvoj in širjenje razbarvanja (Dujesiefken s sod., 2005).

Časovni del modela CODIT predpostavlja tri zaporedne faze, ki sledijo mehanski poškodbi. V prvo fazo so vključeni procesi, ki so neposredno povezani z odzivom drevesnih tkiv na poškodovanja: to so abiotske (dehidracija, aeracija), fiziološke, biokemične in kemične spremembe. Nastanek razbarvanja in jedrovine je v začetni razvojni fazi dokaj podoben: v beljavi odmrejo parenhimske celice, pri čemer tvorijo

fenole, katerih naloga je povečanje odpornosti lesa pred razkrojem. Tako spremenjen les ima tudi zaščitno funkcijo, zato se za opis jedrovine in razbarvanja uporablja izraz zaščitni les (Oven, 1997 in Merela, 2008).

Naslednja faza zajema kolonizacijo zaščitnega lesa in beljave s pionirskimi bakterijami, kar se kaže v občutljivi reakciji lesnega tkiva na prisotnost patogenega organizma. Na meji med nepoškodovano beljavo in okuženim razbarvanim lesom se pri listavcih pojavijo mejni sloji razbarvanih stolpcev, katerih naloga je zaščita beljave (Shortle s sod., 1995). Zadnja faza po poškodovanju je razkroj lesa, kjer les izgubi tudi oporno funkcijo. V tem konceptu se razširitev in razvoj razbarvanja po poškodovanju pojavi kot del prve in druge faze. Pri tem pa je pomembno dejstvo, da se procesi v drevesu lahko ustavijo na katerikoli fazi, vse je namreč odvisno od tega, kakšno zmožnost ima drevo za omejitev učinkov poškodovanj (Oven, 1997).

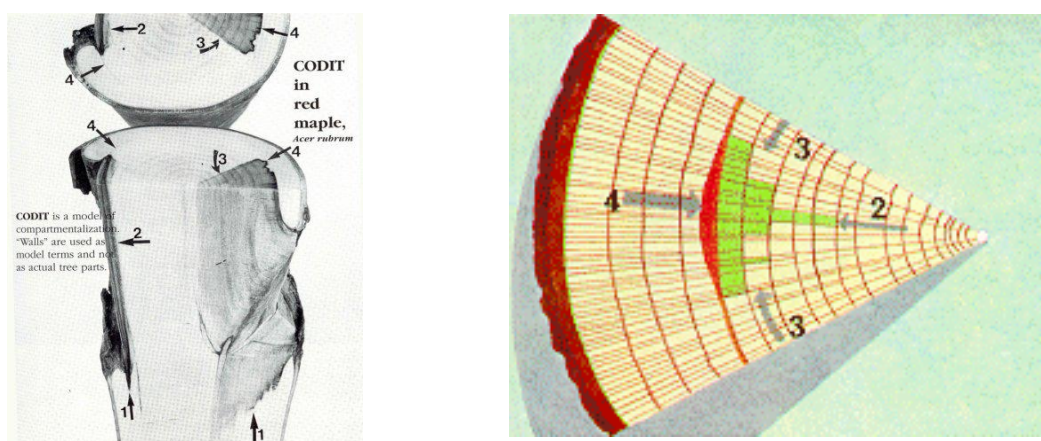
Čas ----->
Stanje 0 I II III

0	ekspozicija beljave zaradi poškodovanja
I	nastanek razbarvanega lesa (faza I)
II	infekcija razbarvanega lesa
III	pride do razkroja v razbarvanem lesu

Slika 1: Časovni model zaporedja abiotskih in biotskih sprememb v beljavi po mehanskem poškodovanju (Oven, 1997).

Prostorski del modela CODIT predpostavlja, da je (a) drevo visoko predeljen organizem in (b) učinki poškodb so omejeni na predelke. Predelke omejujejo štiri stene, pri čemer stena 1 omejuje širjenje razbarvanja in okužbe v vzdolžni smeri in je rezultat aktivnega odziva lesnega tkiva takoj po poškodovanju (cit. po Oven, 1997). Ta stena je tudi najšibkejša in jo sestavljajo blokade v aksialnih elementih (tile, aspiracija obokanih pikenj, gumozni depoziti, odložine na perforacijskih ploščicah) (cit. po Merela, 2008). Stena 2 zavira širjenje neugodnih učinkov poškodovanj v centripetalni smeri. Predstavlja jo plast gostejšega kasnega lesa v prirastnem plašču in plasti terminalnega ali inicialnega parenhima. Stena 2 predstavlja v drevesu sklenjen plašč tkiva od baze do vrha drevesa.

Stena 3 je komponenta, ki zavira širjenje infekcije in diskoloracije v tangencialni smeri. Tvori jo radialno usmerjeno trakovno tkivo. Ta stena ni sklenjena kot stena 2, ker večina trakov ni strženovih, njihova višina je omejena, med njimi pa ni aksialnega stika. Stena 4 je glavna komponenta konceptnega modela CODIT. Imenujemo jo tudi barierna cona ali ranitveni les. Steno 4 tvori vaskularni kambij po mehanskem poškodovanju ali glivni infekciji. Predstavlja nespecifični obrambni mehanizem in deluje kot izolacijsko tkivo med odmrlo beljavo in lesom, ki nastaja po poškodovanju. Ima povečan delež parenhimskih celic in s tem tudi večji obrambni potencial kot normalni les. Stena 4 je najmočnejša in tudi najtrajnejša omejitvena stena, ki pa se včasih tvori daleč od mesta poškodovanja ali pa le v neposredni bližini poškodbe (Oven, 1997).



Slika 2: Prostorska razporejenost sten po konceptnem modelu CODIT (Shigo, 1979).

2.5.1.2 Model reakcijskih con

Shain je leta 1979 konceptnemu modelu CODIT dodal še model reakcijskih con in ga s tem dopolnil. Za opis reakcijskih con se uporabljata še izraza marginalne cone ali mejni sloji diskoloracijskih stolpcev (CBL = discoloration column boundary layer). Običajno so te cone temnejše od normalnega lesa in ostro obrobljene. Model reakcijskih con predpostavlja, da se parenhimske celice aktivno odzovejo na prisotnost patogenega organizma tako, da tvorijo dinamične obrambne reakcijske cone (Merela, 2008). Mejne plasti so v bistvu zaščitne plasti, ki ločujejo nepoškodovano beljavo do okuženega diskoloriranega lesa in lahko določen čas preprečujejo vdor glive globlje v tkivo (Oven, 1997).

Pri površinskih poškodovanjih lesa (odstranitev skorje) se odkrito tkivo obarva temneje. Frank je leta 1884 za ta opis uporabil izraz zaščitni les. Zaščitni les ščiti nepoškodovano beljavo pred vdorom zraka in izsuševanjem ter glivno okužbo. Pravzaprav je zaščitni les površinsko razbarvanje, ki jo je v smislu konceptnega modela CODIT možno interpretirati kot stene 1, 2 in 3 (povzeto po Oven, 1997).

2.5.1.3 Zaščitna vloga integralne vlažnosti beljave

Zaradi razmerja med večjo vlažnostjo in manjšo koncentracijo kisika v tkivu, naj bi tudi beljava nosila zaščitno funkcijo. Zaščitne plasti, ki nastanejo po mehanski poškodbi, naj bi ohranjale integralno vlažnost beljave zaradi tesnilnega značaja suberina in povsem verjetno tudi predstavljajo dodaten dejavnik odpornosti lesa proti infekciji z glivami (Pearce, 1990 in Boddy, 1992; cit. po Oven, 1997). Ta model ne predpostavlja nastanka fizičnih ovir.

2.6 SLIKANJE TKIV Z JEDRSKO MAGNETNO REZONANCO

Slikanje z jedrsko magnetno resonanco je ena izmed najpogosteje uporabljenih in najpomembnejših nedestruktivnih metod v medicini, možne uporabe metode v drugih znanostih pa so dokaj slabo poznane. Jedrska magnetna resonanca (NMR = Nuclear Magnetic Resonance) je fizikalni fenomen, ki temelji na magnetnih lastnostih atomskega jedra.

Pojav magnetne resonance sta leta 1946 neodvisno odkrila Felix Bloch in Edward Mills Purcell, ki sta za odkritje leta 1952 skupaj prejela Nobelovo nagrado za fiziko. Kratica NMR se v splošnem uporablja za opis vseh znanstvenih metod, ki izkoriščajo jedrsko magnetno resonanco. NMR spektroskopija je ena izmed najzmogljivejših metod za določitev fizikalnih kemijskih in elektronskih lastnosti molekul, prav tako pa je s to metodo mogoče pridobiti natančne informacije o topologiji, dinamiki in tri-dimenzionalni zgradbi molekul v raztopinah ali trdnih snoveh.

Slikanje z magnetno resonanco (MRI = Magnetic Resonance Imaging) se prvenstveno uporablja za vizualizacijo bioloških struktur in njihovih funkcij. Osnovni pogoj za uspešno MR slikanje je, da preiskovana tkiva oziroma materiali vsebujejo vodo. Prav zaradi visoke vlažnosti in specifične zgradbe pa je les zelo primeren material za tovrstne raziskave. Že na osnovi prvih slikanj lesa z NMR, ki so jih opravili pred več kot 30 leti, so pokazali, da gre

za obetavno nedestruktivno metodo za opazovanje notranjih struktur in pojavov v lesu. Za raziskave lesa so najprej uporabljali običajne medicinske magnete z relativno šibkim magnetnim poljem (0,15 T – 1 T) ter medicinske radio frekvenčne (RF) tuljave, ki so sicer omogočale slikanje velikih vzorcev lesa (debla s premeri nad 15 cm), vendar pa je bila ločljivost teh slik dokaj slaba (1,2 x 1,2 mm²/piksel). Z razvojem zmogljive računalniške opreme in uvajanjem superprevodnih magnetov se je skrajšal čas in povečala občutljivost te metode, zaradi česar bi ta lahko postala zanimiva tudi za anatomske študije (povzeto po Oven in sod., 2008; Merela, 2008).

2.6.1 Potek slikanja s 3D MR

Pri 3D MRI tehniki slikanja je slikani prostor razdeljen na enako velike dele (kocke oziroma »voxle«). Dimenzija ene kocke določa tudi prostorsko ločljivost MR slikanja. Meritev poteka tako, da radio-frekvenčni (RF) sunek najprej vzbudi vodikova jedra. Temu sledi kratkotrajni vklop posebnih tuljav, ki ustvarjajo gradient magnetnega polja z vnaprej programirano jakostjo in smerjo, ter na koncu še zajem RF signala. Podatki meritev se zbirajo za vse elemente 3D slike (kocke) hkrati in se šele, ko je zbran ves slikovni signal iz preiskovanega vzorca, s pomočjo večdimenzionalne Fourierjeve transformacije izračuna signal za vsak slikovni element posebej. S tem se izmeri tudi MR slika.

Najbolj razširjena metoda slikanja z MR je metoda, ki temelji na spinskem odmevu (spin echo). Ta ima nastavljiva dva parametra, ki pomembno vplivata na kontrast slike. Ta parametra sta čas spinskega odmeva TE (echo time) in hitrost ponavljanja zaporedja TR (repetition time). Pri pravilno nastavljenih parametrih slikanja TE in TR (TE mora biti bistveno krajši od T2 vzorca in TR bistveno daljši od T1 vzorca) izmerimo sliko, katere kontrast je sorazmeren gostoti vodikovih jeder v vzorcu. Takrat izmerimo tako imenovano protonsko sliko (proton density image), ki je sorazmerna koncentraciji vode v slikanem vzorcu. Količina MR signala, ki pripada posameznemu slikovnemu elementu MR slike, je predstavljena s svetlostjo. Večji kot je MR signal iz slikovnega elementa, svetlejša bo ta točka v sliki (povzeto po Oven in sod., 2008; Merela, 2008).

2.6.2 NMR preiskave na lesu

Prvi MR poskusi slikanja lesa so bili opravljeni pred več kot 30-imi leti in so obetali nedestruktivno tehniko za opazovanje notranjih elementov in pojavov v lesu. Slikanja so

bila opravljena v medicinskih magnetih z relativno nizkimi magnetnimi polji (0,15T – 1T), uporabljene pa so bile radio-frekvenčne (RF) tuljave večjih dimenzij, ki so omogočale slikanje vzorcev lesa, ki so imeli premer debela nad 15 cm, vendar je bila ta ločljivost slik dokaj slaba ($1.2 \times 1.2 \text{ mm}^2/\text{piksel}$) (Bucur, 2003a; povzeto po Merela, 2008). Primer slikanja za *in situ* pregled živih rastlin prikazujejo porazdelitev in gibanje vode v koreninah in meristemu med razvijanjem, v listih, iglicah in plodovih (Halloin et al., 1994; cit. po Merela, 2008).

Mehanske poškodbe in okužbe z mikroorganizmi v lesu povzročijo kompleksne procese, ki predstavljajo obrambni mehanizem lesa, v katerem so žive parenhimske celice. NMR metoda je bila uporabljena tudi v raziskavah glivnih okužb na živih drevesih. Pearce in sod. (1994; 1997a; 1997b) je metodo uporabil za slikanje okužbe dreves (*Acer Pseudoplatanus* L.) z različnimi glivami (*Ustulina deusta*, *Chondostereum purpureum*, *Cryptostroma corticale* in *Ganoderma adspersum*). Razvoj glivne okužbe v beljavi živih dreves je omejen z aktivnim obrambnim mehanizmom. Okužen del je bil obdan z visoko vlažnostjo reakcijske cone, ki se je nahajala med razkrojenim in zdravim lesom. Ta raziskava je pokazala, da so spremembe v vlažnosti lesa povezane s pojavom razkrojnih procesov v bližini poškodovanj živih dreves. Vsebnost vode v reakcijski coni je bila višja kot v zdravem lesu. Izračunana slika protonske gostote je prav tako prikazala mejo reakcijske cone. Kontrast na slikah poškodb so pripisali variaciji protonske gostote in padcu spinskega relaksacijskega časa T_2 v bližini poškodbe. V reakcijski coni je bila vrednost relaksacijskega časa T_1 manj občutljiva na patološke spremembe tkiva kot vrednost časa T_2 (Pearce in sod., 1997a; povzeto po Merela, 2008).

NMR slikanje je ena močnejših in prilagodljivih tehnik za karakterizacijo materialov. Napredovanje tehnologije in razvoj hitrejših računalnikov ter močnih superprevodnih magnetov je povečal hitrost, občutljivost, ločljivost in fleksibilnost sistemov. Lastnosti, ki postavljajo NMR slikanje v ospredje pred drugimi tehnikami, so: metoda je nedestruktivna, nekontaktna, relativno hitra za enostavnejše analize, ne povzroča strukturnih sprememb oz. poškodb, uporabiti jo je mogoče *in situ* ter *in vivo*. Omogoča mape in distribucijo strukturnih nehomogenosti in tekočin (vode, zaščitnih sredstev, lepil,...). Mapa T_2 relaksacije lahko razloči med vezano in prosto vodo. Vezana voda je močno vezana na celulozo in ima krajši T_2 relaksacijski čas kot prosta voda. Ker so NMR relaksacijska

razmerja odvisna od mobilnosti molekul, so le-ta občutljiva na kemične in fizikalne karakteristike vzorca (povzeto po Merela, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBOR TESTNIH DREVES ZA POSKUS

Za zastavitev poskusa smo izbrali dve sosednji drevesi navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.), ki rasteta v primestnem gozdu na Rožniku, v neposredni bližini Gozdarskega inštituta v Ljubljani, ki sta bili približno enake velikosti in starosti. Raziskave so se odvijale med rastno sezono v letu 2010.

3.2 ZASTAVITEV POSKUSOV – MEHANSKA POŠKODOVANJA IN VZORČENJE

Za spremljanje odziva tkiv na mehanske poškodbe in vlažnostne spremembe z nedestruktivno metodo 3D MRI smo na obeh drevesih izbrali 20 vejic, in sicer 8 vejic na prvem in 12 vejic na drugem, sosednjem drevesu. Pri izboru le-teh smo bili pozorni na to, da so bile približno enake starosti (cca. 4 leta) in podobnih premerov. Pri vzorčenju smo za rezervo izbrali nekoliko več vejic, kot smo jih potrebovali za izvedbo poskusa.

Na poškodovanem predelu je bil povprečen premer vejice 8 mm, kar je dimenzija, ki je še ustreza za slikanje z RF tuljavo z notranjim premerom 10 mm. Na vejicah smo opravili en tip mehanskih poškodb (slika 3). 11 vejic smo poškodovali tako, da smo čez celotno vejico z baterijskim vrtalnikom zavrtali luknjo premera 3 mm. Vse vejice smo poškodovali 8. aprila 2010.



Slika 3: Prikaz povzročitve poškodbe z baterijskim vrtalnikom.

Po mehanskem poškodovanju smo s plastičnimi oznakami, na katerih so bile napisane zaporedne številke, označili vejice (slika 4). S takšnimi oznakami smo jih označili zato, da ne bi izstopale, saj bi to lahko spodbudilo radovednost, ki pa bi lahko vodila v uničenje vzorcev.

Poškodovane segmente vejic smo preiskovali s pomočjo 3D MR slikanja, kar smo opravili v tedenskih intervalih (preglednica 1). Podobno kot vejice, smo označili tudi 3D MR slike: z Ah smo označili drevesno vrsto (*Aesculus hippocastanum* L.), tej oznaki pa smo dodali še številko vejice in število dni po poškodbi (npr. Ah1-07: vejica 1 / sedmi dan po poškodbi). Po vsakokratnem končanem slikanju smo opazovano vejico shranili za nadaljnje anatomske preiskave.

Preglednica 1: Označba segmentov vejic za 3D MR slikanje, vključno z datumom povzročitve mehanske poškodbe (8.4.2010) in številom dni po poškodovanju, ko smo vzorec slikali s 3D MRI.

Oznaka vzorca	Datum odvzema	Dan po poškodbi
Ah 1	8.4.2010	0. dan
Ah 2	15.4.2010	7. dan
Ah 3	22.4.2010	14. dan
Ah 4	29.4.2010	21. dan
Ah 5	6.5.2010	28. dan
Ah 6	13.5.2010	35. dan
Ah 7	20.5.2010	42. dan
Ah 8	27.5.2010	49. dan
Ah 9	3.6.2010	56. dan



Slika 4: a) prikaz oznake poškodovanih vejic in b) poškodbe vejic.

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1 Priprava segmentov vejic za 3D MR slikanje

Pri odvzemu vzorcev iz živih dreves smo se želeli čimbolj izogniti izsuševanju iz čel, kar smo dosegli tako, da smo iz drevesa odvzeli čim daljši del veje, dolžine od 30 – 50 cm, nakar smo odstranili vse stranske liste in poganjke ter odprte površine premazali z nepropustnim premazom Stipol-AF proizvajalca Silvaproduct, ki preprečuje izsuševanje. Nezaščitena je ostala mehanska poškodba vejice premera 3 mm. Tako pripravljene vzorce smo v laboratorij za MRI na Institut Jožef Stefan peljali v nepredušno zaprti PVC vrečki. Del, kjer je bila poškodba, je bil vstavljen v RF tuljavo z notranjim premerom 10 mm.

3.3.2 Priprava vzorcev za anatomske raziskave

Po končanem 3D MR slikanju segmentov vejic, smo le-te shranili v fiksacijskem sredstvu FAA, katerega 500 ml vsebuje 25 ml 37 % formalina, 450 ml 50 % etanola in 25 ml 100 % oetne kisline. Vzorci nam bodo služili za morebitne nadaljnje anatomske preiskave.

3.4 RAZISKAVA TKIV Z JEDRSKO MAGNETNO REZONANCO

Raziskave tkiv navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) so bile opravljene na Oddelku za fiziko trdne snovi, v laboratoriju za magnetno resonanco na Institutu Jožef Stefan.

3.4.1 Slikanje poškodovanih segmentov vejic s 3D MR

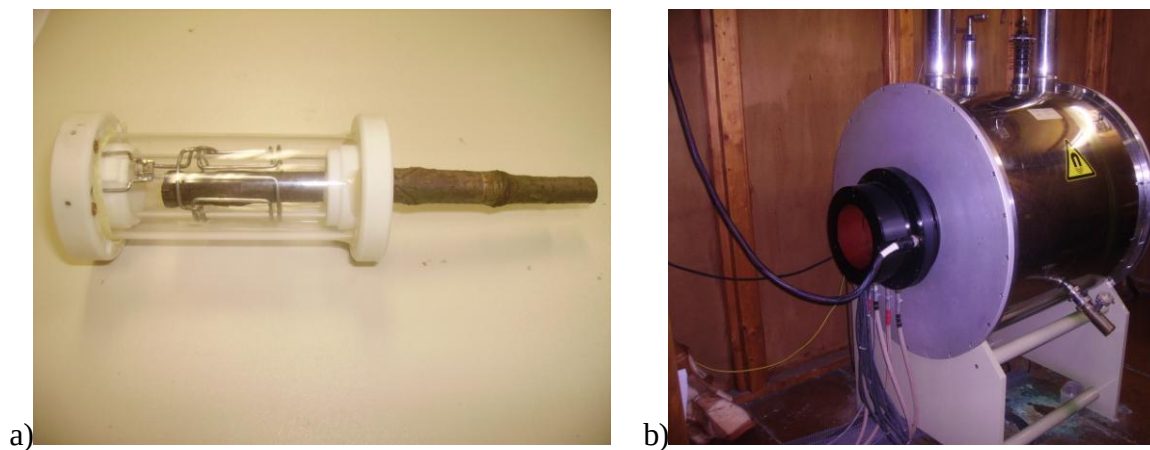
S 3D MR slikanjem smo pričeli 7. aprila 2010, ko smo v 10 mm RF tuljavo namestili kontrolno vejico. Pred prvim slikanjem smo izmerili relaksacijska časa T1 in T2, ki sta pomembna za pravilno nastavitve parametrov slikanja, kadar želimo slikati vodo v lesu, t.i. protonsko gostotno slikanje. T1 je v našem primeru imel vrednost 343 ± 9 ms, T2 pa 63 ± 7 ms. Prvo slikanje poškodovanega segmenta vejice je bilo 8. aprila 2010, nakar smo 3D MR slikanja naslednjih segmentov vejic opravili v tedenskih intervalih. Pred vsakim slikanjem smo iz drevesa odvzeli svežo vejico ter jo ustrezno pripravili (glej poglavje 3.3.1) in jo transportirali v laboratorij za NMR. Na poškodovani segment smo namestili 5 mm širok trak samolepilne poliuretanske pene, ki nam je omogočila, da se je segment vejice tesno prilegal notranjosti RF tuljave. Na poškodovani del vejice smo nato namestili RF tuljavo, ki nam je zagotovila visokoločljivo slikanje s 3D MR. Tako pripravljen vzorec v RF tuljavi smo nato vstavili v gradientno tuljavo ter vse skupaj pazljivo namestili v magnet. Ob namestitvi smo pod vejico podložili debelejšo poliuretansko peno, ki je preprečila kakršnokoli premikanje vejice med samim slikanjem. Pred vsakim slikanjem smo morali uglasiti tuljavo ter obenem opravili še orientacijsko slikanje (3D pilotno slikanje), ki je trajalo nekaj minut. Pilotno slikanje natanko pokaže lokacijo segmenta vejice v magnetu, ki jo po potrebi lahko popravimo. Na osnovi pilotnih slik smo nastavili ustrezno območje in matriko 3D MR slikanja. Slikanje s 3D MR je bilo izvedeno pri parametrih, ki so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Nastavitve parametrov za visokoločljivo slikanje.

Parametri	
vidno polje (FOV)	25 mm
matrika slikanja	256 x 256 x 128
čas spinskega odmeva (TE)	2,4 ms
čas med RF zaporedji (TR)	500 ms
število povprečitev	8
prostorska ločljivost slikanja	100 μ m

Čas slikanja pri osmih povprečitvah je bil 18 ur in 32 minut. Samo število povprečitev je pomembno za razmerje signal - šum, saj se z večanjem števila povprečitev izboljša razmerje med signalom in šumom (SNR – signal to noise ratio), vendar pa to posledično podaljša čas slikanja.

Po zaključenem slikanju smo z vejice odstranili RF tuljavo in vejico shranili v fiksacijsko sredstvo FAA za morebitne kasnejše anatomske preiskave. Vse segmente poškodovanih vejic smo enako pripravili in slikali pri enakih parametrih. Podatke, ki smo jih pridobili s 3D MR slikanjem, smo nato obdelali s programom Image J (NIH, USA) in Amira 4.0 (Visage Imaging GmbH, Berlin).



Slika 5: a) 10 mm RF tuljava, v katero je bil nameščen vzorec in b) horizontalni magnet, v katerega je bila nameščena in fiksirana RF tuljava s poškodovanim segmentom vejice.

3.5 GRAVIMETRIČNO DOLOČANJE VLAŽNOSTI RAZISKOVANIH TKIV

S 3D MR slikanjem brez dodatnih analiz že dobimo primerjalne podatke o vsebnosti vode v vzorcih, ker je izraženo z različno intenziteto svetlosti slik. Za določevanje točnih vlažnosti območij na slikah smo uporabili metodo NMR za določevanje vlažnosti (Merela, 2008). V prvem koraku smo morali na kontrolnih vzorcih z gravimetrično metodo določiti vlažnost vejic. Šestnajst svežih segmentov vejic, podobnih premerov kot so bili proučevani s 3D MR tehniko slikanja, smo takoj po odvzemu stehali in jih posušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 103 ± 2 °C. Vlažnost vzorcev smo nato izračunali po enačbi:

$$u (\%) = \frac{m_{vl} - m_0}{m_0} \cdot 100 \% = \frac{m_{vode}}{m_0} \cdot 100 \% . \quad \dots(1)$$

3.6 KALIBRACIJA INTENZITETE MR SIGNALA NA SLIKI PROTONSKE GOSTOTE Z GRAVIMETRIČNO DOLOČENO VLAŽNOSTJO PREISKOVANIH TKIV

S tehniko MR slikanja dobimo le primerjalne podatke o prisotnosti in koncentraciji vode v lesu, ki je izražena z različno intenziteto svetlosti na MR sliki. Želeli smo pridobiti absolutne podatke o vlažnosti posameznih tkiv, ki smo jih opazovali na MR slikah, zato je bila potrebna kalibracija intenzitete pikslov na slikah z vlažnostjo proučevanih tkiv.

Za kalibracijo 3D MR slik dejanske vlažnosti smo potrebovali povprečne vrednosti intenzitet MR signala iz slikanih vejic. Te smo izmerili na podlagi vrednosti pikslov na sliki, ki izkazujejo jakost signala. Moč signala oz. njegova amplituda je odvisna od količine vode v vzorcu in od nastavitve samega tomografa. Pri vsakem slikanju se določeni parametri, kot so nastavitve moči ojačevalnika, uglastev tuljave in signala itd., spreminjajo in zato je potrebno za vsako sliko posebej izračunati povprečno vrednost pikslov. Na vsaki od MR slik vzdolžnih prerezov smo vizualno ocenili globino od mesta poškodbe, od katere dalje ni bilo videti nikakršnega vpliva dehidracije ali navlaževanja po poškodbi. Na tej globini smo nato izbrali 20 zaporednih MR slik prečnih prerezov in jim na celi površini s programom ImageJ izmerili povprečne intenzitete pikslov (slika 6).



Slika 6: Prikaz dvajsetih zaporednih virtualnih prečnih MR prerezov, iz katerih je bila izračunana povprečna intenziteta pikslov (primer: rezine od 119 – 138).

Iz obdelanih podatkov smo nato določili povprečno intenziteto vseh dvajsetih rezin in na ta način dobili t.i. povprečno intenziteto pikslov (PIP) merjenega vzorca, ki ustreza povprečni gravimetrično določeni vlažnosti vzorcev (U). Za vsako vejico posebej smo izračunali korekcijski faktor (KF) med povprečno vlažnostjo in povprečno intenziteto pikslov:

$$KF = U / PIP. \quad \dots (2)$$

S pomočjo korekcijskega faktorja smo iz MR slike lahko za vsak piksel oz. skupino pikslov, ki ustrezajo točno določenim tkivom, izračunali vlažnost (u):

$$u = KF \cdot IP, \quad \dots (3)$$

kjer je IP povprečna vrednost intenzitete pikslov, ki ustrezajo določenim tkivom.

4 REZULTATI

4.1 VLAŽNOST INTAKTNIH TKIV

Da smo lahko določili vlažnost intaktnih tkiv v vejicah, smo naredili kalibracijo intenzitete MR signala z vlažnostjo, ki smo jo določili gravimetrično. Gravimetrično določena povprečna vlažnost vejic (U) je bila 60,7 %. Podatki merjenja so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Podatki gravimetrično določene vlažnosti na intaktnih vzorcih.

Št. vejice	Masa sveže vejice (g)	Masa suhe vejice (g)	Masa vode (g)	Vlažnost vejice (%)
1	6,864	2,5701	4,2939	62,6%
2	7,0841	2,5743	4,5098	63,7%
3	8,8439	3,4121	5,4318	61,4%
4	8,8159	3,3500	5,4659	62,0%
5	7,5297	2,9053	4,6244	61,4%
6	7,7497	2,9851	4,7646	61,5%
7	7,272	2,9326	4,3394	59,7%
8	7,503	3,0028	4,5002	60,0%
9	3,6805	1,5089	2,1716	59,0%
10	3,0997	1,2229	1,8768	60,5%
11	3,489	1,3811	2,1079	60,4%
12	4,882	1,8536	3,0284	62,0%
13	3,9139	1,6160	2,2979	58,7%
14	4,4878	1,8080	2,6798	59,7%
15	3,7766	1,5112	2,2654	60,0%
16	5,849	2,3907	3,4583	59,1%
				60,7%

Podatki povprečnih vlažnosti (U) so nam služili za izračun korekcijskega faktorja (KF) med povprečno intenziteto pikslov na MR slikah in dejansko vlažnostjo posameznih tkiv po enačbi (2). To smo opravili na intaktnih delih vseh vejic slikanih s 3D MR (pregl. 4).

Preglednica 4: Vrednosti povprečnih intenzitet pikslov (PIP) za vsako slikano vejico s 3D MR in pripadajoči korekcijski faktorji (KF).

Dan po poškodbi	0.dan	7.dan	14.dan	21.dan	28.dan	35.dan	42.dan	49.dan	56.dan
Oznaka vzorca	Ah 1	Ah 2	Ah 3	Ah 4	Ah 5	Ah 6	Ah 7	Ah 8	Ah 9
PIP	79,14	87,28	74,03	43,11	98,54	87,00	88,58	45,88	60,27
KF	0,77	0,70	0,82	1,41	0,62	0,70	0,69	1,32	1,01

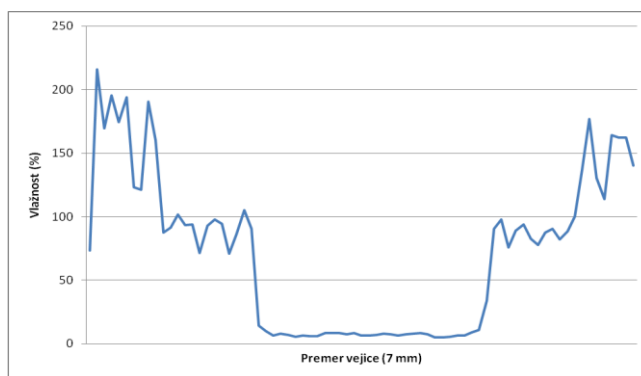
S pomočjo korekcijskih faktorjev (KF) smo lahko natančno določili vlažnost posameznih tkiv na določeni lokaciji znotraj vsake vejice po enačbi 3.

S tem postopkom je mogoče za vsak piksel MR slike izračunati vlažnost, kar obenem tudi pomeni, da lahko za vsako tkivo prav tako določimo njegovo vlažnost.

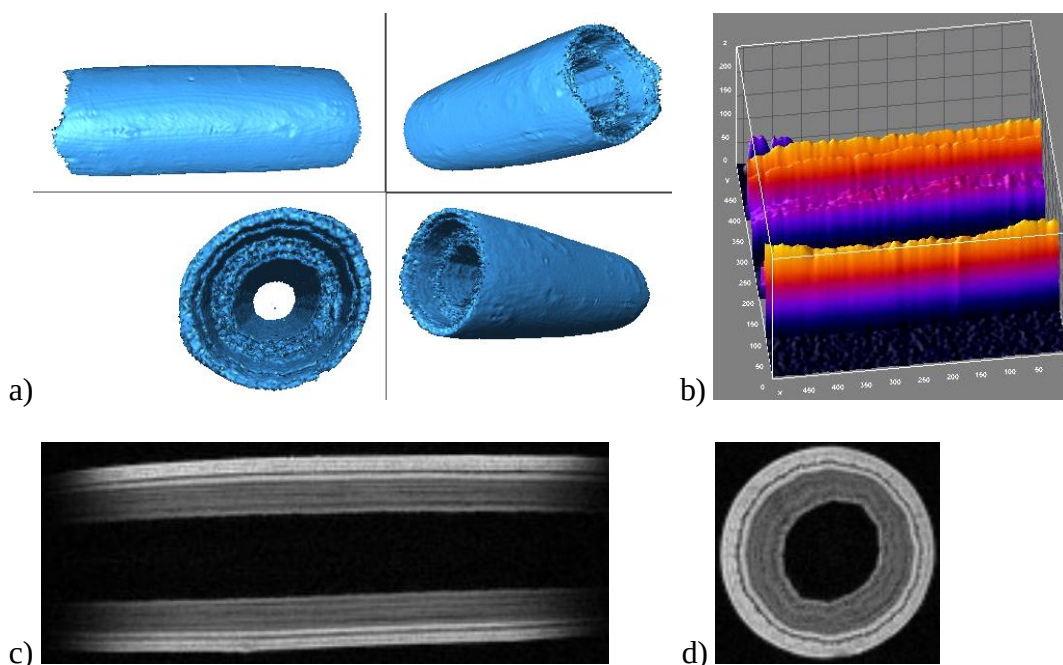
4.2 ODZIV VEJIC NA MEHANSKA POŠKODOVANJA

4.2.1 Analiza ranitvenega odziva in spremembe vlažnosti v mehansko poškodovanih tkivih

Kontrolno slikanje pred mehanskim poškodovanjem. Dne 7.4.2010 smo opravili kontrolno 3D MR slikanje pred mehanskim poškodovanjem vejice. Slikanje je prikazalo razporeditev vlažnosti, ki je prisotno v intaktnih tkivih vejice divjega kostanja. Radialni vlažnostni profil intaktnega dela vejice (sl. 7) je prikazal, da je najvišja vlažnost v območju prevodnega dela žive skorje, kjer je dosegla vrednost do 220 %. Neprevodni del žive skorje je imel vlažnost med 75 % in 100 %. Vlažnost je padala od kambijeve cone proti strženu, kjer je v njegovi neposredni bližini dosegla vrednost 15 %, medtem ko je bila vlažnost samega stržena le okoli 10 %. Vlažnost ranega in kasnega lesa se razlikuje približno za 30 %.



Slika 7: Radialni vlažnostni profil intaktnega dela vejice izračunan iz MR slike.

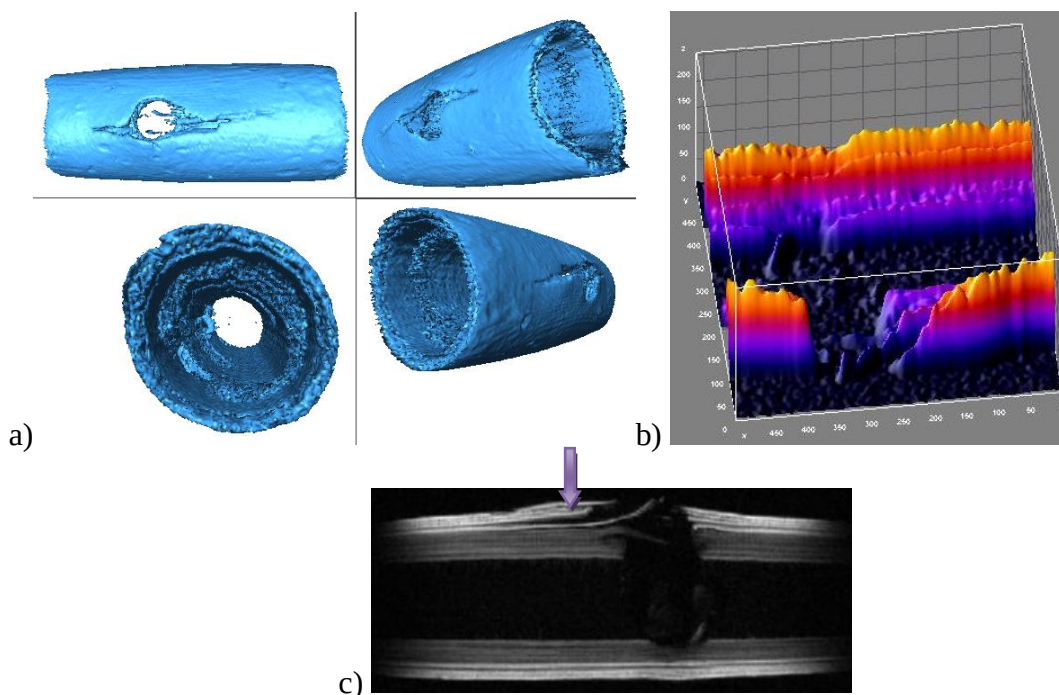


Slika 8: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); kontrolni nepoškodovani vzorec, odvzet dne 7.4.2010: a) 3D MR slika nepoškodovane vejice, b) reliefni diagram vlažnosti na lokaciji virtualnega vzdolžnega MR prereza, c) virtualni vzdolžni MR prerez in d) virtualni prečni MR prerez.

Kontrolno slikanje je razkrilo, da ima stržen zelo nizko vlažnost. Svetla področja na sliki 8c in 8d prikazujejo tkiva, ki so imela nizek MR signal, iz česar lahko sklepamo, da so leta imela vlažnost pod točko nasičenja celičnih sten. Na sliki 8a se lepo vidi cilindrična oblika vejice, posamezni krogi znotraj slikane vejice pa prikazujejo traheje ranega lesa oz. funkcionalna vlažna tkiva. Prav tako pa tudi tukaj temnejša in svetlejša področja ustrezajo različni vlažnosti posameznih tkiv, kar pomeni, da so tkiva, ki imajo večjo vlažnost,

obarvana bolj temno modro. Na grafu (sl. 8b) rumena področja ustrezajo svetlim področjem na sliki 8c, kar prikazuje kambijevo cono ter živi del skorje.

Odziv tkiv takoj po poškodovanju. 8.4.2010 smo takoj po poškodovanju vejice opravili 3D MR slikanje (sl. 9). To je pokazalo razporeditev vlažnosti, ki je prisotno v intaktnih tkivih in prvi oz. začetni odziv vejice na mehansko poškodbo.

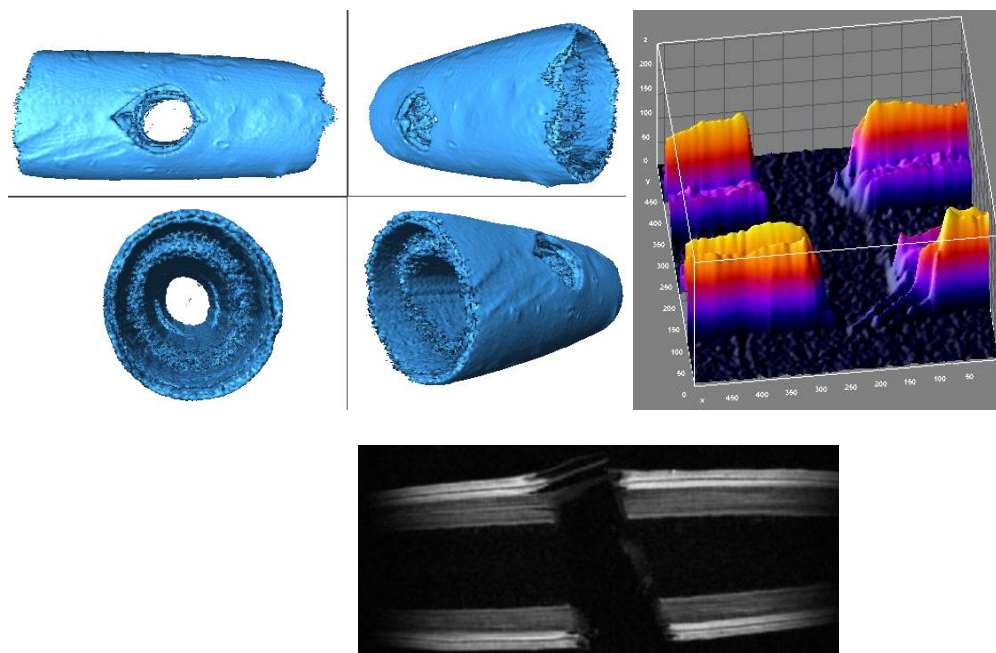


Slika 9: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 1; na dan poškodovanja (8.4.2010): a) 3D MR slika poškodovane vejice; b) reliefni diagram vlažnosti na lokaciji virtualnega vzdolžnega MR prereza in c) virtualni vzdolžni MR prerez poškodovane vejice.

Slika 9a razločno prikazuje mehansko poškodbo, vidna pa je tudi raztrganina skorje, ki je pri tem nastala. Na območju stržena so vidni ostanki tkiv (sl. 9c) z nekoliko večjo vlažnostjo v primerjavi z vlažnostjo stržena. Prav tako se razločno vidi dvig dela skorje (puščica), kar smo najverjetneje povzročili ob samem mehanskem poškodovanju (prevrtanju vejice).

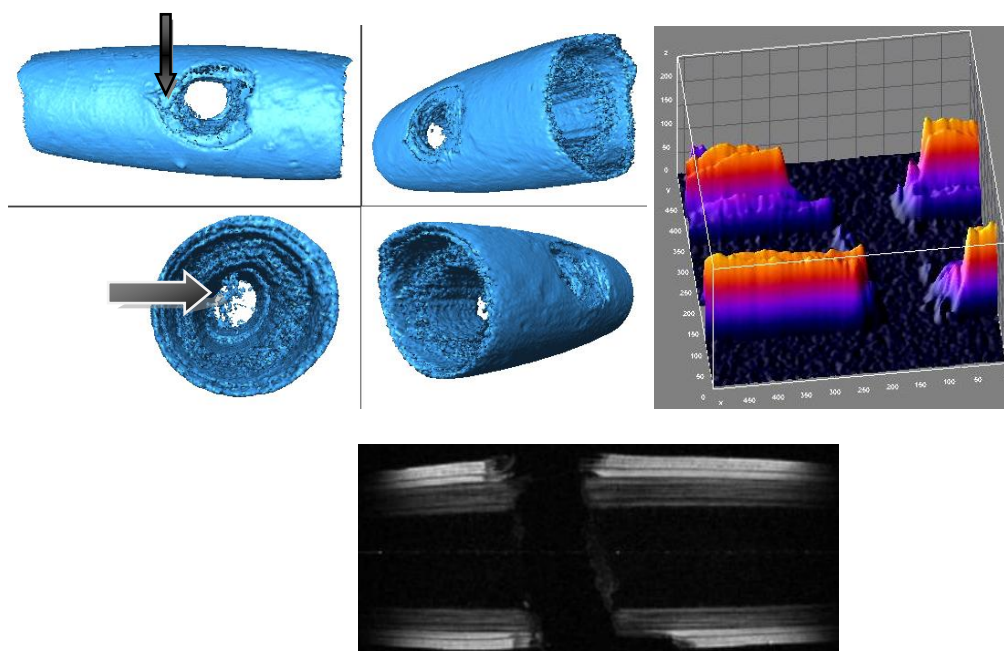
Odziv tkiv na sedmi dan (15.4.2010) po poškodovanju. Sedem dni po mehanskem poškodovanju je mogoče opaziti manjše spremembe v vlažnosti v neposredni bližini rane, kjer so se tkiva nekoliko osušila (sl. 10). Prav tako je izsušen tudi živi del skorje ob

poškodbi. V območju stržena so še vedno vidna tkiva z nekoliko večjo vlažnostjo (sl. 10c). Na 3D MR sliki (sl. 10a) je mogoče opaziti vretenasto obliko poškodbe skorje na zunanjem delu vejice. Pod skorjo se lokalno okoli poškodbe pojavi tkivo z nekoliko povečano vlažnostjo.



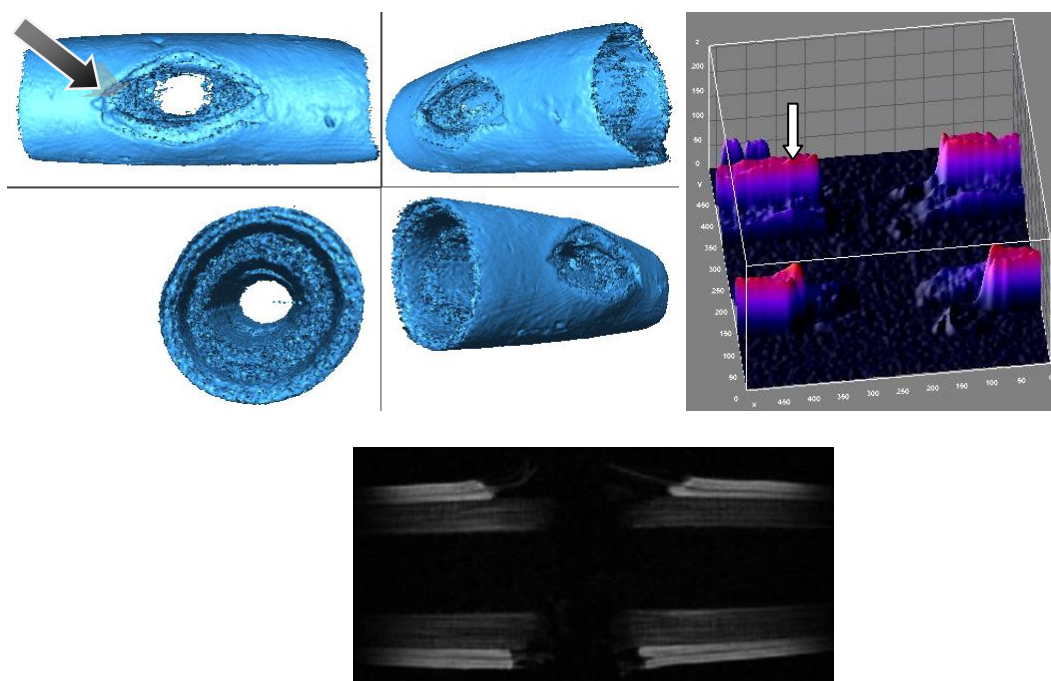
Slika 10: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 2; sedmi dan po poškodovanju (15.4.2010): tako virtualni vzdolžni MR prerez kot tudi reliefni diagram vlažnosti na lokaciji vzdolžnega MR prereza prikazujeta manjše spremembe v vlažnosti v neposredni bližini rane.

Odziv tkiv na štirinajsti dan (22.4.2010) po poškodovanju. Štirinajst dni po mehanskem poškodovanju je na 3D MR sliki mogoče opaziti povečan obseg nekroznega tkiva v območju skorje (sl. 11). V neposredni bližini stržena je mogoče opaziti tkivo, ki smo ga iz ksilema prenesli ob samem poškodovanju. Še vedno je v bližini poškodbe prisotno navlaževanje pod samo skorjo, medtem ko je skorja že popolnoma izsušena.



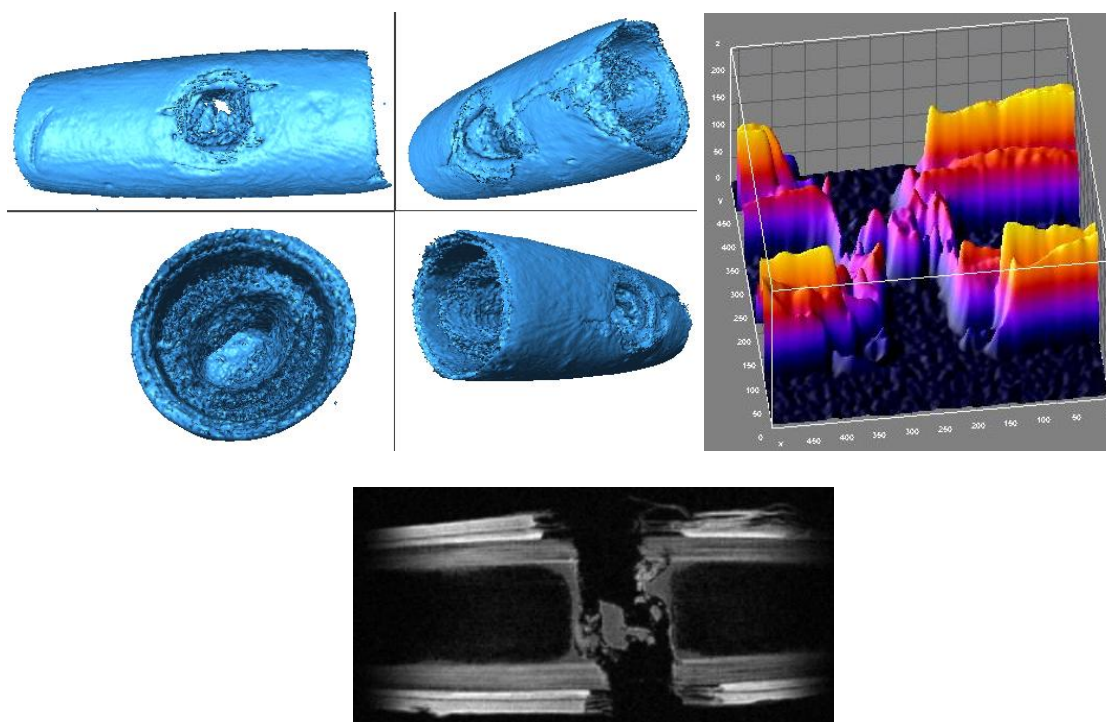
Slika 11: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 3; štirinajsti dan po poškodovanju (22.4.2010): viden povečan obseg nekroznega tkiva v območju skorje (puščica v navpični smeri), v območju stržena je prisotno tkivo, ki je posledica vrtanja (puščica v vodoravni smeri).

Odziv tkiv na enaindvajseti dan (29.4.2010) po poškodovanju. Enaindvajseti dan po poškodbi se na 3D MR sliki razločno vidi povečanje obsega odmrlih tkiv in tkiv, ki so nastala po poškodbi (sl. 12). Novonastala vlažna tkiva, na območju kambijeve cone ob mestu poškodbe, najverjetneje predstavljata kalus in poranitveni les. Okrog rane pa je tako na reliefnem diagramu kot na virtualnem vzdolžnem MR prerezu (sl. 12) opaziti izsušitev. Obseg izsušitve pa je večji v vzdolžni kot v prečni smeri, saj se tkiva hitreje izsušijo vzdolž aksialnih elementov. Posledica tega je vretenasta oblika izsušitve na površini vejice (puščica).



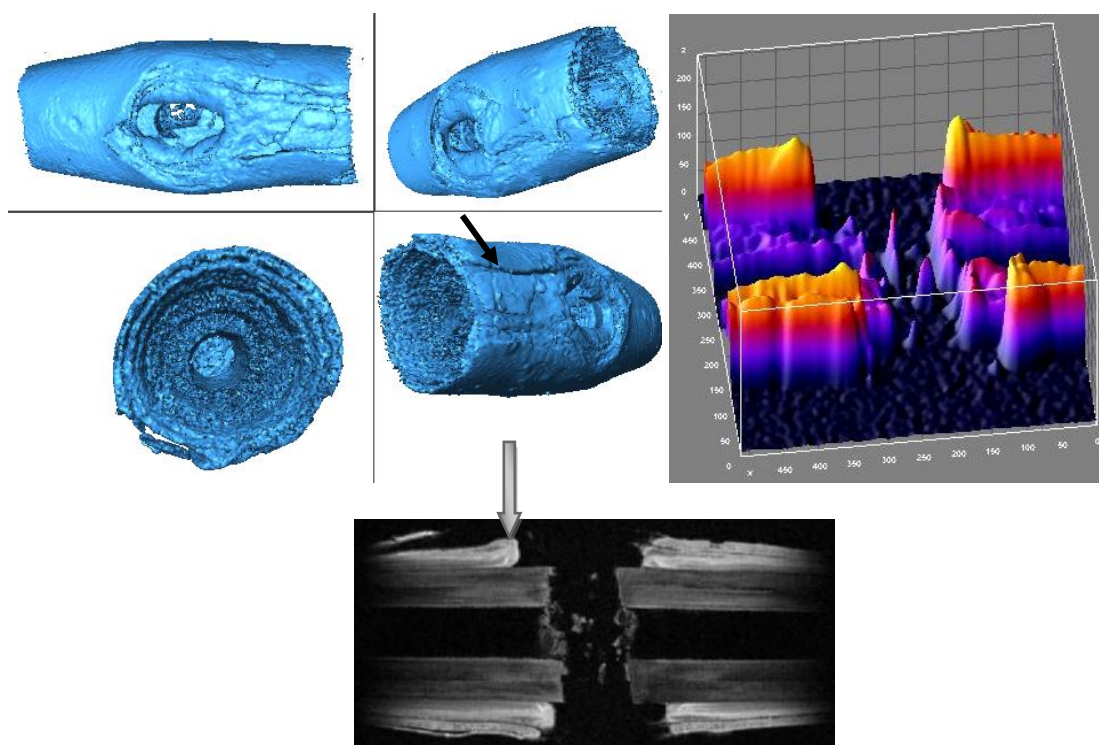
Slika 12: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 4; enaindvajseti dan po poškodovanju (29.4.2010): vidno povečanje obsega odmrlih tkiv in novonastali poranitveni les ter kalus. Na reliefnem diagramu vlažnosti na lokaciji vzdolžnega MR prereza je mogoče opaziti obsežnejšo izsušitev v vzdolžni smeri le na zgornji strani vejice, medtem ko ima tkivo na spodnji strani še nekoliko višjo vlažnost (puščica v navpični smeri).

Odziv tkiv na osemindvajseti dan (6.5.2010) po poškodovanju. Osemindvajset dni po poškodbi 3D MR slika ni razkrila bistvenih novih sprememb. Okrog rane je lepo viden poranitveni les. Na MR sliki v področju stržena, v neposredni bližini poškodbe, lahko opazujemo območje z nekoliko povečano vlažnostjo. Pri tem verjetno ne gre za odziv funkcionalnega tkiva na samo poškodbo, pač pa to predstavlja ostanek tkiva od poškodovanja vejice.



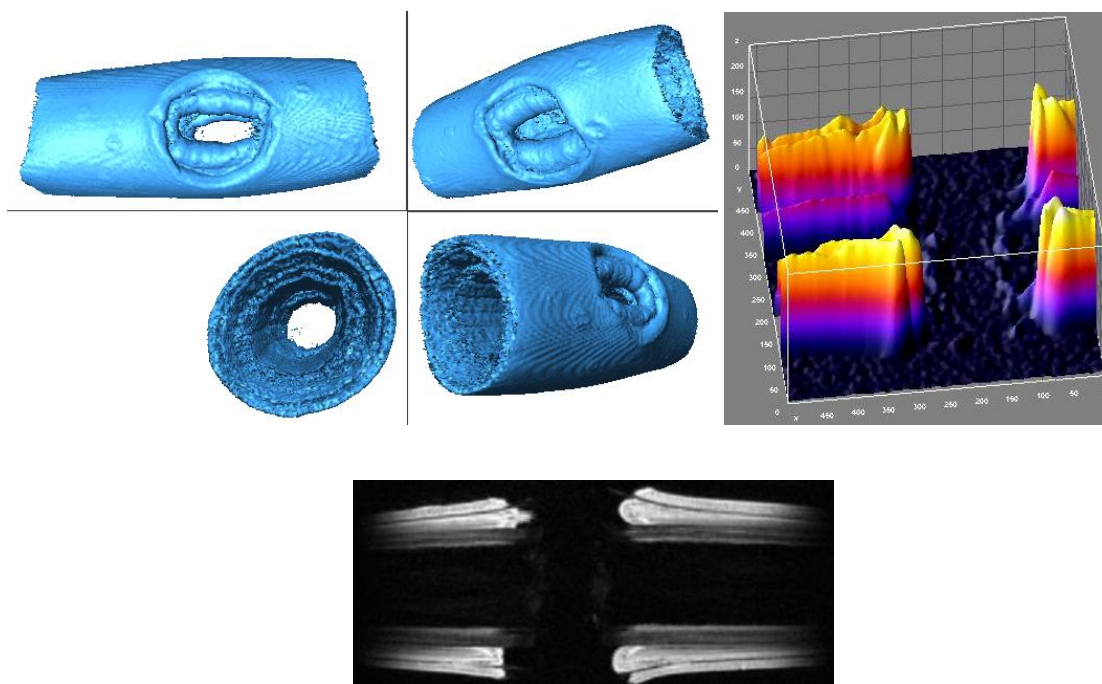
Slika 13: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 5; osemindvajset dni po poškodovanju (6.5.2010): vzdolžni MR prerez razločno prikazuje pojav vlažnega tkiva v neposredni bližini rane, kar predstavlja ostanek tkiva ob samem poškodovanju vejice. Drugih bistvenih vlažnostnih sprememb ni bilo opaziti.

Odziv tkiv na petintrideseti dan (13.5.2010) po poškodovanju. Pred 3D MR slikanjem na petintrideseti dan po poškodbi smo morali, zaradi povečanega obsega poranitvenega tkiva, tkiva okrog poškodbe nekoliko obrezati (sl. 14, črna puščica), sicer vejice ne bi mogli vstaviti v tuljavo. Kambij v bližini poškodbe je odmrli, razločno pa je vidno tudi, da se je okoliško tkivo skorje ob mestu poškodbe izsušilo in odmrlo. Zaradi nekroze se je povečal tudi sam obseg poškodbe. Na vzdolžnem MR prerezu je še vedno prisotna vlažna plast v notranjosti, v neposredni bližini rane. Prav tako lahko opazimo nastanek kalusa (puščica v navpični smeri).



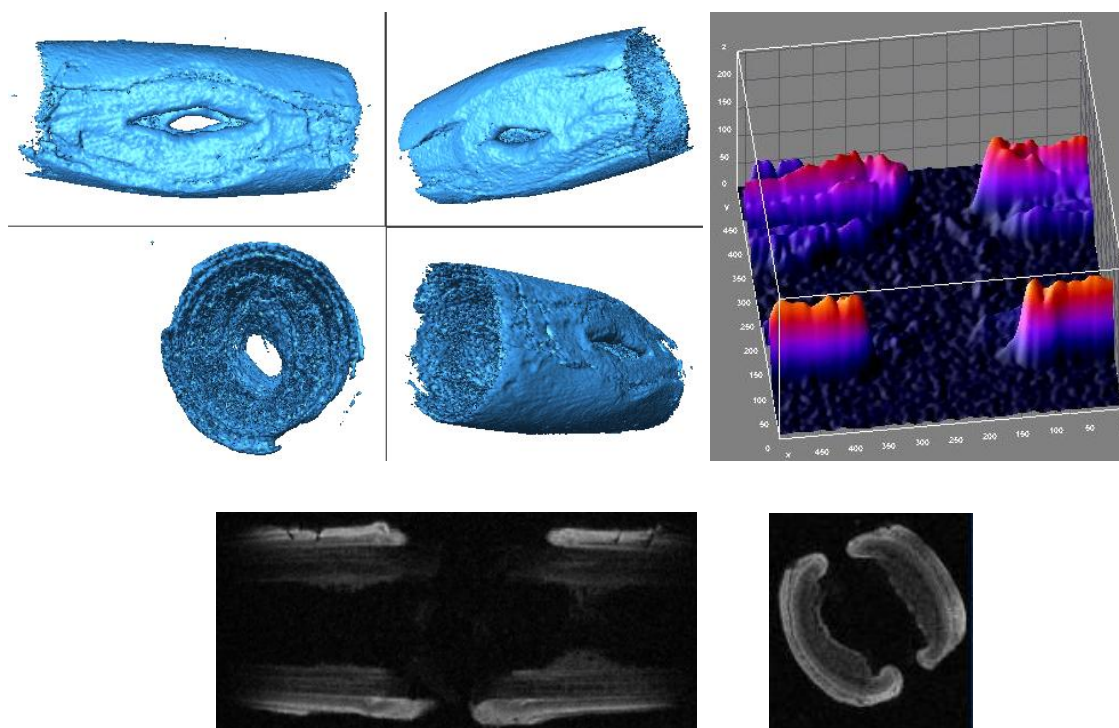
Slika 14: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 6; petintrideset dni po poškodovanju (13.5.2010): vzdolžni MR prerez jasno prikazuje nastanek kalusa (siva puščica). V notranjosti je še vedno prisotna vlažna cona, iz 3D MR slik pa je mogoče razbrati povečanje obsega poškodbe in poranitvenega lesa.

Odziv tkiv na dvainštirideseti dan (20.5.2010) po poškodovanju. Dvainštirideset dni po poškodbi nam 3D MR slika razkrije intenziven prirastek poranitvenih tkiv okrog rane (sl.15). Del poranitvenega lesa, vidnega na MR slikah, prekriva mrtva skorja. Reliefni diagram razločno prikaže, da imajo poranitvena tkiva bistveno višjo vlažnost. Na vzdolžnem MR prerezu pa je mogoče opaziti, da je vlažna plast v notranjosti poškodbe izginila, še vedno pa se intenzivno povečuje obseg kalusa.



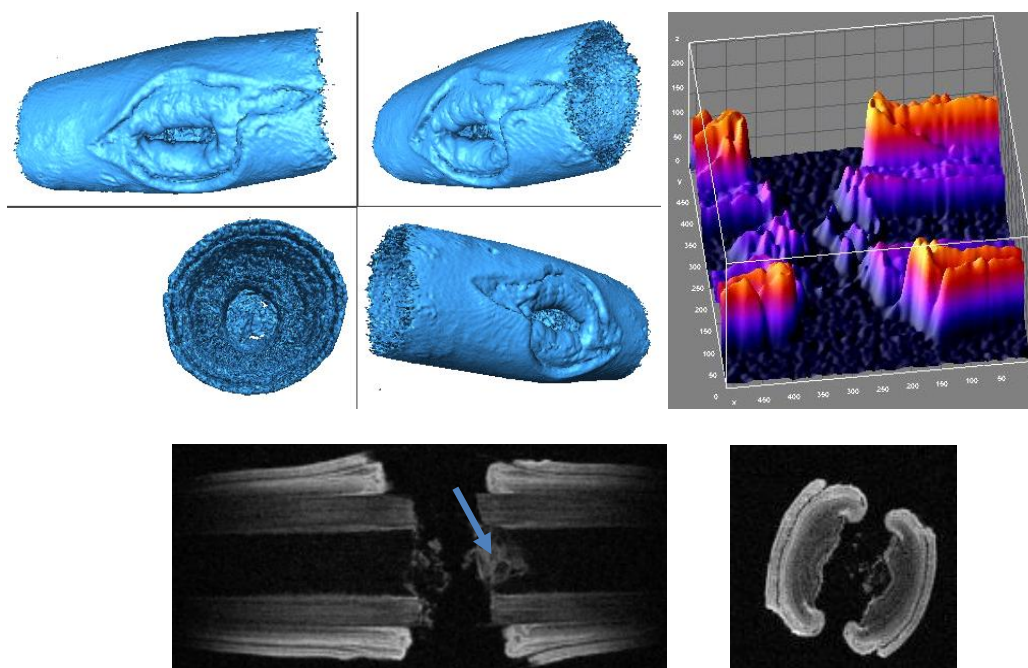
Slika 15: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 7; dvainštirideset dni po poškodovanju (20.5.2010): 3D MR slika razločno prikaže prirastek poranitvenega tkiva, katerega vidni del prekriva mrtva skorja. Na vzdolžnem MR prerezu je mogoče opaziti, da je vlažna cona (glej sliko 13) v notranjosti izginila.

Odziv tkiv na devetinštirideseti dan (27.5.2010) po poškodovanju. Zaradi povečanega obsega poranitvenega lesa in kalusa, smo tudi devetinštirideset dni po poškodbi morali vejico obrezati pred 3D MR slikanjem. Poranitveno tkivo je začelo preraščat poškodbo, kar se da opaziti na prečnem MR prerezu V primerjavi s prejšnjimi vzorci, je tukaj neprerasli del manjši. Reliefni diagram razkriva nižjo vlažnost tkiv v primerjavi z dvainštiridesetim dnem.



Slika 16: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 8; devetinštirideset dni po poškodbi (27.5.2010): poranitveno tkivo je začelo priraščati poškodbo. V primerjavi s 35. dnem se je vlažnost tkiv bistveno znižala. Prečni prerez razločno prikazuje povečanje obsega poranitvenih tkiv in preraščanje poškodbe.

Odziv tkiv na šestinpetdeseti dan (3.6.2010) po poškodovanju. Preraščanje poškodbe poteka hitreje v prečni smeri, kar najbolj nazorno prikazuje prečni MR prerez (sl. 16). Vz dolžni MR prerez je pokazal, da je vlažnost lesa, ki je nastal pred poškodbo, bistveno manjša od vlažnosti poranitvenih tkiv, ki so nastala po poškodbi. To je mogoče razbrati tudi iz reliefnega diagrama na lokaciji vzdolžnega MR prereza. V primerjavi z 49. dnem se v notranjosti na območju stržena zopet pojavi tkivo s povečano vlažnostjo (puščica).



Slika 17: Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum* L.); vzorec Ah 9; šestinpetdeseti dan po poškodbi (3.6.2010: na 3D MR slikah je mogoče opaziti vretenasto obliko poškodbe na periferiji ter njen povečan obseg. V notranjosti se zopet pojavi tkivo z višjo vlažnostjo, kar je mogoče razbrati tudi iz reliefnega diagrama na lokaciji virtualnega prečnega MR prereza.

5 RAZPRAVA

Naša raziskava odziva tkiv navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) na mehanska poškodovanja je pokazala, da je 3D MRI metoda primerna za opazovanje sprememb v vlažnosti in nastanka novih tkiv po poškodbi. 3D MR slika intaktne vejice je jasno pokazala zgradbo navadnega divjega kostanja, pri katerem je bilo opaziti stržen z zelo nizko vlažnostjo ter bolj vlažna področja trahej ranega lesa, kambijeve cone in živi del skorje.

Pri opazovanih vejicah smo takoj po poškodovanju opazili površinsko izsušitev tkiv, ki so se nahajala v neposredni bližini poškodbe. Vlažna ksilemska tkiva so bila izpostavljena atmosferskim pogojem, kar je povzročilo izsušitev, ki je prvi odziv tkiv na mehanska poškodovanja. Prav tako se je izsušil živi del skorje v neposredni bližini rane. Menimo, da se izsušitev takoj po poškodbi pojavi pri vseh drevesnih vrstah. Sedmi dan po poškodbi so se v neposredni bližini stržena pojavila tkiva z nekoliko povečano vlažnostjo, prav tako pa se je pod skorjo lokalno začelo navlaževati tudi tkivo ob rani. Štirinajst dni po poškodbi se je povečal obseg nekroznega tkiva v območju skorje. Še vedno pa je bilo prisotno navlaževanje pod samo skorjo, medtem ko je bila le-ta že popolnoma izsušena. Enaindvajset dni po poškodbi je bilo opaziti povečan obseg odmrlih tkiv in nastanek sekundarnih poranitvenih tkiv. Sklepamo, da je v tem času pričel nastajati kalus ter poranitveni les. Okrog rane je bilo še vedno mogoče opazovati lokalno izsušitev, katere obseg je bil večji v vzdolžni smeri, kar je posledica hitrejšega izsuševanja v aksialni smeri, t.j. vzdolž aksialnih elementov. Posledica tega je bila vretenasta oblika izsušitve, ki jo je bilo mogoče opaziti na površini vejice. Osemindvajseti dan po poškodbi je bilo okrog rane mogoče jasno opaziti poranitveni les. Na območju stržena, v neposredni bližini poškodbe, se je pojavilo vlažno območje, ki je bilo prisotno do petintridesetega dne. Med osemindvajsetim in petintridesetim dnom je prišlo tudi do odmiranja meristema (kambija), prav tako se je del tkiv ob mestu poškodbe izsušil in odmrl. Zaradi nekroze se je povečal obseg. Na MR prerezu je bilo opaziti očiten nastanek kalusa. Med petintridesetim in dvainštiridesetim dnom smo opazovali intenziven prirastek kalusa in poranitvenih tkiv, ki so imela povečano vlažnost, kar je bilo mogoče tudi razbrati iz reliefnega diagrama vlažnosti. Na MR slikah smo na devetinštirideseti dan po poškodbi opazili, da je poranitveno tkivo pričelo preraščat poškodbo. Šestinpetdeseti dan po poškodbi so 3D MR

slike razkrile, da je preraščanje poškodbe potekalo hitreje v prečni smeri. V notranjosti, v neposredni bližini rane, se je zopet pojavilo tkivo z nekoliko povišano vlažnostjo. Iz reliefnega diagrama smo razbrali, da je vlažnost lesa, ki je nastal pred poškodbo, nižja od vlažnosti poranitvenih tkiv, ki so nastala po poškodbi.

3D MR slikanje je tako razkrilo vlažnostne spremembe po poškodbi in nekatere specifične odzive drevesnih tkiv na poškodbo. Pričakovali smo, da bo dinamika vlažnostnih sprememb v lesu navadnega divjega kostanja razkrila tudi nastanek reakcijske cone, kakršno je opisoval Merela (2008), ko je proučeval odziv tkiv na mehansko poškodbo pri navadni bukvi (*Fagus sylvatica* L.) in hrastu dobu (*Quercus robur* L.), vendar se to ni zgodilo.

Menimo, da je na nastanek le-te vplivala sama oblika poškodbe (luknja) in tudi specifičen odziv tkiv navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) na mehansko poškodbo.

6 SKLEPI

3D MRI metoda se je izkazala kot zelo primerna za opazovanje in spremljanje dinamike vlažnostnih sprememb in poranitvenih procesov v mehansko poškodovanih tkivih navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.).

NMR meritve so pokazale, da je ECHO signal odvisen od količine vode v lesu. Višja kot je bila vlažnost lesa, svetlejši je bil prikaz vlažnega tkiva na MR slikah.

3D MR slike razločno ilustrirajo anatomsko zgradbo vejice navadnega divjega kostanja. Jasno je bil viden stržen z nizko vlažnostjo, cilindrični obroči so prikazovali območja trahej ranega lesa, razločno pa se je videl tudi kambij ter pripadajoč živi del skorje. Tkiva z majhno vsebnostjo vode na MR slikah niso bila vidna.

3D MR slikanje mehansko poškodovanih tkiv je omogočilo vpogled v vlažnostne spremembe v tkivih ter opazovanje poranitvenih tkiv, ki predstavljajo integralni del procesa kompartmentalizacije.

Takoj po mehanskem poškodovanju smo s 3D MR slikanjem opazili izsušitev tkiv v neposredni bližini rane. Sedmi dan po poškodbi se tkivu v neposredni bližini rane vlažnost nekoliko poveča. Med sedmim in štirinajstim dnem se tkivo pod izsušeno skorjo navlažuje. Izsuševanje je najbolj intenzivno v vzdolžni smeri, zaradi česar nastane vretenasta oblika izsušitve na površini vejice. Med štirinajstim in osemindvajsetim dnem se na območju stržena pojavi tkivo s povišano vlažnostjo. Okrog rane je opaziti poranitveni les. Petintrideseti dan je opaziti progresivno odmiranje kambija in skorje, prav tako se je izsušil in odmrl del tkiva ob rani. Opaziti je bilo tudi nastanek kalusa. Opažen je bil tudi intenziven prirastek poranitvenih tkiv z večjo vlažnostjo. V notranjosti je izginila vlažna plast. Devetinštirideseti dan je poranitveno tkivo začelo preraščat poškodbo. Šestinpetdeseti dan, ko smo vejico zadnjič slikali, je bilo opaziti obsežen nastanek poranitvenih tkiv in s tem preraščanje poškodbe v prečni smeri.

Vlažnost lesa, ki je nastal pred poškodbo, je bila nižja od vlažnosti poranitvenih tkiv. V notranjosti se je zopet pojavilo tkivo s povečano vlažnostjo.

Odziv tkiv navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) na mehanska poškodovanja je bil drugačen od odziva tkiv navadne bukve in doba (Merela, 2008), saj je pri navadnem divjem kostanju izostala reakcijska cona.

Predvidevamo, da je bil ranitveni odziv drugačen zaradi različne vrste poškodbe (luknja) ter tudi specifičnosti obrambnih mehanizmov pri posameznih drevesnih vrstah.

Prednost 3D MR metode slikanja lesa je predvsem v tem, da je nedestruktivna, omogoča prikaz objekta v virtualnem prostoru vrtljivih 3D slik, možnost raziskav *in situ* ter *in vivo*, analizo prostorskih in funkcionalnih razmerij med proučevanimi tkivi ter raziskovanje katerekoli virtualne ravnine brez fizičnega posega v vzorec.

7 POVZETEK

Drevesa navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) se zelo pogosta v urbanem okolju, kjer so tudi nenehno izpostavljena mehanskim poškodbam. Le te lahko povzročajo dejavniki nežive (snegolom, vetrolom, požari) in žive narave (rastlinojeda divjad, insekti, glive) ter ljudje (vandalizem, obžagovanje, sečnja). Mehanska poškodba je prva faza v zaporedju kompleksnih procesov, ki v lesu sprožijo razvoj lokaliziranih sprememb.

Pri navadnem divjem kostanju smo s tridimenzionalnim magnetno resonančnim slikanjem (3D MRI) raziskovali odziv tkiv na mehanska poškodovanja. Želeli smo raziskati vlažnostne spremembe v mehansko poškodovanih tkivih ter pojasniti morebitno povezavo med vlažnostnimi spremembami in nastankom novih tkiv. Prav tako smo hoteli pojasniti anatomijo poranitvenih tkiv in ugotoviti specifične značilnosti ranitvenega odziva pri navadnem divjem kostanju (*Aesculus hippocastanum* L.).

Za spremljanje odziva tkiv na mehanska poškodovanja in vlažnostne spremembe smo si izbrali dve sosednji drevesi, ki rasteta v primestnem gozdu na Rožniku. Na obeh smo izbrali 20 vejic (8 na prvem in 12 na drugem drevesu), katerih povprečni premer je bil 8 mm in starost 4 leta. 11 vejic smo poškodovali tako da smo skozi celoten premer vejice z baterijskim vrtnikom zavrtali luknjo premera 3 mm. Vse vejice smo poškodovali 8. aprila 2010. Poškodovane vejice smo označili s plastičnimi oznakami, na katerih so bile napisane zaporedne številke. Poškodovane segmente vejic smo preiskovali s pomočjo 3D MR slikanja, kar smo opravili v tedenskih intervalih, do 56. dne, ko smo opravili zadnje MR slikanje.

Vse MR preiskave so potekale na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za fiziko trdne snovi (F1), v laboratoriju za MRI. Dodatna obdelava in analiza MR slik je bila opravljena s programom ImageJ (NIH, USA) in Amira 4.0 (Mercury, Berlin). Pred vsakim slikanjem smo vejico prenesli v MRI laboratorij. Nanjo smo pritrdili RF tuljavo, ki je imela premer 10 mm. Vse skupaj pa smo nato vstavili v gradientno tuljavo v centru horizontalnega magneta. Visokoločljivo slikanje smo izvedli pri naslednjih parametrih: vidno polje (FOV): 25 mm, matrika slikanja: 256 x 256 x 128 vokslov, čas spinskega odmeva (TE): 2,4 ms, čas med RF zaporedji (TR): 500 ms, prostorska ločljivost slikanja: 100 μ . Čas

slikanja pri osmih povprečitvah je bil 18 ur in 32 minut. Vse vejice smo shranili za nadaljnje anatomske preiskave.

Meritve NMR so pokazale, da je MR signal, ki ga dobimo iz lesa, direktno sorazmeren z deležem vode v lesu. Večja kot je bila vlažnost vejice, svetlejši je bil prikaz tkiva na MR sliki. 3D MR slike so razkrile informacije o lokaciji in obliki posameznih tkiv ter vlažnostna stanja posameznih tkiv, pri čemer smo si pomagali tudi z virtualnim MR prerezom.

3D MRI metoda se je izkazala kot zelo primerna za opazovanje in spremljanje dinamike vlažnostnih sprememb in poranitvenih procesov v mehansko poškodovanih tkivih navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.).

NMR meritve so pokazale, da je ECHO signal odvisen od količine vode v lesu. Višja kot je bila vlažnost lesa, svetlejši je bil prikaz vlažnega tkiva na MR slikah.

3D MR slike razločno ilustrirajo anatomsko zgradbo vejice navadnega divjega kostanja. Jasno je bil viden stržen z nizko vlažnostjo, cilindrični obroči so prikazovali območja trahej ranega lesa, razločno pa se je videl tudi kambij ter pripadajoč živi del skorje. Tkiva z majhno vsebnostjo vode na MR slikah niso bila vidna.

3D MR slikanje mehansko poškodovanih tkiv je omogočilo vpogled v vlažnostne spremembe v tkivih ter opazovanje poranitvenih tkiv, ki predstavljajo integralni del procesa kompartmentalizacije.

Takoj po mehanskem poškodovanju smo s 3D MR slikanjem opazili izsušitev tkiv v neposredni bližini rane. Sedmi dan po poškodbi se tkivu v neposredni bližini rane vlažnost nekoliko poveča. Med sedmim in štirinajstim dnem se tkivo pod izsušeno skorjo navlažuje. Izsuševanje je najbolj intenzivno v vzdolžni smeri, zaradi česar nastane vretenasta oblika izsušitve na površini vejice. Med štirinajstim in osemindvajsetim dnem se na območju stržena pojavi tkivo s povišano vlažnostjo. Okrog rane je opaziti poranitveni les. Petintrideseti dan je opaziti progresivno odmiranje kambija in skorje, prav tako se je izsušil in odmrll del tkiva ob rani. Opaziti je bilo tudi nastanek kalusa. Opažen je bil tudi intenziven prirastek poranitvenih tkiv z večjo vlažnostjo. V notranjosti je izginila vlažna plast. Devetinštirideseti dan je poranitveno tkivo začelo preraščat poškodbo. Šestinpetdeseti dan, ko smo vejico zadnjič slikali, je bilo opaziti obsežen nastanek poranitvenih tkiv in s tem preraščanje poškodbe v prečni smeri.

Vlažnost lesa, ki je nastal pred poškodbo, je bila nižja od vlažnosti poranitvenih tkiv. V notranjosti se je zopet pojavilo tkivo s povečano vlažnostjo.

Odziv tkiv navadnega divjega kostanja (*Aesculus hippocastanum* L.) na mehanska poškodovanja je bil drugačen od odziva tkiv navadne bukve in doba (Merela, 2008), saj je pri navadnem divjem kostanju izostala reakcijska cona.

Predvidevamo, da je bil ranitveni odziv drugačen zaradi različne vrste poškodbe (luknja) ter tudi specifičnosti obrambnih mehanizmov pri posameznih drevesnih vrstah.

Prednost 3D MR metode slikanja lesa je predvsem v tem, da je nedestruktivna, omogoča prikaz objekta v virtualnem prostoru vrtljivih 3D slik, možnost raziskav *in situ* ter *in vivo*, analizo prostorskih in funkcionalnih razmerij med proučevanimi tkivi ter raziskovanje katerekoli virtualne ravnine brez fizičnega posega v vzorec.

8 VIRI

1. Brus R. 2005. Dendrologija za gozdarje. Univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 263-264
2. Cox J., McDonald P. J., Gardiner B. A. 2010. A study of water exchange in wood by means of 2D NMR relaxation correlation and exchange. *Holzforschung*, 64, 2: 259-266
3. Čufar K. 2006. Anatomija lesa. Univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 150 str.
4. Dujesiefken D., Drenou C., Oven P., Stobbe H. 2005. Codit model. *Urban and forests and trees*, 429-432
5. Esau K. 1965. *Plant anatomy*. New York, John Wiley & Sons: 767 str.
6. Gorišek Ž. 2009. Les-Zgradba in lastnosti. Njegova variabilnost in heterogenost. Univerzitetni učbenik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 178 str.
7. Liese W., Dujesiefken D. 1996. Wound reactions of trees. V: *Forest trees and palms. Diseases and control*. Raychaudhuri S.P. in Maramorosch K. (ur.). New Delhi, Oxford & IBH Publishing Co.: 21-35
8. Merela M. 2008. Anatomske, hitokemične in mikrookoljske spremembe v mehansko poškodovanem lesu bukve (*Fagus sylvatica*) in doba (*Quercus robur*): doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 220 str.
9. Oven P. 1997. Odziv sekundarnega floema in ksilema ter kambija na mehanske poškodbe bele jelke (*Abies alba* Mill), navadne smreke (*Picea abies* Karst.), rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) in evropskega macesna (*Larix decidua* Mill): doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 167 str.
10. Oven P. 1999. Odziv drevesnih vrst na poškodbe in infekcijo. 2. Kambijeva cona. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 58: 189-217
11. Oven, P., Merela M., Serša I., Mikac U. 2008. Raziskava zgradbe lesa s tri-dimenzionalnim magnetno resonančnim slikanjem. *Les*, 60: 7-11

12. Oven P., Zupančič M., Merela M., Torelli N. 2004. Zgradba reakcijskih con pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.). Zbornik gozdarstva in lesarstva, 73: 41-62
13. Pearce R.B., S. S., Doran S.J., Carpenter T.A., Hall L.D. 1994. Non – invasive imaging of fungal colonization and host response in the living sapwood of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) using nuclear magnetic resonance. Psychological and Molecular Plant Pathology, 45: 359-384
14. Pirnat M. 2009. Nastanek površinskega kalusa pri navadnem divjem kostanju. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 4-5
15. Shain L. 1979. Dynamic responses of differentiated sapwood to injury and infection. Phytopathology, 69, 10: 1143-1147
16. Shigo A.L., Marx H.G. 1977. Compartmentalization of Decay in Trees. USDA Forest Service Agriculture Information Bulletin, 405: 73 str.
17. Shortle W. C., Smith K. T., Dudzik K. R., Parker S. 1995. Response of maple sapwood to injury and infection. European Journal of Forest Pathology, 25, 5: 241-252
18. Torelli N. 1998. Daljinski transport vode v drevesu – vodni potencial. Les, 50, 6: 169-173
19. Torelli N. 2000. Točka nasičenja celičnih sten (TNCS) – pregled. Les, 52, 5: 141 - 147
20. Torelli N. 2001. Odziv drevja na globoke in površinske poškodbe na primeru bukve (*Fagus sylvatica* L.) s poudarkom na nastanku in ekologiji ranitvenega lesa (»rdeče srce«) (pregled). Gozdarski vestnik, 59, 2: 85-94
21. Torelli N., Gorišek Ž., Oven P., Merela M. 2005. Mokro srce pri jelki (*Abies alba* Mill.). Les, 57, 1-2: 4-10
22. Torelli N. 2006. Vpliv razvoja, staranja in poškodovanj drevesa na lastnosti in kvaliteto lesa. Gozdarski vestnik, 64, 9: 428-441

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Primožu Ovnu in somentorju dr. Maksu Mereli za vso korektnost, nasvete, osebno zavzetost, dostopnost in strokovno svetovanje ter predvsem za porabljen čas. Zavedam se, da brez njunega bogatega znanja in nesebične pomoči moje diplomsko delo ne bi imelo sedanje podobe.

Rada bi se zahvalila tudi recenzentu doc. dr. Igorju Serši za kritično branje in presojo diplomskega dela.

Hvala tudi Urši Mikac in Ani Sepe za vso pomoč pri slikanju z magnetno resonanco.

Hvala Davidu, ker me sprejema takšno kot sem. V vseh mojih vzponih in padcih je verjel vame in me optimistično spodbujal.

Iskrena hvala tudi očetu in mami za vso podporo in finančno pomoč, ki sta mi jo nudila v času študija, ter sestri Branki.

Hvala tudi vsem prijateljem in študijskim kolegom, ki jih nisem posebej omenila, da so me znali potegniti iz vsakdanje rutine in mi polepšali študijska leta.

Hvala!

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA LESARSTVO

Vanja LAVK

**ANALIZA ODZIVA TKIV
NA MEHANSKA POŠKODOVANJA
PRI NAVADNEM DIVJEM KOSTANJU
S TRIDIMENZIONALNIM MAGNETNO
RESONANČNIM SLIKANJEM**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2010