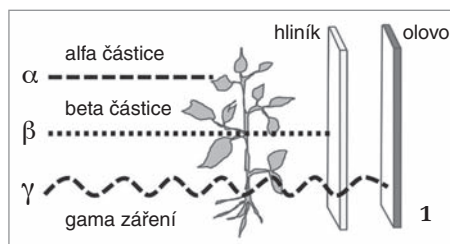


# Vybrané radioanalytické metody ve službách experimentální biologie rostlin

**Radioanalytické metody využívající ionizující záření jsou pro většinu laiků známé v souvislosti s lékařskými diagnostickými technikami nebo léčbou karcinogenních onemocnění. Ionizující záření je však možné využít i ve výzkumu jiných oblastí, např. na datování v geologii či archeologii. V tomto článku přiblížíme možnosti jeho použití ve studiu rostlinných objektů, tedy v experimentálně botanicky zaměřeném výzkumu, kterému se věnujeme na katedře ekochemie a radioekologie Fakulty přírodních věd Univerzity sv. Cyrila a Metoděje v Trnavě na Slovensku.**

Radioaktivita představuje přirozenou nebo uměle navozenou přeměnu či rozpad jader atomů. Taková přeměna je (zjednodušeně) provázená vyzářením částic  $\alpha$  (v podstatě atomů helia  ${}^4_2\text{He}^{2+}$ ) nebo částic  $\beta^-$  (elektronů),  $\beta^+$  (ekvivalentů kladně nabitého elektronu – pozitronu) či  $\gamma$ -fotonů. Po přeměně jader mají vyzářené (emitované) částice různou energii a od toho se odvíjí i jejich využití (obr. 1).

Pro pochopení radioanalytických metod je třeba definovat pojem nuklid jako prvek charakterizovaný určitým počtem protonů a neutronů v jádře. Radionuklid (radioaktivní nuklid) je atom, který má nestabilní jádro a nadbytečnou jadernou energii, a proto podléhá přeměně, při níž vyzářuje určitý typ záření. Různé atomy jednoho prvku, které mají stejný počet protonů, ale navzájem se liší počtem neutronů a mají tedy i rozdílné nukleonové číslo (součet protonů a neutronů, který se píše v exponentu před značkou prvku), mohou být stabilní, nepodléhající rozpadu (stabilní nuklidy), nebo rozpadu podléhající (radioizotopy). Radioizotopy mohou škodlivě působit na živé organismy v důsledku vyzářovaného ionizačního záření, přičemž jeho vliv na organismy závisí na druhu záření, jeho energii a absorbované dávce. V neškodné míře se přirozeně vyskytují



kolem nás (např. draslík  ${}^{40}\text{K}$ , radium  ${}^{226}\text{Ra}$  nebo thorium  ${}^{232}\text{Th}$ ). Pro radioanalýzu u rostlin se před více než 70 lety začal používat radioizotop uhlíku  ${}^{14}\text{C}$  při studiu fotosyntézy. Intenzita emitovaného záření tohoto radioizotopu klesne na polovinu zhruba za 20 min (poločas přeměny –  $T_{1/2}$ ). Proměnou  $\beta^+$  a elektronovým záchytem se mění na stabilní izotop boru  ${}^{11}\text{B}$ . Běžně se používá i radioizotop dusíku  ${}^{13}\text{N}$  ( $T_{1/2}$  má asi 10 min). Ačkoli oba prvky jsou nezastupitelné jako klíčové složky živých organismů, jejich nevýhodou je poměrně krátká doba „životnosti“. Během experimentu by u použitého izotopu totiž nemělo proběhnout více než 10 poločasů rozpadu (pak zbyde jen 1/1024 z původního množství). Např. s radioizotopem  ${}^{11}\text{C}$  (a látkami jím značenými) se nedá pracovat déle než 200 minut. Delší dobu lze použít např. izotopy mědi  ${}^{64}\text{Cu}$  (poločas přeměny 12,8 hod.),

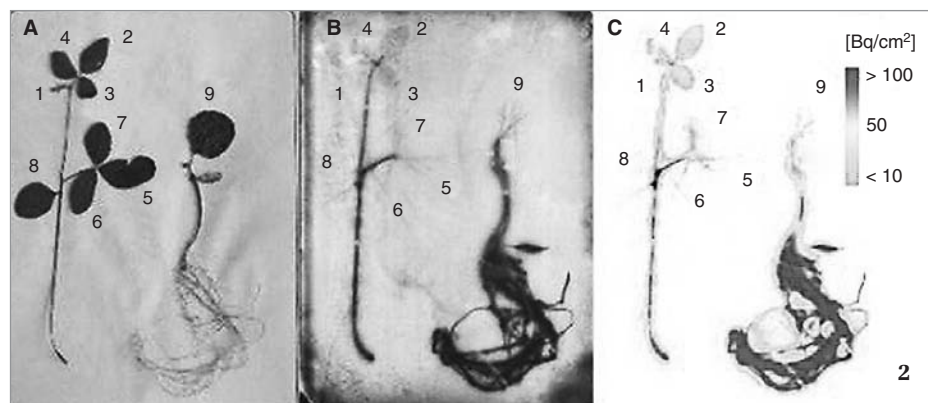
zinku  ${}^{65}\text{Zn}$  (244 dní) nebo manganu  ${}^{54}\text{Mn}$  (312 dní). Izotopy jsou však použitelné i jako chemicky vázaná součást větší molekuly. Typickým příkladem je D-glukóza značená fluorem  ${}^{18}\text{F}$  ( $T_{1/2}$  109,8 min), která se jako radiofarmakum aplikuje v diagnostických lékařských metodách ke zjištění rakovinných buněk – ty ji metabolizují nejintenzivněji a radioaktivní „ložiska“ odhalí umístění nádoru.

Při laboratorní práci obvykle používáme radioizotopy ve velmi nízkých koncentracích (tzv. beznosičové roztoky radioizotopů), a proto k nim přidáváme nosičové látky (stabilní izotopy daného prvku) anebo indikátory. V praxi to znamená, že do vzorku s příslušnou stabilní formou prvku přidáme známé množství radioaktivního izotopu, a tedy ho ředíme. Na konci pokusu ředění zohledníme při stanovení obsahu daného kovu ve vzorku. Pokusné rostliny přijímají radioizotopy ze živného média kořeny, přičemž jejich transport a chování v rostlině se liší od příslušných stabilních forem pouze minimálně. V následujícím textu popíšeme vybrané metody, které takové radionuklidy nebo radioizotopy využívají pro studium rostlin, jmenovitě autoradiografii, scintilační gamaspektrometrii a pozitronovou emisní tomografii. Všechny mají velmi dobré uplatnění nejen pro přímou detekci a kvantifikaci (kovových) radioizotopů v rostlině, ale umožňují sledovat i jejich transport a ukládání v rostlinných pletivech.

## • Autoradiografie

Ionizující záření je neviditelné, a musí být proto přeměněno na jinou, snáze měřitelnou veličinu. Většinou jde o elektrický proud, případně chemickou nebo světelnou energii. Jednu z nejjednodušších zobrazovacích a v současnosti už klasických radioanalytických metod představuje autoradiografie, která v poměrně tenkých vzorcích (např. pletiva rostlin) umožňuje detekovat záření radionuklidů aplikovaných na fotografickém filmu. Princip metody je založený na interakci chemikálií v tenké vrstvě želatiny na filmu (nejčastěji halogenidy stříbra) a ionizujícího záření ve tmě, čímž se aktivují kationty stříbra v místech zasažených zářením a vzniká latentní zobrazení. V dalším kroku je film vyvolán – ve vývojce s redukčním činidlem (např. hydrochinonem) se ozářené kationty stříbra redukuje na elementární stříbro a vytvoří na filmu tmavé skvrny. Neozářené ionty stříbra zůstávají beze změny a zanechají po odmytí bílé pozadí. Tím se na filmu vytvoří „otisk“ pozice radionuklidů v analyzované rostlině (obr. 2).

Dnes se dá metoda autoradiografie použít klasickou cestou, ale i ve spojení s informačními technologiemi. Mnohé vysoce kvalitní skenovací a zobrazovací systémy (založené především na principu fosforescence) jsou vhodné na detekci i na kvantifikaci záření. Metodu lze použít např. na pozorování a vyhodnocení strategií rostlin pro ukládání toxických kovů v různých rostlinných pletivech. Jak vyplývá z obr. 2, rozložení přijatých kovů (jejich izotopů) na úrovni celých rostlin není vůbec homogenní či rovnoměrné. Rostliny totiž uplatňují řadu mechanismů, s rozdílnou úspěšností, aby odstranily nebo alespoň

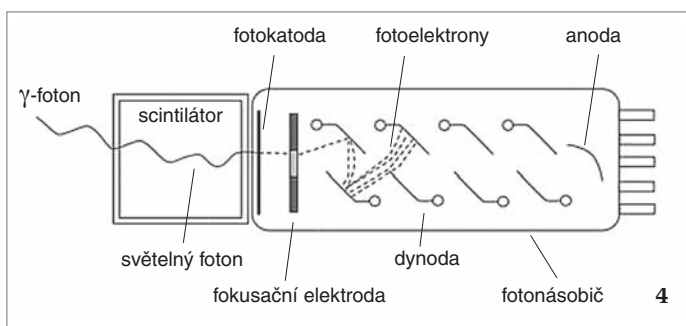




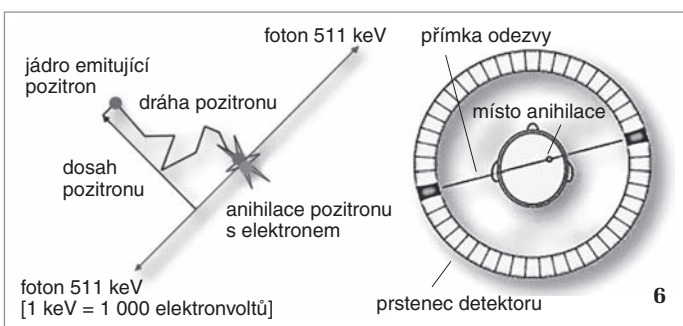
3



5



4



6

1 Schéma znázorňuje zachycení jednotlivých druhů záření konkrétními materiály: alfa záření zachyceno již listy rostlin, beta záření hliníkovým plechem a gama záření vrstvou olova.

2 Autoradiogram zobrazující rozložení kadmia  $^{109}\text{Cd}$  v pletivech sóji luštěnaté (*Glycine max*). Volně vysušená rostlina na filtračním papíru před expozicí na rentgenovém filmu (obr. A); vyvolaný film v původní černobílé škále (B) a autoradiogram upravený počítačovým programem (C, barevnou verzi snímku najdete na webové stránce Živa).

Bq – Becquerel, jednotka aktivity zdroje radioaktivního záření. Foto M. Bardáčová

3 a 4 Scintilační gamaspektrometr (ten na snímku je vysoký asi 50 cm) s krystalem jodidu sodného aktivovaného thalliem v olověném stínění (obr. 3, foto V. Adamcová) a schéma principu fungování tohoto detektoru (4). Blíže v textu. Upraveno podle: J. Tölgýessy a kol. (2001)

5 Pozitronový emisní tomograf microPET používaný na pracovišti katedry ekochemie a radioekologie Fakulty přírodních věd Univerzity sv. Cyrila a Metoděje v Trnavě (obr. vlevo). Detekční tunel s lůžkem detektoru microPET tomografu (vpravo). Foto V. Adamcová

6 Princip pozitronové emisní tomografie. Blíže v textu. Upraveno podle: S. R. Cherry a S. S. Gambhir (2001)

zmírnily toxicitu kovů, případně aby je uskladnily ve zvláštních buněčných kompartmentech (organelách, jako je buněčná stěna apod.) v neškodné formě (o toleranci rostlin k těžkým kovům viz např. Živa

2017, 4: 156–158). Většina rostlin využívá chemické bariéry (především v buněčných stěnách), aby toxické kovy zůstaly v kořenech a nepronikly do fyziologicky citlivých nadzemních částí. U některých rostlin však takové bariéry selhávají. Tyto poznatky mohou být důležité např. z hlediska produkce potravin z rostlin v kontaminovaných oblastech. Autoradiografie je vhodná pro detekci záření radioizotopů jako např. uhlíku  $^{14}\text{C}$ , kadmia  $^{109}\text{Cd}$ , cesia  $^{137}\text{Cs}$  nebo kobaltu  $^{60}\text{Co}$ .

### ● Scintilační gamaspektrometrie

Na rozdíl od autoradiografie představuje scintilační gamaspektrometrie kvantitativní metodu, která má široké uplatnění zejména v jaderném průmyslu, geochemickém výzkumu, ale i v astrofyzice. Je však vysoce spolehlivou a poměrně rychlou metodou i pro biologické analýzy. Podobně jako optické spektrometrické systémy také scintilační gamaspektrometrie zachytává spektra (rozsahy nebo škály) záření různé energie a intenzity emitovaného z analyzovaného vzorku. Ve své podstatě vyhodnocuje fotony viditelného záření, které vznikají po interakci ionizujícího záření s látkou (detektorem). Využívá tedy přeměnu energie ionizujícího záření na energii viditelného nebo ultrafialového (UV) záření, která je už dobře definovaná a měřitelnou veličinou. Tento luminiscenční jev se označuje jako scintilace a dochází k němu v krystalech, nejběžněji jodidu sodného aktivovaného thalliem.

Jednotlivé scintilace během analýzy znamenávají scintilační detektor (obr. 3 a 4). Ionizující záření (fotony) při dopadu na krystal scintilátoru ztrácí veškerou ener-

giu při ionizaci molekul krystalu. Takto vzbuzené částice však po krátké době ( $10^{-5}$  až  $10^{-9}$  s) přecházejí zpět do základního stavu a část energie se přemění na energii viditelného nebo UV světla v podobě světelných záblesků (scintilací). Záblesky dopadají na fotokatodu, z níž vyrazejí fotoelektrony. Aby však byly detekovatelné a měřitelné, musejí být ve fotonásobič systému dynod (stupňovitých elektrod) zesílené  $10^4$ – $10^7$ krát, což už postačuje ke vzniku krátkodobého, ale měřitelného elektrického proudu. Každé ionizující záření má typickou energii charakteristickou pro daný radionuklid a určitou intenzitu. Proto scintilační gamaspektrometry umějí toto záření nejen kvantifikovat, ale i kvalitativně rozeznat daný radionuklid.

Analýza vzorku je jednoduchá a poměrně rychlá. Vzorek stačí vložit do dutiny tvaru válce v olověném plášti detektoru (obr. 3), přikryt olověným krytem pro stínění pozadí (které by mohlo interferovat s analýzou) a pomocí počítače vyhodnotit, o jaký radionuklid jde a jeho množství obsažené ve vzorku. Např. při hydroponických pokusech můžeme studovat dynamiku příjmu kadmia kořeny tak, že postupně odebíráme a analyzujeme vzorky živného roztoku s přítomným izotopem  $^{109}\text{Cd}$  (např. po 5 ml) a sledujeme postupný úbytek  $^{109}\text{Cd}$  z roztoku. Po poměrně rychlém stanovení (závisí na zjišťované aktivitě, většinou do 10 min) můžeme vzorek vrátit zpět do živného roztoku a pokračovat v experimentu. Na konci pak lze v gamaspektrometru analyzovat i samotnou rostlinu, vysušenou a homogenizovanou (rozdrcenou nebo rozemletou). Takto stanovíme, kolik radioizotopu (a tedy i studovaného kovu)

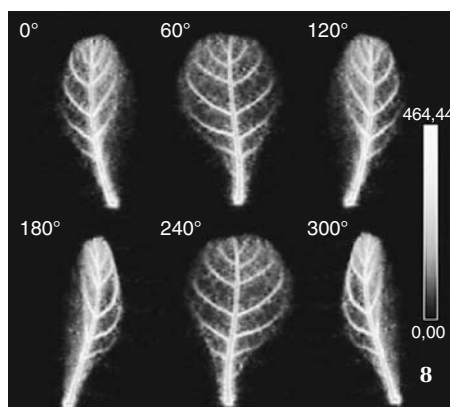
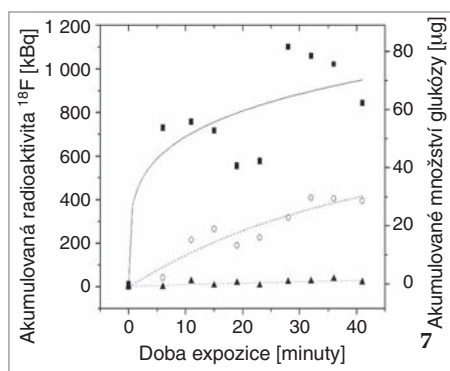
se skutečně nahromadilo v rostlině nebo jejích částech na jednotku sušiny. Podmínkou analýzy je dodržovat geometrii měření (umístění vzorku v detektoru) a rozdíly v hustotě analyzovaného vzorku. Touto metodou jsme např. zjistili, že rychlost příjmu kadmia je u různých odrůd sóji luštinaté (*Glycine max*) značně variabilní (Bardáčová a kol. 2017). Jednou z příčin je pravděpodobně schopnost kořenových buněk u některých odrůd zachytávat kov už na povrchu buněčných stěn, což znemožní kadmium pronikat do pletiva.

### ● Pozitronová emisní tomografie

Skutečně významný rozvoj jaderných technologií se datuje do první poloviny 20. století. Američtí jaderní fyzici Ernest Lawrence a Milton Livingston v r. 1930 navrhli a vybudovali první urychlovač částic (cyklotron), čímž byla zahájena rozsáhlá výroba radioaktivních izotopů a doba jejich následného využití v lékařství, průmyslu, zemědělství i výzkumu. Díky propojení s rychle se rozvíjející výpočetní technikou můžeme už více než 30 let hovořit o rozvoji pozitronové emisní tomografie (PET). Tomografie patří v současnosti mezi nejcitlivější zobrazovací metody. Proti jiným diagnostickým metodám je však její předností, že poskytuje dynamické 2-D a 3-D zobrazení radioindikátorů v analyzovaných objektech. Jde o neinvazivní techniku, která zachytí pozitrony ( $\beta^+$ ) vyslané z radioaktivně značených biologicky aktivních látek. Podobně jako lékaři sledují pomocí PET metabolické a fyziologické funkce lidských tkání a orgánů (např. metabolicky velice aktivní rakovinné buňky; viz Živa 2013, 5: 202–205 nebo 2017, 6: 294–296), v experimentální biologii rostlin hodnotíme vizuálně i kvantitativně ve skutečném čase (real-time) procesy příjmu a rozložení látek a kovů v živých pletivech. Není nutný odběr vzorků ani fixace pletiv.

Pozitronový emisní tomograf se běžně skládá z detekčního tunelu s moduly uspořádanými do kruhu, lůžka a pracovní stanice (počítače). Řídící software sbírá, analyzuje a skládá údaje. Přístroj PET pro rostliny je mnohem menší než ten využívaný v lékařství (obr. 5) a umožňuje vsunout do detekčního tunelu položenou rostlinu menších až středních rozměrů.

PET zachytí emitované pozitrony, které mají krátkou dráhu doletu (několik  $\mu\text{m}$  až  $\text{mm}$ ), a proto je nelze přímo analyzovat ve studovaném objektu. Využívá však jejich srážku se všudypřítomnými elektrony  $e^-$  (jde vlastně o antičástice pozitronů), přičemž obě původní částice páru zaniknou a jejich hmota se přemění na nějakou formu energie – tzv. anihilace (obr. 6). Takto při každé srážce vzniknou dva  $\gamma$ -fotony s energií 511 keV (511 tisíc elektronvoltů), které je už možné analyzovat např. scintilačními detektory (principem gamaspektrometrie). Přitom je velice důležité, že vzniklé  $\gamma$ -fotony jsou emitovány v opačných směrech pod úhlem  $180^\circ$  – na základě tohoto jevu se dá určit přesná poloha radioindikátoru v biologickém objektu. Přístroj k tomu používá nezávislé a navzájem spárované detekční moduly uspořádané do kruhu, vždy v protilehlé pozici (v koincidenci). Toto uspořádání do prstence umožňuje dobrou prostorovou rozlišení impulzů. Detekční



**7 a 8** Detekce 2-deoxy-glukózy s vázaným radioizotopem fluoru  $^{18}\text{F}$  ( $2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ) v listu tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*). Kinetika příjmu byla zaznamenána během expozice 45 min (osa x) a systém microPET vyhodnotil obsah značené látky v řapíku listu (čtverce), v listové čepeli (kroužky) a její špičce (trojúhelníky; obr. 7). Údaje o příjmu ve 3-D zobrazení (8). Upraveno podle: D. Partelová a kol. (2014 a 2016)

**9** Univerzita sv. Cyrila a Metoděje v Trnavě byla založena v r. 1997. Ačkoli věkem mladá, reprezentuje nejstarší zvyky a tradice z doby Velké Moravy. Ve svém názvu nese jména patronů vzdělání a věrosvěstí. Katedra ekochemie a radioekologie Fakulty přírodních věd vznikla v r. 2010 a její odborné zaměření reaguje na současné potřeby ochrany a obnovy životního prostředí. Z archivu autorek

moduly PET bývají nejčastěji založené na anorganických scintilátorech, připojených na fotonásobič, podobně jako u gamaspektrometru. Po dostatečně dlouhém čase získávání vzniklých impulzů a na základě dostatečného množství analyzovaných primárních údajů jsme schopni provést rekonstrukci 2-D nebo 3-D obrázků (obr. 6).

K nejpoužívanějším pozitronovým zařízením ve výzkumu rostlin patří radioizotopy halogenů, především fluoru  $^{18}\text{F}$  vázaného v molekule 2-deoxy-glukózy ( $2\text{-}[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ), dále kyslíku  $^{15}\text{O}$ , dusíku  $^{13}\text{N}$ , uhlíku  $^{11}\text{C}$ , a v neposlední řadě kovů jako gallium  $^{68}\text{Ga}$ , měď  $^{64}\text{Cu}$  nebo kadmium  $^{107}\text{Cd}$ . Výběr radioizotopu závisí na době poločas rozpadu a způsobu jeho aplikace, ale také na studovaném biologickém objektu a hodnocených fyziologických nebo metabolických procesech. Perspektivy PET ve výzkumu rostlin rozšiřuje její schopnost kvantifikovat radioindikátory v množstvích

nebo koncentracích těžko rozlišitelných jinými destruktivními nebo invazivními metodami. Např. při jedné takové analýze během 45 minut dokáže PET zaznamenat v různých částech zcela neporušené rostliny i řádově odlišná množství radioindikátoru (obr. 7 a 8).

PET má obrovský význam v rostlinné biologii pro studium mechanismu příjmu, translokace a hromadění těžkých kovů v pletivech při řešení problému jejich vzrůstající zátěže v životním prostředí. Ovlivňuje nejen výnosy a kvalitu plodin, ale vstupují i do potravního řetězce a ohrožují zdraví živočichů, včetně člověka. Na druhé straně je PET velice nápomocná při rozvoji fyto-remedičních metod – ekologických postupů, které využívají k dekontaminaci půd rychle rostoucí rostliny s velkou produkcí biomasy a určitou tolerancí k toxickým kovům. Může se uplatnit i při hledání mechanismů pro cílený transport živin (hnojiv) v rostlinách. Tato technika má však určitá omezení (viz dále).

Velkou výzvou pro vědce je např. vylepšování detekčních a počítačových systémů speciálně pro účely výzkumu rostlin. Také je potřeba hledat a zkoušet nové pozitronové zářiče, aby se rozšířily možnosti jejich uplatnění. V lékařství jsou např. systémy PET doplněny o další detekční systémy, mimo jiné počítačovou tomografii (CT), založenou na využití rentgenového záření jako zdroje signálů, nebo magnetickou rezonancí (MR). Kombinace technik (PET-CT nebo PET-MR) kvalitativně násobí výpovědní hodnotu získaných záznamů a údajů. Přístroj PET pro výzkum rostlin je součástí výzkumu i výuky na naší katedře v rámci akreditovaných programů bakalářského a inženýrského studia Ochrana a obnova životního prostředí v oboru Environmentální inženýrství.

Seznam použité literatury uvádíme na webové stránce Živa.

