

GDK: 812--015(045)

Prispelo / Received: 20. 04. 2006

Sprejeto / Accepted: 15. 06. 2006

Izvirni znanstveni članek

Original scientific paper

UPORABA MAGNETNO REZONANČNEGA SLIKANJA ZA RAZISKAVE ANATOMIJE IN VLAŽNOSTI LESA

Maks MERELA¹, Igor SERŠA², Urša MIKAC³, Primož OVEN⁴

Izvleček

Preverjena je bila uporaba jedrske magnetne resonance (NMR) za raziskave anatomije in vlažnosti lesa. Na tri metre visoki živi bukvi (*Fagus sylvatica* L.) smo uporabili 3D spin-echo MR-mikroskopsko tehniko slikanja s prostorsko resolucijo 100 µm in opazovali strukturo odrezane vejice ter spremljali dinamični odziv drevesa na mehansko poškodbo. Za potrditev struktur, vidnih na MR-slikah, smo uporabili svetlobno mikroskopijo. Svetlobna mikroskopija je razkrila anatomsko zgradbo in triletno starost vejice bukve. MR-slike so jasno razkrile stržen, radialno orientirane večredne ksilemske trakove, traheje ranega lesa, vključno z mejo med ranim in kasnim lesom, kot tudi kambijevo cono s tekočim ksilemskim in floemskim prirastkom. Preučevali smo koncentracijo vode v vejici in globino dehidracije, ki je nastala v 22-tih urah po poškodbi in je segala v globino približno 5 mm od poškodbe. Hitra izguba vlažnosti odseva začetni pasivni odziv prizadetega tkiva. S pomočjo 3D MR-mikroskopije in računalniškega programa ImageJ nam je uspelo izdelati prostorski model vode v lesu, ki prikazuje tkiva v vejici z značilno višjo vlažnostjo.

Ključne besede: MR-mikroskopija, bukev, *Fagus sylvatica*, živi les, anatomija lesa, vlažnost, porazdelitev vode, mehanska poškodba

APPLICATION OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING FOR RESEARCH OF ANATOMY AND MOISTURE CONTENT OF WOOD

Abstract

Feasibility of nuclear magnetic resonance (NMR) was tested for research of anatomy and moisture content of wood. A three m high living beech tree (*Fagus sylvatica* L.) was imaged by magnetic resonance using the 3D spin-echo microscopic imaging technique at isotropic spatial resolution of 100 µm to follow structural changes in the topped branch caused by healing response mechanisms of the tree. Conventional light microscopy was also employed to verify tree structures detected on MR images. Conventional light microscopy revealed anatomical structures and three year age of the tree branch. MR images clearly showed pith, radially oriented xylem rays, early wood vessels with a delineated border between early and late wood, as well as the cambial zone with current xylem and phloem growth increment. We studied water concentration in the branch and the depth of dehydration formed in 22 hours after the mechanical injury. The dehydrated region extended to the 5 mm depth from the wound location. First passive response of the injured branch tissue reflects in the initial decrease of the moisture content that was detected by MR imaging. Finally, we processed 3D MR microscopy data by the ImageJ image processing program to depict the spatial water concentration in the tree branch and to determine tissues with high water content.

Key words: MR microscopy, beech, *Fagus sylvatica*, living wood, wood anatomy, moisture content, water distribution, mechanical injury

UVOD

INTRODUCTION

Slikanje z magnetno resonanco (angl. *Magnetic Resonance Imaging* - MRI), temelji na uporabi jedrske magnetne resonance (angl. *Nuclear Magnetic Resonance* - NMR). Pojav

NMR sta leta 1946 neodvisno odkrila Felix Bloch in Edward Mills Purcell ter za odkritje leta 1952 skupaj prejela Nobelovo nagrado za fiziko. NMR je spektroskopska tehnika, ki se je na začetku uveljavila predvsem za kemijsko analizo snovi, v novejšem času pa je z iznajdbo slikanja z magnetno reso-

¹ M. M. univ. dipl. inž. les., Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina VIII/34, 1001 Ljubljana in LIP Radomlje d.d., Pelechova 15, 1235 Radomlje, SLO, maks.merela@bf.uni-lj.si

² doc. dr. I. S., Institut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana, SLO, igor.sersa@ijs.si

³ dr. U. M., Institut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana, SLO, urska.mikac@ijs.si

⁴ izr. prof. dr. P. O., Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Rožna dolina VIII/34, 1001 Ljubljana, SLO; primoz.oven@bf.uni-lj.si

nanco zasedla tudi izredno pomembno mesto v biomedicinskih raziskavah. Preskusili smo novo metodo slikanja z NMR za raziskavo anatomije in vlažnosti lesa, ki je v nadaljevanju predstavljena nekoliko podrobneje.

Pri jedrski magnetni resonanci izkoriščamo dejstvo, da se atomska jedra v magnetnem polju vedejo kot majhne magnetne igle; pravimo, da imajo takšna jedra magnetni dipolni moment. Najpogosteje merimo signal vodikovega jedra oziroma protona (^1H). Vodik nastopa v vseh organskih spojinah in je zato zelo pomemben v biomedicinskih raziskavah z NMR. Poleg vodikovega jedra ima dipolni magnetni moment še jedro vodikovega izotopa (^2H) oziroma devterijevo jedro in še jedra nekaterih drugih pomembnih kemijskih elementov in njihovih izotopov, pojavljajočih se v organskih tkivih: ogljikov izotop (^{13}C), dušik (^{15}N), fosfor (^{31}P) in fluor (^{19}F). Tako kot se magnetna igla v magnetnem polju postavi v smer polja (v zemeljskem magnetnem polju v smeri sever-jug), se tudi magnetni dipolni momenti jeder v zelo močnem magnetnem polju usmerijo tako, da je v povprečju več magnetnih momentov jeder usmerjenih v smeri statičnega magnetnega polja kot v obratni smeri, kar povzroči nastanek jedrske magnetizacije vzorca. Ta je vsota vseh magnetnih momentov jeder v vzorcu, deljena s prostornino vzorca, in kaže v smeri statičnega magnetnega polja. Ker jedrska magnetizacija narašča sorazmerno z gostoto statičnega magnetnega polja, potrebujemo pri slikanju z magnetno resonanco zelo močne magnetne, s katerimi dosežemo dovolj veliko jedrsko magnetizacijo v vzorcu in s tem tudi dovolj signala magnetne resonance (MR). Vzorec najprej vstavimo v posebno radiofrekvenčno (RF) tuljavo in ga z njo vred vstavimo v magnet, nato pa na RF-tuljavo priključimo močan in kratkotrajen sunek RF-napetosti. Pri tem jedra prejmejo energijo, ki jim jo je dal RF-sunek, kar povzroči odklon jedrske magnetizacije od smeri magnetnega polja. Po RF-sunkcu se jedrska magnetizacija vrti okoli osi v smeri statičnega magnetnega polja, tako da z njim oklepa stalen kot. Temu gibanju, ki je podobno gibanju vrtavke, pravimo jedrska precesija. Zaradi precesije jeder se v RF-tuljavi inducira električna napetost, podobno kot se v generatorju v elektrarni ustvari napetost; seveda je ta napetost zelo majhna. Sčasoma jedra prejeto energijo v procesu jedrske relaksacije vrnejo v okolico. Pri tem se tudi ves čas zmanjšuje kot, ki ga jedrska magnetizacija oklepa s statičnim magnetnim poljem, in po dovolj dolgem času je spet doseženo enako stanje kot pred

RF-sunkom. Proces vzpostavljanja ravnovesnega stanja, pri katerem se povečuje projekcija jedrske magnetizacije na smer statičnega polja, se imenuje longitudinalna jedrska relaksacija in poteka s karakterističnim časom T_1 . Poleg tega poteka še proces, pri katerem se zmanjšuje tudi velikost projekcije magnetizacije na ravnino pravokotno na smer statičnega polja. Do tega procesa pride predvsem zaradi medjedrskih interakcij in lokalne nehomogenosti magnetnega polja, ki povzročajo nesinhrono precesijo posameznih magnetnih momentov jeder. Ta proces se imenuje transverzalna relaksacija in poteka s karakterističnim časom T_2 , ki je vedno krajši od časa longitudinalne relaksacije T_1 . Dokler ima magnetizacija komponento v ravnini pravokotno na smer statičnega magnetnega polja, toliko časa se bo v tuljavi pri precesiji inducirala napetost in tedaj je mogoče izmeriti signal MR. Iz tega signala lahko izračunamo, kakšna je porazdelitev merjenih jeder po njihovih precesijskih frekvencah, izračunamo torej lahko spekter NMR. Jedra iste vrste, a v različnih kemijskih okoljih, imajo namreč malenkostno različne frekvence jedrskih precesij, kar omogoča natančno analizo kemijske zgradbe vzorca. Iz signala MR izračunamo spekter NMR s posebno matematično operacijo, ki se imenuje Fourierjeva transformacija. Podobno lahko iz signala NMR z večdimenzionalno Fourierjevo transformacijo izračunamo tudi MR-sliko (DEMŠAR / JEVTIČ / BAČIĆ 1996).

Slikanje z magnetno resonanco (MRI) je nedestruktivna metoda slikanja notranjih organov in tkiv v živih organizmih. Na področju medicine je v zadnjem času postala ena najpomembnejših diagnostičnih metod, katere glavne prednosti so: velika kontrastna ločljivost, možnost prikaza več področij na eni sliki v poljubno izbranih ravninah, neškodljivost za organizme in dinamični podatki (DEMŠAR / JEVTIČ / BAČIĆ 1996). Omogoča na primer prikaz ter natančno lokalizacijo in obseg tumorjev, odnos tumorjev do pomembnih sosednjih anatomskih struktur, ocenjevanje uspešnosti zdravljenja in zgodnje odkrivanje ponovitev. Z njo odkrivajo vrsto procesov, ki potekajo v živem organizmu (vnetni procesi, krvavitve, nevrološke motnje, patološke spremembe, poškodbe velikih sklepov, septični in revmatski vnetni procesi ...).

Osnovni pogoj za uspešno MR-slikanje je, da preiskovana tkiva oz. materiali vsebujejo vodik, zato je les zaradi visoke vlažnosti in specifične zgradbe zelo primeren material za tovrstne raziskave. Testni MRI poskusi izpred več kot 30

let (NANASSY 1973) so obetali nedestruktivno tehniko za opazovanje notranjih struktur in pojavov v lesu. Prva MR-slikanja lesa so bila narejena v običajnih medicinskih magnetih z relativno nizkimi magnetnimi polji (0,15T – 1T). Uporabljali so medicinske radiofrekvenčne (RF) tuljave, ki so omogočale slikanje velikih vzorcev lesa (debla s premeri nad 15 cm), vendar je bila ločljivost teh slik dokaj slaba (1.2 x 1.2 mm²/piksel). WANG in CHANG (1986) sta npr. s pomočjo MRI spremljala absorpcijo vode v lesu črne češnje (*Prunus serotina* Ehrh.) in z MR-slikami potrdila že znano dejstvo, da je beljava bolj absorptivna kot jedrovina. Zanimivo je, da sta na MR-slikah difuzno porozne češnje jasno razločila rani in kasni les, kar naj bi bilo sicer značilno za venčasto porozne vrste. Raziskave so pokazale tudi, da se tkiva z nizko vsebnostjo vode na MR-slikah ne pojavijo. Tako so npr. pri slikanju hrasta (CHANG / OLSON / WANG 1989) ugotovili, da se skorja na MR-slikah ni nikoli videla, brez težav pa so opazovali mejo med beljavo in jedrovino, potek prirastnih plasti, stržen in večredne radialne trakove.

MRI poleg normalnih strukturnih pojavov omogoča tudi odkrivanje in identifikacijo defektov v lesu, kar je izrednega pomena na primer pred razrezom hlodov. Maksimalni vrednostni izkoristek razreza je mogoče doseči le ob upoštevanju rastnih anomalij znotraj hloda, ki pa do razreza ostanejo skrite. Metoda NMR za hitro odkrivanje napak v lesu predpostavlja, da se rastne posebnosti v lesu vsaj delno strukturno razlikujejo od normalnega lesa (COATES / CHANG / LIAO 1998), kar je mogoče zaznati na sliki. Identifikacijo napak so preizkusili tudi s 3D računalniško rekonstrukcijo (MORALES *et al.* 2004), kjer so analizirali zaporedje prečnih 2D MR- slik, ter iz njih računalniško rekonstruirali zgradbo lesa.

Osnova NMR-metode je voda v materialu, kar omogoča tudi spremljanje določenih procesov, povezanih s spremembami vlažnosti v lesu. Okužba z glivo, na primer, v lesu povzroči kompleksne procese, ki predstavljajo obrambni mehanizem lesa, v katerem so žive parenhimske celice. Pearce (*et al.* 1994) je na kosih javorovine (*Acer Pseudoplatanus* L.) uporabil NMR- spektrometer za neinvazivno slikanje glivne okužbe. Slikanje je razkrilo anatomsko zgradbo lesa, patološke posebnosti, dinamiko okužbe in odziv živega tkiva na kolonizacijo z glivami. Študija je dokaz, da MRI omogoča opazovanje interakcij med lesom in patogenim organizmom oz. spremljanje dinamičnih procesov v lesu. Tudi sušenje je proces, kjer

je z MRI mogoče spremljati vlažnosti in vlažnostne gradiente v lesu (WANG *et al.* 1990; cit. BUCUR 2003a). MR- signal, ki ga dobimo iz vzorca, je namreč direktno sorazmeren z deležem vode v vzorcu (WANG / CHANG 1986). Vlažen les pri slikanju pomeni močnejši MR-signal, zato je bila večina študij opravljenih na lesu z vlažnostjo nad točko nasičenja celičnih sten (TNCS), t.j. okoli 30 % vlažnosti. Pri poizkusih pod TNCS sta bili uspešno uporabljeni pulzna NMR-tehnika (HARTLEY / KAMKE / PEEMOELLER 1994) ter SPRITE (Single Point Ramped Imaging with T_1 Enhancement) MRI-tehnika (MACMILLAN *et al.* 2002).

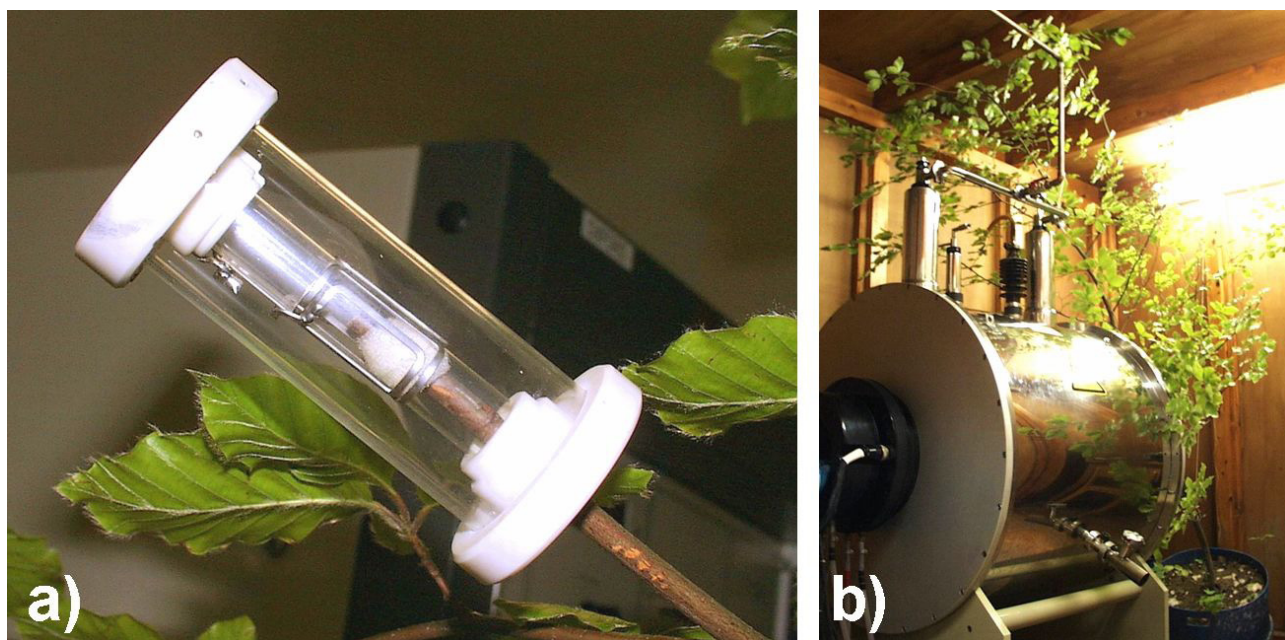
Slikanje z magnetno resonanco je mogoče tudi v treh dimenzijah (3D MRI). Pri 3D MRI- tehniki je slikani prostor, kjer leži vzorec, razdeljen na enako velike dele (kocke oziroma »voxle«). Dimenzija ene kocke določa tudi prostorsko ločljivost MR-slikanja. Meritev poteka tako, da radio-frekvenčni (RF) sunek 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 tedaj, ko je zbran ves slikovni signal iz vzorca, s pomočjo večdimenzionalne Fourierjeve transformacije izračuna signal za vsak slikovni element posebej, s čimer se izmeri tudi MR-slika. Najbolj razširjena metoda slikanja z MR je metoda, ki temelji na spinskem odmevu (spin echo), in ta ima nastavljava 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 , pri teh mora biti TE bistveno krajši od vzorca T_2 in TR bistveno daljši od vzorca T_1 , 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 (HALL / RAJANAYAGAM 1986). Količina MR-signala, ki pripada posameznemu slikovnemu elementu MR-slike, je predstavljena s svetlostjo. Večji je MR-signal iz slikovnega elementa, svetlejša bo ta točka na sliki. Pri naši izbiri parametrov je svetlost točke slike torej kar sorazmerna s koncentracijo vode. Pri drugačni izbiri parametrov slikanja TR in TE bi v splošnem bila svetlost točke slike odvisna še od relaksacijskih časov T_1 in T_2 . Prednost 3D-slikanja pred 2D-slikanjem je predvsem v tem, da lahko izmerjeno 3D-

sliko predstavimo v poljubno izbranih 2D-rezih: na primer v ravninah xy , yz , xz , poleg tega lahko iz 3D-slike s posebnimi programi za obdelavo slik izračunamo tudi prostorsko podobo slikanega vzorca, in to iz poljubnega pogleda v prostoru. Prednost 3D-MRI metode je tudi, da se lahko osredotočimo na prav vsako anatomsko podrobnost v sliki, saj nam to omogoča visoka ločljivost 3D-slik in možnost prikaza vzorca v poljubnem prerezu. Tako je bilo na primer 3D MR-slikanje uporabljeno pri študiju impregnabilnosti cilindričnih vzorcev javorja (HALL / RAJANAYAGAM 1986). Detekcija impregnacije temelji na tem, da se sredstvo delno pomeša z vodo, s tem se spremeni MR-signal, kar je mogoče opazovati na MR-slikah.

Namen naše raziskave je bil preveriti možnost uporabe 3D MR-slikanja za natančna nedestruktivna preučevanja drevesnih tkiv *in vivo*, za določevanje struktur in eventualnih anomalij, določanje količine in porazdelitve vode, spremljanje obrambnih mehanizmov ter dehidracije po poškodbi v lesu. Za potrditev struktur, vidnih na MR-slikah, smo uporabili klasično svetlobno mikroskopijo. S pomočjo MRI smo želeli izdelati 3D-model za prostorski prikaz vode v lesu.

MATERIALI IN METODE MATERIALS AND METHODS

Raziskava je bila narejena na tri metre visoki zdravi bukvi (*Fagus sylvatica* L.), ki je rasla v mešanem gozdu na nadmorski višini 470 m. V mesecu marcu smo jo presadili v prenosno posodo, ki je omogočila transportiranje v laboratorij. MR-slikanje je potekalo meseca maja v laboratoriju za slikanje z MR Oddelka za fiziko trdne snovi na Institutu Jožef Stefan. Za raziskavo smo izbrali vejico premera 5 mm, jo gladko odrezali s skalpelom in odrezani del vejice shranili za anatomske preiskave. Na konec odrezane vejice na drevesu smo namestili RF-tuljavo (Bruker, Ettlingen, Nemčija) notranjega premera 10 mm, ki omogoča visokoločljivo 3D MR-slikanje (slika 1a). Pred tem smo okoli vejice navili 5 mm širok trak tanke poliuretanske pene, ki je zagotovila tesno prileganje vejice v tuljavo. RF-tuljavo smo nato skupaj z vejico namestili še v gradientno tuljavo in vse skupaj pred začetkom slikanja namestili v center horizontalnega superprevodnega magneta (Oxford Instruments, Oxford, Anglija) z gostoto magnetnega polja 2,35 T (slika 1b). Magnet je bil



Slika 1: a) Namestitev RF-tuljave na odrezano vejico bukve in
b) Buke v laboratoriju med slikanjem. Slikana vejica je skupaj s tuljavo nameščena v odprtino horizontalnega superprevodnega magneta.

Fig. 1: a) Pruned beech branch after being inserted in the RF coil and
b) Beech tree setting in the horizontal bore superconducting magnet for MR imaging.

povezan z NMR-spektrometrom (TecMag, Huston, Texas, ZDA). NMR-spektrometer je poglavitni sestavni del vsakega sistema za MR-slikanje, saj opravlja zaporedja za slikanje z MR, zajema in obdeluje NMR-signale in nadzira vso močnostno elektroniko, potrebno za slikanje z MR. Po namestitvi v magnet smo vejico dodatno učvrstili z vrstico in s tem preprečili, da bi se med slikanjem premikala.

Najprej smo opravili kratkotrajno (10 min) orientacijsko slikanje, tako imenovano 3D-pilotno slikanje, s katerim smo lahko natančno določili lego vejice v magnetu. Na osnovi orientacijskih slik smo potem nastavili območje in matriko pravega visokoločljivega 3D-slikanja. To je potekalo *in vivo* s 3D spin-echo MR-mikroskopsko tehniko pri naslednjih parametrih slikanja: vidno polje (FOV) $25 \times 12.5 \times 12.5 \text{ mm}^3$, matrika slikanja $256 \times 128 \times 128$, čas spinskega odmeva (*TE*) 2,4 ms, hitrost ponavljanja zaporedja (*TR*) 600 ms in število povprečitev 8. Čas slikanja je bil 22 ur, prostorska ločljivost slikanja pa $100 \mu\text{m}$ v vseh treh dimenzijah. Po končanem slikanju smo ponovno naredili orientacijsko sliko, s katero smo potrdili, da se vejica med slikanjem ni premaknila. Podatke, dobljene s 3D MR-slikanjem, smo nato analizirali in obdelali s pomočjo računalniškega programa ImageJ (NIH, USA).

Poleg slikanja smo na vzporednih vzorcih opravili še NMR-merjenje relaksacijskih časov vejice T_1 in T_2 oziroma vode v vejici. Relaksacijska časa sta pomembna za pravilno nastavitve parametrov slikanja (*TE* in *TR*), ki ob primerni izbiri lahko omogočata slikanje koncentracije vode v lesu. Ta pogoj je izpolnjen, ko je: $TR \gg T_1$; $TE \ll T_2$.

Anatomske preiskave so potekale na odrezanem, 15 mm dolgem delu vejice, ki smo ga hranili v fiksativu FEA (mešanica formaldehida, etanola in očetne kisline). Ker je bil vzorec premajhen za klasično vpetje v čeljusti našega mikrotoma, smo ga vklopili v PEG-Polyethylenglycol 1500 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany). Vzorec smo namestili na posebno leseno držalo in ga skupaj z njim prepajali en teden pri temperaturi $55 \text{ }^\circ\text{C}$ in nizki začetni koncentraciji. Koncentracijo smo postopoma višali, dokler raztopina PEG-a ni postala visoko viskozna. Nizka začetna koncentracija in postopno višanje le-te omogočata, da PEG počasi impregnira vzorec in ga po utrditvi dobro fiksira skupaj z držalom. Iz tako pripravljenega vzorca smo z drsnim mikrotomom Leica SM2000R (Wetzlar, Germany) odrezali prečne ter vzdolžne ksilotomske rezine debeline $18 \mu\text{m}$. PEG smo z vodo izprali

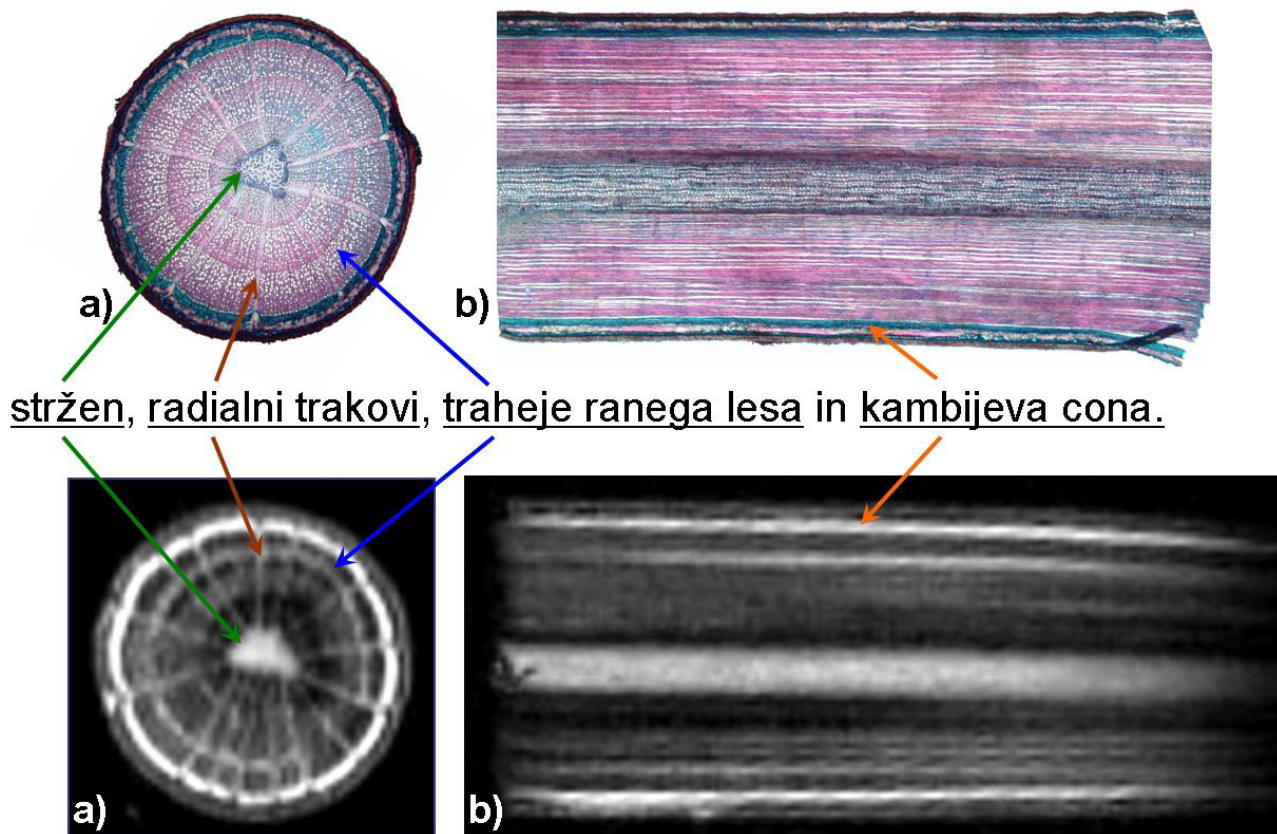
iz rezin, jih nato obarvali z 0,5 % alkoholnimi raztopinami barvil safranin-rdeče in astra-modro ter jih vklopili v Euparal. Svetlobno mikroskopijo preparatov smo opravili z raziskovalnim mikroskopom Nikon Eclipse E 800 (Kanagawa, Japan), slike pa zajeli z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 995. Slike svetlobne mikroskopije smo primerjali s slikami MR-mikroskopije.

REZULTATI IN DISKUSIJA RESULTS AND DISCUSSION

Svetlobna mikroskopija prečnega in vzdolžnega prereza je razkrila značilno anatomijo vejice bukke. Na prečnem prerezu so bile razločne tri zaključene ksilemske branike. Očitno je bilo, da smo poskus napravili v času, ko je že začel nastajati rani les četrte ksilemske branike (mesec maj). Na obeh prerezih smo lahko opazovali tudi skorjo s pripadajočim prevodnim floemom in kambijevo cono, jasno smo razločili stržen, radialne trakove in za bukev značilno difuzno porazdelitev trahej (sliki 2a in 2b).

NMR-meritve relaksacijskih časov vode v lesu so pokazale, da sta bila časa $T_1 \approx 30 \text{ ms}$ in $T_2 \approx 4 \text{ ms}$. S parametri MR-slikanja smo tako približno zadostili pogoju za slikanje protonske gostote ($TR \gg T_1$; $TE \ll T_2$), ki je proporcionalna vsebnosti vode v lesu. Izdelali smo 2D MR- slike prečnega in vzdolžnega prereza (sliki 2c in 2d). Na MR-slikah je signal vode v lesu izražen z intenziteto bele barve. Višja je vlažnost, močnejši je signal in svetlejši je prikaz na sliki. Vzdolžni prerez (slika 2d) prikazuje srednji sloj tkiva skozi stržen, prečni prerez (slika 2c) pa intaktni del vejice na razdalji 5 mm od mesta poškodbe. Izkazalo se je, da MR-signal vode v posameznih strukturah dejansko pokaže anatomsko zgradbo vejice. Slike smo primerjali s slikami svetlobne mikroskopije in na njih prepoznali identične strukture (slika 2). Jasno smo razločili stržen, radialno orientirane večredne ksilemske trakove, traheje ranega lesa vseh treh zaporednih branik ter kambijevo cono s tekočim ksilemskim in floemskim prirastkom. MR-slike so razkrile tako strukture v lesnem tkivu kot njihovo funkcijo pri prevajanju vode.

Na slikah 2c in 2d vidimo intenzivno svetla območja, ki predstavljajo tkiva z višjo vlažnostjo. Na obeh prerezih sta najbolj izrazita kambijeve cona in stržen, malo manj pa večredni radialni trakovi (2c) in traheje ranega lesa. Meja med



Slika 2: Anatomija vejice bukve; svetlobna mikroskopija: a) prečni in b) radialni prerez; MR- mikroskopija: c) prečni in d) radialni prerez. Premer vejice je 5 mm.

Fig. 2: a) Anatomy of beech branch; bright field microscopy: a) cross and b) radial section; MR microscopy: c) cross and d) radial section. Branch diameter is 5 mm.

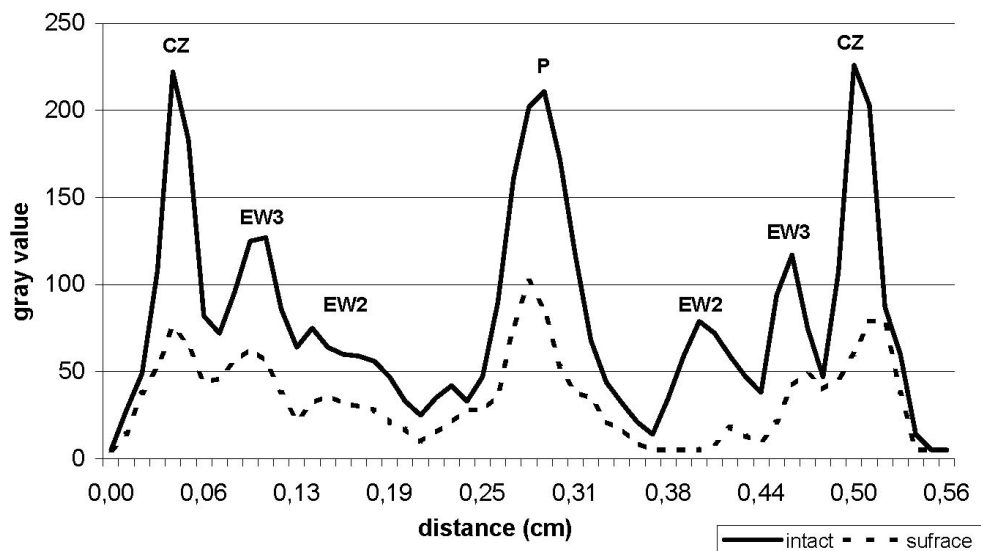
ranim in kasnim lesom v braniki je v primerjavi s svetlobno mikroskopijo presenetljivo razločna. Glede na difuzen razpored trahej bi bilo pričakovati, da bo razporeditev vode bolj ali manj enakomerna po celi braniki. Podroben pregled slik je pokazal, da je višja koncentracija vode v posamezni braniki omejena le na območje ranega lesa, kar sicer velja za venčasto porozne vrste (npr. hrast). To bi utegnilo pomeniti, da kljub difuznem razporedu trahej prevajanje vode pri bukvi poteka predvsem po trahejah ranega lesa.

Po poškodbi vejice (rez) smo na tem mestu pričakovali delno dehidracijo lesnega tkiva. S pomočjo 2D MR-slik prečnih prerezov smo raziskali delež vode in globino dehidracije. Izdelali smo radialni vlažnostni profil tkiva (slika 3) tik ob poškodbi (prekinjena črta) in profil intaktnega tkiva na globini 5 mm (polna črta) od mesta poškodbe po 22 urah. Vlažnost je prikazana primerjalno in je izražena z intenziteto slikovnih

točk (0-250). NMR-metoda je v tem primeru razkrila, da delež vode v smeri proti mestu poškodbe pada.

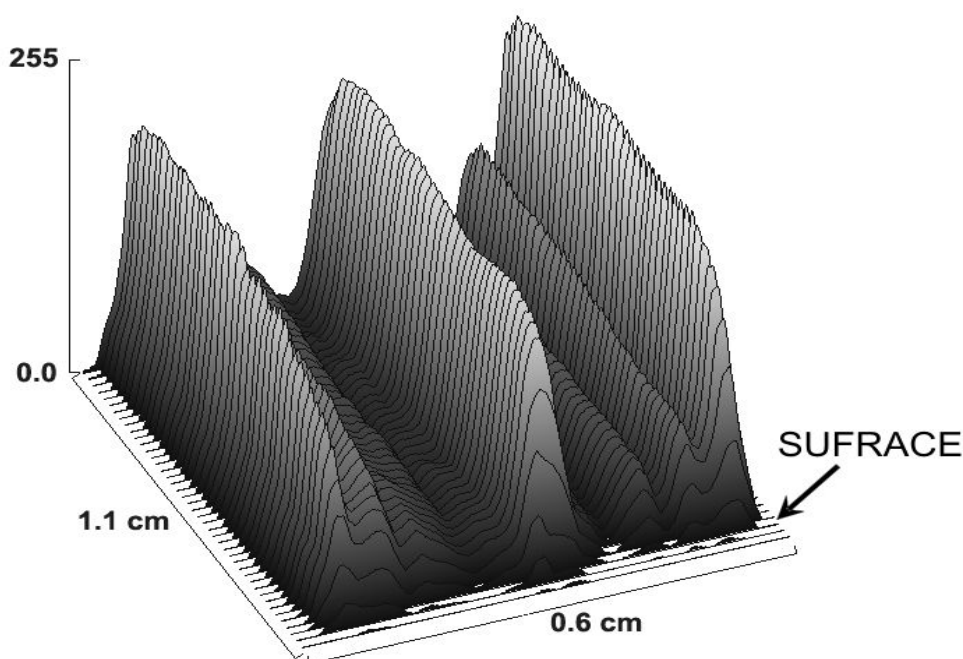
Analiza je pokazala, da je površina izrazito izsušena. Kljub temu je mogoče še vedno razločiti stržen, območje kambijeve cone in najbolj izrazito zadnjo braniko. Stržen je v primerjavi s kambijevo cono ohranil visoko vlažnost. Raziskava je nadalje pokazala, da koncentracija vode od kambijeve cone v smeri proti strženu počasi pada in nato v strženu spet močno naraste, kar navajajo tudi predhodne NMR-študije (BERAVS *et al.* 1998).

Za boljšo predstavbo o dehidraciji in porazdelitvi vlažnosti smo izrisali površinski diagram (slika 4) iz MR-slike radialnega prereza (slika 2d). Na diagramu je lepo vidna osušena površina ob poškodbi in nato postopno višja vlažnost proti intaktnemu delu, ki je nekje na globini 5 mm od mesta poškodbe.



Slika 3: Radialna porazdelitev vode na površini poškodbe (surface) in v intaktnem tkivu (intact) 5 mm od mesta poškodbe. Vlažnost je izražena z intenziteto sivine na sliki 2c. Območje kambijeve cone (CZ), rani les zadnjega prirastnega plašča (EW3), rani les drugega prirastnega plašča (EW2) in stržen (P).

Fig. 3: Radial moisture distribution in the surface of the wound and moisture distribution in intact tissues 5 mm from the wound. Moisture content is expressed in grey scale values as used in Figure 2c. Cambial zone region (CZ), early wood of last growth ring (EW3), early wood of second xylem growth ring (EW2), and the pith (P).



Slika 4: Površinski diagram porazdelitve vlažnosti, ki je izražena v enakih vrednostih kot sivine MR-slike (0-255). Zaporedni črtni diagrami, ki se začnejo na površini poškodbe, prikazujejo naraščanje vlažnosti z oddaljenostjo od mesta poškodbe. Intaktno tkivo leži približno na globini 5 mm od poškodbe.

Fig. 4: Surface plot of the moisture content expressed with the same values as grey scale MR images (0-255). Successive line diagrams starting from the surface of the wound show that the moisture content is increasing with distance from the wound. Intact tissue is located approximately 5 mm deeper than the wound.

S pomočjo prikazanih vlažnostnih diagramov je mogoče pojasniti dinamiko izsuševanja v neposredni bližini mehanske poškodbe drevesa. Hitra izguba vlažnosti mehansko poškodovanih tkiv predstavlja začetni pasivni odziv prizadetega tkiva, ki ga je opazoval tudi PEARCE (*et al.* 1994) pri patološki okužbi lesnih tkiv. V našem primeru je mehanska poškodba vejice s premerom 5 mm v 22 urah povzročila dehidracijo, ki je segala v globino približno 5 mm od poškodbe.

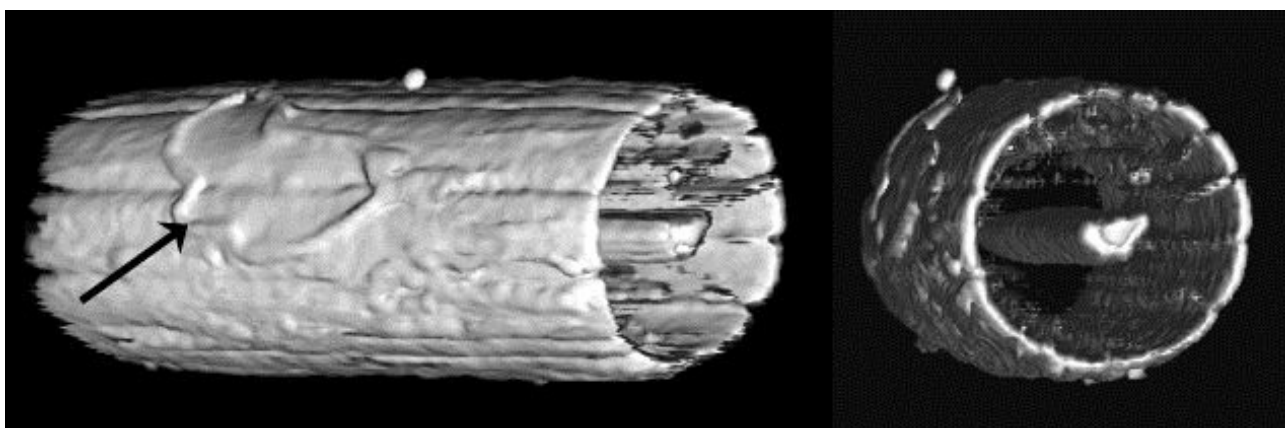
S pomočjo 3D MR-mikroskopije in računalniškega programa ImageJ smo izdelali prostorski model porazdelitve vode v lesu (slika 5). Izdelan je na podlagi MR-signala iz tkiv, ki imajo izrazito prevodno vlogo ali iz drugih razlogov vsebujejo večji delež vode. Na 3D-modelu smo še bolj jasno kot na 2D-slikah razločili strukture v vejici z značilno višjo vlažnostjo. Najbolj izrazita sta bila stržen in kambijeve cona s pripadajočim nediferenciranim ksilemom in prevodnim floemom (slika 5).

Na zunanji površini *plašča*, ki predstavlja kambijevo cono s prevodnim delom skorje, smo razločno videli vzdolžne *brazde* (slika 5). Podroben pregled je pokazal, da brazde, ki potekajo vzdolž osi stržena, pravzaprav ustrezajo položaju večrednih sklerificiranih floemskih trakov, ki segajo iz skorje v kambijevo cono in les (sklerenhimski čepki).

Na plašču smo zasledili tudi zaključen obroč (brazgotino) nepravilne oblike, ki ga na 2D- slikah (slika 2c in 2d) nismo

opazili. Pregled vejice je pokazal, da smo na tem delu skorje tik pred slikanjem nenamerno povzročili majhno mehansko poškodbo. Vejica je na to poškodbo intenzivno reagirala in odziv smo lahko opazovali kot brazgotino na površini plašča. Pri ponovnem pregledu 2D MR-slik smo v prerezu skozi to poškodbo res opazili delno osušitev tkiva (od kambija proti strženu) in povišano vlažnost ob robovih poškodbe. Menimo, da se je na tem mestu v nadaljevanju tvoril kalus. 3D MR-model je razkril strukture, ki jih tako na 2D MR-slikah kot tudi na slikah svetlobne mikroskopije ni bilo mogoče identificirati.

Študija je na podlagi ojetavnih rezultatov pokazala široke možnosti uporabe NMR na področju raziskav v lesarstvu. S pomočjo 3D MR-mikroskopije smo pri prostorski ločljivosti slikanja 100 μm lahko *in vivo* opazovali strukturo vejice in spremljali dinamičen odziv drevesa na mehansko poškodbo. Na 3D-modelu smo opazovali pojave, ki jih na običajnih MR-slikah (CHANG / OLSON / WANG 1989, WANG / CHANG 1986, TORELLI *et al.* 1989, PEARCE *et al.* 1994) ali slikah svetlobne mikroskopije ni mogoče preiskovati. Velika prednost 3D MRI-metode je enkratno zajemanje podatkov za celoten vzorec in možnost 3D-prikaza v kateremkoli prerezu ali zaporedju prerezov skozi vzorec. Pri tem lahko poljubno izberemo orientacijo in lego prerezov, kar omogoča natančno preiskovanje posameznih anatomskih delov vzorca.



Slika 5: 3D MR-model porazdelitve vode v vejici; bukev (*Fagus sylvatica* L.). Svetlo so prikazane strukture z višjo vsebnostjo vode (območje kambijeve cone, stržen, radialni večredni trakovi in traheje ranega lesa). Brazgotina nepravilne oblike (➔) prikazuje odziv vejice na površinsko mehansko poškodbo skorje v 22 urah. Premer vejice je 5 mm.

Fig. 5: 3D MR model of water distribution in branch; beech (*Fagus sylvatica* L.). Bright regions represent structures of high moisture content (region of cambial zone, pith, radial multiseriate rays and early wood vessels). Irregularly shaped scar (➔) reflects branch response to superficial mechanical injury of bark after 22 hours. Branch diameter is 5 mm.

Raziskovalci, ki so s pomočjo MR-slikanja raziskovali vlažnostna stanja v lesu, so vlažnost izražali na različne načine: vlažnostna gostota -*moisture density* (ARAUJO *et al.* 1992), število pikslov vode -*pixels of water* (HOUTS *et al.* 2004), vrednost intenzitete -*intensity value* (MORALES *et al.* 2004) ali nivo sivine -*gray level* (COATES / CHANG / LIAO 1998). Vsi se bolj ali manj spretno izogibajo definiciji razmerja med MR-signalom in dejansko vlažnostjo lesa v %. Cilj naših nadaljnjih raziskav je določiti metodologijo slikanja, s katero bi lahko MR-signalu pripisali točno določeno vrednost vlažnosti. To bi nam omogočilo izredno natančne meritve in raziskave na področju vlažnosti lesa in dinamiki procesov, ki potekajo v lesu. Premer trahej pri bukvi je od 60-80 μm (GROSSER 1977), in če bi nam uspelo povečati resolucijo slikanja, bi lahko raziskovali vlažnost celo na nivoju posameznih celic vaskularnega sistema. V nadaljevanju želimo podobne študije razširiti tudi na venčasto porodne vrste (hrast).

ZAKLJUČEK CONCLUSION

Zaključimo lahko, da je 3D MRI-tehnika zelo perspektivna metoda za raziskovanje struktur in pojavov znotraj lesa, tako na laboratorijskih vzorcih kot tudi *in vivo* v drevesih. Je nedestruktivna, nekontaktna, relativno hitra metoda, ne povzroča nikakršnih strukturnih porušitev ali poškodb in omogoča spremljanje dinamičnih procesov v lesu (BUCUR 2003b). Žal visoka cena in nedostopnost naprav za MR-slikanje še vedno precej omejujeta obsežnejše raziskave, kljub temu pa so danes na voljo magneti z magnetnimi polji okoli 10 T (AMEGLIO *et al.* 2004), kar zelo pripomore k hitrosti in kakovosti slikanja. Metoda nam bo omogočila nedestruktivno spremljanje vlažnosti v lesu in spremljanje procesov, ki so z vlažnostjo lesa neposredno povezani.

POVZETEK

Izveden je bil uspešen poizkus uporabe *in vivo* 3D MR-slikanja, kjer smo pri prostorski ločljivosti slikanja 100 μm opazovali strukturo vejice in spremljali dinamičen odziv na mehansko poškodbo. Raziskava je bila opravljena na 3 metre visoki bukvi (*Fagus sylvatica* L.), ki smo jo slikali v laboratoriju za slikanje z magnetno resonanco Oddelka za fiziko trdne

snovi na Institutu Jožef Stefan. Odrezali smo vejico premera 5 mm in nato del vejice na drevesu slikali s 3D spin-echo MR-mikroskopsko tehniko. Primernost MR-slikanja za anatomske raziskave smo ocenili s tradicionalno svetlobno mikroskopijo odrezanega dela vejice.

MR-slikanje in svetlobna mikroskopija sta razkrila identične strukture v tri leta stari bukovi vejici. Jasno smo razločili stržen, radialno orientirane večredne ksilemske trakove, traheje ranega lesa vseh treh zaporednih branik ter kambijevo cono s tekočim ksilemskim in floemskim prirastkom. Meja med ranim in kasnim lesom v braniki je bila presenetljivo razločna. Raziskali smo porazdelitev vode in globino dehidracije, nastale po poškodbi. Mehanska poškodba (rez vejice) je v 22 urah povzročila dehidracijo, ki je segala v globino približno 5 mm od poškodbe. Z uporabo 3D MR-mikroskopije in računalniškega programa ImageJ nam je uspelo izdelati prostorski model porazdelitve vode v lesu. Na 3D-modelu smo še bolj jasno kot na 2D-slikah razločili strukture v vejici z značilno višjo vlažnostjo.

Cilj naših nadaljnjih raziskav je določiti metodologijo slikanja, s katero bi lahko MR-signalu pripisali natančno določeno vrednost vlažnosti, kar nam bo omogočilo izredno natančne meritve in raziskave na področju vlažnosti lesa in dinamiki procesov, ki so z vlažnostjo neposredno povezani.

SUMMARY

3D MRI was successfully employed to image a beech branch *in vivo*. The study was done on a 3 meter high beech tree (*Fagus sylvatica* L.) that was imaged in the Laboratory for magnetic resonance imaging at Jozef Stefan Institute. A branch with 5 mm in diameter was cut from the tree and the part of the branch that remained on the tree imaged once a week by the 3D spin-echo MR microscopy technique. The technique enabled visualization of the branch structures at isotropic spatial resolution of 100 μm and therefore also enabled following the dynamic response of the tree to mechanical wounding. Feasibility of high-resolution MR imaging for xylotomical investigations was estimated by comparison of MR images to results obtained with traditional light microscopy.

MR imaging and light microscopy technique revealed identical structures in the three year old beech branch. Struc-

tures of the branch, i.e. pith, radially oriented multiseriate xylem rays, early wood vessels of all three successive growth rings and cambial zone with current xylem and phloem increment, are clearly distinguishable by both imaging techniques. Boundary between early wood and late wood was surprisingly distinct. Water distribution and depth of dehydration after the injury was investigated as well. 22 hours after the mechanical injury, dehydrated zone extended around 5 mm deep from the injury. 3D MR microscopy images and ImageJ computer software enabled us to construct spatial models for water distribution in the branch wood. Comparison of 2D images to volume rendered 3D models showed that these models can clearly reveal structures of higher moisture content in the branch.

The aim of our further research is to determine MR imaging methodology for assignment of the MR signal to the moisture content of wood. This method will enable very precise measurements and investigations in the field of wood-water relations and dynamic processes directly related to moisture in wood.

VIRI REFERENCES

- AMÉGLIO, T. / BONHOMME, M. / GIRARD, C. / COCHARD, H. / FOUCAT, L., 2004. Winter xylem embolism by Magnetic Resonance Imaging in Walnut Tree. France, International Symposium on Wood Sciences at Montpellier - (from 24 to 29 October 2004).
- ARAUJO, C. D. / MACKAY, A. L. / HAILEY, J. R. T. / WHITTALL, K. P., 1992. Proton magnetic techniques or characterization of water in wood: application to white spruce. – *Wood Science and Technology*, 26: 101–113.
- BERAVS, K. / OVEN, P. / SERŠA, I. / TORELLI, N. / DEMŠAR, F., 1998. Electric current density imaging of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) twigs by magnetic resonance imaging. – *Holzforschung*, 52: 541–545.
- BUCUR, V., 2003a. Nondestructive characterization and imaging of wood. New York, Springer, 354 s.
- BUCUR, V., 2003b. Techniques for high resolution imaging of wood structure: a review. – *Measurement Science and Technology*, 14: R91–R98.
- CHANG, S. J. / OLSON, J. R. / WANG, P. C., 1989. NMR imaging of internal features in wood. – *Forest Products Journal* 39, 6: 43–49.
- COATES, E. R. / CHANG, S. J. / LIAO, T. W., 1998. A quick defect detection algorithm for magnetic resonance images of hardwood logs. – *Forest Products Journal* 48, 10: 68–74.
- DEMŠAR, F. / JEVTIČ V. / BAČIČ G., 1996. Slikanje z magnetno resonanco. – Ljubljana, Littera picta, 151s.
- GROSSER, D., 1977. Die *Holzer Mitteleuropas*. Ein mikrophotographischer Lehratlas. – Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 208 s.
- HALL, L. D. / RAJANAYAGAM, V., 1986. Evaluation of the distribution of water in wood by use of three dimensional NMR volume imaging. – *Wood Science and Technology*, 20: 329–333.
- HARTLEY, I. D. / KAMKE, F. A. / PEEMOELLER, H., 1994. Absolute moisture content determination of aspen wood below the fiber saturation point using pulsed NMR. – *Holzforschung*, 48: 474–479.
- HOUTS, J. H. van / WANG, S. / SHI, H. / PAN, H. / KABALKA, G. W., 2004. Moisture movement and thickness swelling in oriented strandboard, part 1. Analysis using nuclear magnetic microimaging. – *Wood Science and Technology* 38, 8: 617–628.
- MACMILLAN, M. B. / SCHNEIDER, M. H. / SHARP, A. R., BALCOM, B. J., 2002. Magnetic resonance imaging of water concentration in low moisture content wood. – *Wood and Fiber Science* 34, 2: 276–286.
- MORALES, S. / GUESALAGA, A. / FERNÁNDEZ, M. P. / GUARINI, M. / IRARRÁZAVAL, P., 2004. Computer reconstruction of pine growth rings using MRI. – *Magnetic Resonance Imaging*, 22: 403–412.
- NANASSY, A. J., 1973. Use of Wide Line NMR for Measurement of Moisture Content in Wood. – *Wood Science* 5, 3: 187–193.
- PEARCE, R. B. / SÜMER 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. – *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45: 359–384.
- TORELLI, N. / DEMŠAR, F. / OVEN, P. / JARH, Orest / SEPE, A. / KRIŽAJ, B., 1989. MRI of living tissues of affected and healthy silver firs (*Abies alba* MILL.). Lipica, International Congress AMPERE, Workshop on Contrast Agents in Magnetic Resonance, in *Farmaceutski vestnik* 41, 3/4: 339–343.
- WANG, P. C. / CHANG, S. J., 1986. Nuclear magnetic resonance imaging of wood. – *Wood and Fiber Science* 18, 2: 308–314.

ZAHVALA ACKNOWLEDGEMENTS

Raziskava je nastala v okviru nacionalnih raziskovalnih projektov z naslovom: “Raziskave lesa kot materiala in tkiva živih dreves z MRI” št. J1-7042-0106 in “Optimizacija algoritma procesa sušenja lesa z vidika fizikalnih in kemijskih sprememb tkiva” št. L4-7367, ki jih financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.

Za pomoč pri izdelavi anatomskih preparatov se lepo zahvaljujemo sodelavcu Martinu Zupančiču iz Katedre za tehnologijo lesa ter Ani Sepe iz Oddelka za fiziko trdne snovi na Institutu Jožef Stefan za vso pomoč v laboratoriju za slikanje z MR.