

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0098**

Pozitronová emisná tomografia ako nástroj in vivo štúdia transportu vybraných látok v rastlinách

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Miroslav Horník, PhD.**

Príjemca **Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave - Fakulta prírodných vied**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Fakulta prírodných vied (Katedra ekochémie a rádioekológie) Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave - zodpovedný riešiteľ
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany - spoluriešiteľská inštitúcia

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Priamo na riešení projektu nebolo zapojené žiadne zahraničné pracovisko.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

V rámci projektu neboli plánované patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory ako výstupy projektu.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1.01 M. Pipíška, E. Florková, P. Nemeček, L. Remenárová, M. Horník: Evaluation of Co and Zn competitive sorption by zeolitic material synthesized from fly ash using ⁶⁰Co and ⁶⁵Zn as radioindicators. In Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2019, v tlači, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10967-018-6390-3>.

1.02 Gubišová, M., Horník, M., Hrková, K., Gubiš, J., Jakubcová, A., Hudcovicová, M., Ondreičková, K.: Sewage sludge as a soil amendment for growing biomass plant *Arundo donax* L. In Agronomy, 10, 2020, Article Number: 678. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10050678>.

1.02 Ondreičková, K., Gubišová, M., Piliarová, M., Horník, M., Matušinský, P., Gubiš, J., Klíčová, L., Hudcovicová, M., Kraic, J.: Responses of rhizosphere fungal communities to the sewage sludge application into the soil. In Microorganisms, 7 (11), 2019, Article no. 505. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110505>.

1.02 Adamcová, V., Čarná, A., Valica, M., Vešelényiová, D., Krajčovič, J., Horník, M.: Removal of Cd and Zn by living *Euglena gracilis* from aqueous solutions. In Journal of Biotechnology, 305S, 2019, S42. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2019.05.151](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.151).

1.06 Adamcová, V., Kuglerová, K., Ondreičková, K., Gubišová, M., Gubiš, J., Lesný, J., Kováč, P., Horník, M.: Factors affecting the analysis of 2-deoxy-2-fluoro[¹⁸F]-D-glucose in plant tissues by a commercial PET system. In Nova Biotechnologica et Chimica, 19, 2020, p. 98-108. DOI: <https://doi.org/10.36547/nbc.v19i1.582>.

- 1.06 Ondreichková, K., Gubišová, M., Gubiš, J., Klčová, L., Horník, M.: Rhizosphere bacterial communities of *Arundo donax* grown in soil fertilised with sewage sludge and agricultural by-products. In *Agriculture (Poľnohospodárstvo)* 65 (1), 2019, p. 37-41. DOI: <https://doi.org/10.2478/agri-2019-0004>.
- 1.06 D. Partelová, K. Kuglerová, Y. Konotop, M. Horník, J. Lesný, M. Gubišová, J. Gubiš, P. Kováč, I. Matušiková: Imaging of photoassimilates transport in plant tissues by positron emission tomography. In *Nova Biotechnologica et Chimica*, 16(1), 2017, p. 32-41. DOI: <https://doi.org/10.1515/nbec-2017-0005>.
- 1.07 Červeňáková, P., Machalová, L., Adamcová, V., Horník, M.: Evaluation of microelements uptake by freshwater plants using positron emitters. In *Applied Natural Sciences : A Young Scientists Journal*, Brno : Výzkumný ústav pivovařský a sladařský, 2020, s. 97-98. ISBN 978-80-86576-93-0.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu prinášajú nové poznatky v zmysle rozvoja rádioanalytických metód (scintilačnej gamaspektrometrie, rádioindikátorové metódy) a nukleárných zobrazovacích techník – najmä pozitronovej emisnej tomografie (PET) pri riešení vedeckých problematík z oblasti výskumu rastlín, rastlinnej produkcie, pestovania energetických plodín a využívania biologických systémov (rastlín, mikroorganizmov) pri remediácii kontaminovaných zložiek životného prostredia (pôda, voda).

Problematike PET ako diagnostickej metódy nukleárnej medicíny (predovšetkým diagnostika onkologických ochorení) využívanej vo výskume rastlín sa venuje vo svete nie viac ako 10 vedeckých tímov (najmä Nemecko, Japonsko, USA). Toto súvisí predovšetkým s náročnosťou finančného, infraštruktúrneho a personálneho (príslušne odborne vzdelaného personálu) zabezpečenia takéhoto výskumu (PET systém, urýchľovačové techniky pre produkciu pozitronových žiaričov a iné).

Fakulta prírodných vied UCM v Trnave disponuje Pracoviskom rádioekológie a nukleárnej analýzy (PRNA) ako v súčasnosti z mála fungujúcich pracovísk umožňujúcich na akademickej pôde pracovať s otvorenými žiaričmi. V rámci riešenia projektu v roku 2018 sa PRNA dobudovalo o Laboratórium pozitronovej emisnej tomografie, a to na základe Zmluvy o vytvorení spoločného Výskumného pracoviska pre oblasť pozitronovej emisnej tomografie uzavretej so spoločnosťou BIONT, a.s. dňa 23.4.2018. V kontexte tejto zmluvy bol na tomto spoločnom Výskumnom pracovisku inštalovaný experimentálny pozitronový emisný tomograf microPET eXplore Vista Pre-Clinical PET Scanner fy. GE Healthcare. V podmienkach SR, a to nielen v rámci vysokého školstva, ide o jediný prístroj tohto druhu. Prínos riešeného projektu v uvedenej problematike súvisí predovšetkým s tým, že prináša nové poznatky z oblasti využitia izotopov kovov – pozitronových žiaričov (napr. Cu-64) pri detailnom štúdiu príjmu a distribúcie kovov, ako na jednej strane mikroelementov vo výžive rastlín, a na druhej strane ako potenciálne toxických prvkov v zmysle ich odstraňovania z kontaminovaných zložiek životného prostredia, a to najmä pomocou rastlín. Významným prínosom je fakt, že pri riešení projektu sa použili aj tzv. minoritné pozitronové žiariče (percentuálne zastúpenie beta+ premeny), ktoré boli doteraz len minimálne využité vo výskume rastlín – napr. Zn-65, alebo do tohto času neexistujú vo vedeckých databázach informácie o ich uplatnení vo výskume rastlín – napr. Co-58. Niektoré z týchto unikátnych výsledkov a poznatkov už boli publikované, resp. ešte len budú publikované v krátkom čase. Sú však zahrnuté vo výročných správach, resp. záverečnej správe o riešení projektu. Okrem rozvoja PET ako unikátnej metódy projekt prináša aj zaujímavé poznatky a výsledky z pohľadu hodnotenia príjmu, distribúcie a kumulácie kovov v pletivách rastlín, na jednej strane ako dôležitých mikroelementov (napr. Cu a Zn) alebo prospešných prvkov (napr. Co) vo výžive rastlín, a teda v rastlinnej produkcii, a na druhej strane ako potenciálnych toxických kovov v zmysle ich odstraňovania z kontaminovaných zložiek životného prostredia, a to najmä pomocou rastlín. Teda, čo sa týka posledne menovanej problematiky, projekt prináša zaujímavé poznatky a výsledky aj z oblasti rozvoja fyto-remediálnych techník.

Výsledky a poznatky dosiahnuté počas riešenia projektu môžu byť v krátkej dobe využité najmä z pohľadu rozvoja a rozširovania potenciálneho využitia rádioanalytických metód, resp. nukleárných zobrazovacích techník vo výskume rastlín. Výhodou týchto metód a techník pre rastlinných biotechnológov, biochemikov alebo molekulárnych biológov je ich robustnosť, presnosť, nízka citlivosť (možnosť pracovať v širokom koncentračnom rozmedzí

už od femto molárných množstiev), ako aj fakt, že v prípade PET ide o nedeštruktívne in vivo a real-time zobrazovacie 2D/3D techniky umožňujúce v živých rastlinách študovať dynamiku príjmu a distribúcie širokej palety látok a prvkov.

Záujem o tieto techniky, resp. o v projekte dosiahnuté výsledky je zrejmý aj z tej skutočnosti, že práce publikované v rámci riešenia boli niekoľkokrát citované v prácach iných kolektívov publikovaných v renomovaných vedeckých databázach.

Taktiež výsledky a poznatky získané počas riešenia projektu môžu byť uplatnené aj v konkrétnych problematikách, akými sú: (i) primárna rastlinná produkcia realizovaná za podmienok, buď pôd deficientných na dôležité mikroelementy alebo pôd obsahujúcich supranormálne koncentrácie kovov; (ii) pestovanie energetických plodín v pôdach kontaminovaných alebo inak degradovaných; a (iii) využívanie rastlín pri odstraňovaní toxických alebo potenciálne toxických kovov z kontaminovaných zložiek životného prostredia (pôda, voda).

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavným cieľom projektu bolo posúdiť možnosti uplatnenia pozitronovej emisnej tomografie (PET) pri štúdiu dynamiky príjmu a distribúcie látok značených pomocou pozitronových žiaričov alebo samotných pozitronových žiaričov – prvkov zo skupiny ťažkých kovov. V zmysle tohto cieľa sa projekt zamerával aj na aplikovateľnosť PET v rozvoji fyto-remediačných techník a štúdiu procesov rozhodujúcich o uplatniteľnosti týchto techník v praxi, ako aj na využitie PET v oblasti výskumu zameraného na poľnohospodársku produkciu. Pre tieto účely sa v prvom kroku riešenia projektu navrhli a pripravili špecifické štandardy (fantómy) imitujúce pletivá jednotlivých rastlinných orgánov a celých rastlín obsahujúcich látky značené pomocou pozitronových žiaričov (napr. 2-deoxy-2-[18F]fluór-D-glukózy; 2-[18F]FDG ale aj napr. 65ZnCl₂). Pomocou nich sa testovali technické a výkonové charakteristiky použitého komerčného mikroPET systému z pohľadu zobrazenia a analýzy tenkých objektov, ako aj sme dosiahli kvantifikáciu akumulácie použitých rádioindikátorov alebo pozitronových žiaričov v pletivách rastlín v rámci PET analýzy. Pred samotným testovaním aplikačným možností použitých pozitronových žiaričov a komerčného mikroPET systému sa uskutočnili experimenty zamerané na optimalizáciu kultivácie vybraných druhov rastlín v zmysle realizácie PET analýz. Dosiahli sme optimalizované podmienky pre in vitro kultúry rastlín *Miscanthus giganteus*, *Arundo donax* a *Sida hermaphrodita*, ich množenie a uchovávanie. Dôraz sa kládol na dosiahnutie najvýznamnejšieho množenia, odnožovania výhonkov a zakoreňovania pomocou optimálneho prídavku cytokinínov, auxínov a/alebo amínokyselín do médií. Z pohľadu uplatnenia PET pri štúdiu príjmu a distribúcie kovov v pletivách rastlín v zmysle fyto-remediačných metód sme sa zamerali na rádioizotopy kovov Zn, Co a Cu, ktoré je možné zaradiť medzi pozitronové žiariče – Zn-65, Co-58 a Cu-64. Významným prínosom bol práve fakt, že pri riešení projektu sa použili aj tzv. minoritné pozitronové žiariče (percentuálne zastúpenie beta+ premeny), ktoré boli doteraz len minimálne využité vo výskume rastlín – napr. Zn-65, alebo do tohto času neexistujú vo vedeckých databázach informácie o ich uplatnení vo výskume rastlín – napr. Co-58. Ako študované rastlinné modely sa použili najmä rastliny patriace medzi potenciálne energetické plodiny (ako napr. *S. hermaphrodita*), o ktoré je v súčasnosti v oblasti fyto-remediačných techník veľký záujem. Pomocou PET sa nám za in vivo podmienok podarilo detailne charakterizovať a kvantifikovať procesy príjmu a distribúcie študovaných kovov v jednotlivých orgánoch a pletivách rastlín za rôznych fyziologických podmienok alebo podmienok prostredia. V závere riešenia projektu sme tieto objekty obohatili aj o vodné rastliny využiteľné pri fytofiltrácii kovov ako kontaminantov z vodných roztokov. Uplatnenie PET techník vo výskume vodných rastlín do tohto času nebola opísaná vo vedeckých databázach. Vyššie uvedené rádioizotopy kovov spolu s 2-[18F]FDG ako modelom fotoasimilátov boli taktiež využité pre hodnotenie uplatniteľnosti PET techník pri štúdiu ich príjmu a distribúcie v pletivách rastlín v zmysle poľnohospodárskej produkcie. Tu sme sa zamerali aj na objekty drevnatých rastlín – ovocných stromov s cieľom detailnej charakterizácie a kvantifikácie príjmu a akumulácie študovaných kovov v jednotlivých orgánoch a pletivách, či už drevnej časti, listov, ale aj v rámci plodov samotných. Výsledky dosiahnuté v rámci riešenia projektu ukazujú, že PET techniky predstavujú vo výskume rastlín zaujímavý zobrazovací, ale aj kvantitatívny nástroj pre stanovenie príjmu distribúcie širokej palety látok a kovov v pletivách rastlín vykazujúci vysokú presnosť, robustnosť a

citlivosť (už od femto molárných množstiev), ako aj fakt, že v prípade PET ide o nedeštruktívne in vivo a real-time zobrazovacie 2D/3D techniky. Ich ďalší rozvoj, komerčná dostupnosť v technických, prevádzkových a výkonnostných parametroch šitých pre výskum rastlín, ako aj dostupnosť vhodných pozitronových žiaričov alebo pripravených rádioindikátorov, môže v blízkej budúcnosti významným spôsobom zmeniť výskum rastlín.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main aim of the project was to assess the possibilities of utilization of positron emission tomography (PET) in the study of the dynamics of uptake and distribution of substances labelled with positron emitters or positron emitters themselves - elements from the group of heavy metals. In terms of this aim, the project also focused on the applicability of PET in the development of phytoremediation techniques and the study of processes determining the applicability of these techniques in practice, as well as the use of PET in the research focused on agricultural production. For these purposes, in the first step of the project, specific standards (phantoms) imitating the tissues of individual plant organs and whole plants containing substances labelled with positron emitters (e.g. 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose; 2-[18F]FDG, but also e.g. 65ZnCl₂) were designed and prepared. They were used to test the technical and performance characteristics of the commercial microPET system used in terms of imaging and analysis of thin objects, as well as to quantify the accumulation of used radioindicators or positron emitters in plant tissues within the PET analysis. Prior to testing the application possibilities of the used positron emitters and the commercial microPET system, experiments were performed with the aim to optimize the cultivation of selected plant species in terms of PET analyses realization. We achieved optimized conditions for in vitro cultures of *Miscanthus giganteus*, *Arundo donax* and *Sida hermaphrodita*, their propagation and storage. The emphasis was placed on achieving the most significant propagation, shoot branching and rooting by the optimal addition of cytokinins, auxins and/or amino acids into the media. From the point of view of the application of PET in the study of metal uptake and distribution in plant tissues in terms of phytoremediation methods, we focused on radioisotopes of Zn, Co and Cu, which can be classified as positron emitters - Zn-65, Co-58 and Cu-64. A significant benefit was the fact that in the solution of the project the minor positron emitters (percentage of beta+ decay) were applied. Until this time, some of them have been used only minimally in plant research - e.g. Zn-65, or there is no information in scientific databases about their application in plant research - e.g. Co-58. Plants belonging to potential energy crops (such as *S. hermaphrodita*), which are currently of great interest in the field of phytoremediation techniques, were mainly used as studied plant models. Using PET, we were able to characterize and quantify in details the processes of uptake and distribution of the studied metals in individual organs and tissues of plants under various physiological or environmental conditions under in vivo conditions. At the end of the project solution, we supplemented these objects with aquatic plants usable in phytofiltration of metals as contaminants from aqueous solutions. Until this time, the application of PET techniques in aquatic plant research has not been described in scientific databases. The above mentioned metal radioisotopes together with 2-[18F]FDG, as a model of photoassimilates, have also been used to evaluate the applicability of PET techniques in the study of their uptake and distribution in plant tissues in terms of agricultural production. Here we also focused on the objects of woody plants - fruit trees with the aim of detailed characterization and quantification of the uptake and accumulation of studied metals in individual organs and tissues, whether the wood part, leaves, but also within the fruits themselves. The results of the project showed that PET techniques in plant research represent an interesting imaging, but also a quantitative tool for determining the uptake and distribution of a wide range of substances and metals in plant tissues showing high accuracy, robustness and sensitivity (from femto to molar amounts), also the fact that PET is a non-destructive in vivo and real-time 2D/3D imaging technique. Their further development, commercial availability in technical, operational and performance parameters tailored for plant research, as well as the availability of suitable positron emitters or prepared radioindicators may significantly change plant research in the near future.