

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.10

МИКРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК ВОЛОСКОВ ТЫЧИНОЧНЫХ НИТЕЙ ТРАДЕСКАНЦИИ

© А. Ю. Буданцев,* А. Ю. Демьянов, М. А. Погорелова

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино, 142290;

** электронный адрес: budantsev@mail.ru*

Изучены морфометрические характеристики клеток волосков тычиночных нитей традесканции — площадь поверхности и объем клеток, площадь профилей клеток, линейные размеры профилей (длина и ширина) и др. Для каждого волоска разработана форма «морфометрического паспорта» и дана количественная оценка варибельности метрических параметров живых клеток в терминальной, средней и базальной зонах волосков. Полученные данные важны для изучения морфологии и систем регуляции активности клеток волосков тычиночных нитей традесканции. Кроме этого, особенности морфометрических характеристик клеток тычиночных волосков необходимо учитывать при их использовании как тест-системы для определения мутагенов.

Ключевые слова: волоски тычиночных нитей традесканции, морфометрические измерения, 3D-модели клеток, конфокальная микротомография

Принятые сокращения: ВТН — волоски тычиночных нитей, МЛМТ — метод лазерной микротомографии.

Волоски тычиночных нитей (ВТН) традесканции представляют собой цепочки клеток, в основном продуцируемых до полного развития волоска линейно расположенными терминальными клетками, которые являются меристемными (Ichikawa et al., 1969). Многие субтерминальные клетки также делятся, но только один раз. Другие промежуточные клетки волоска делятся очень редко (Ichikawa et al., 1969; Осипова, Шевченко, 1984; Евсеева, Гераськин, 2001, и др.).

Активное движение цитоплазмы, легко наблюдаемое в клетках ВТН («струйное движение»), широко используется в образовательных целях при изучении особенностей живых растительных клеток. Проведено много исследований особенностей митотического цикла в терминальных клетках с использованием поляризационной микроскопии и микровидеографии; в частности, было показано, что время митотического цикла около 50 мин (Site, 1962; Wolniak, 1987; Mineyaki, Gunning, 1988, и др.). Крупные размеры и линейное расположение клеток в ВТН позволяют проводить на них тонкие исследования молекулярных механизмов внутриклеточной регуляции с использованием методов микроинъекции и биохимии (De Pass et al., 2001; Molchan et al., 2002, и др.).

ВТН традесканции (гибридные клоны 02 и 4430) используются как тест-объект в радиобиологических и экологических исследованиях цитогенетических последствий действия мутагенов разной природы (Осипова, Шевченко, 1984; Адлер и др., 1989; Cesniene et al., 2017, и др.).

Изменение последовательности расположения клеток в волоске (изгибы или разветвление) и размеров клеток (гигантские, карликовые или с задержанным ростом), а также изменение их цвета рассматриваются как морфологические аномалии, связанные с мутациями (Underbring et al., 1970; Евсеева, Гераськин, 2001).

В данной работе изучены морфометрические характеристики клеток ВТН (площадь поверхности и объем клеток, длина и площадь периметра клеток и др.). Для каждого волоска разработана форма «морфометрического паспорта» и дана количественная оценка варибельности метрических параметров живых клеток в терминальной, средней и базальной зонах ВТН традесканции. Очевидно, что полученные данные важны для исследований систем регуляции активности растительных клеток, которые проводятся на клетках ВТН. Данные о морфологической варибельности размеров и форм ВТН необходимо учитывать при использовании ВТН в качестве тест-системы для определения мутагенов.

Материал и методика

Работа проведена на *Tradescantia pallida*, выращенной в обычном цветочном грунте в условиях естественного освещения (август 2017 — февраль 2018 гг.). Было изучено 14 ВТН полностью раскрытых цветков (174 клетки). Сразу же после выделения ВТН фотографировали в воде в специальной микрокамере на микроскопе Олум-

pus 71 (Япония) цифровым фотоаппаратом Olympus-330. Во всех изученных клетках в момент фотографирования наблюдали активное струйное движение цитоплазмы.

Для калибровки линейных и объемных характеристик фотографировали объект-микрометр ОМ-О. Измеряли и рассчитывали максимальную длину (L) и ширину (D) профилей клеток, отношение (L/D), длину периметра профиля клеток (LP) и площадь профиля (AP) (использовали программу AnalySIS-Olympus). Измерение объема (V) и площади поверхности клеток (AS) проводили на объемных моделях клеток, построенных с использованием программы 3D-studio MAX (ver.5.0) (детали метода см.: Буданцев, Демьянов, 2017).

Для сравнительного анализа определения объемов клеток использовали параллельно с построением 3D-моделей метод 3D-реконструкции с применением конфокального микроскопа Leica TCS SPE (Leica, Австрия). Метод реконструкции детально описан в специальной статье (Погорелова и др., 2016). Для остановки движения цитоплазмы ВТН были фиксированы в течение 2 ч в забуференном 10%-ном формалине (Sigma).

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Структура и морфометрические параметры клеток ВТН. На рис. 1 приведена панорама одного волоска тычиночной нити (ВТН), состоящего из 18 клеток, а в табл. 1 приведен его «микрометрический паспорт». На рис. 1 видно, что ВТН представляет собой цепочку последовательно соединенных клеток. Как отмечалось выше, рост волоска происходит за счет митозов в апикальной клетке, а митозы в субапикальных клетках встречаются редко и совсем редко в середине и базальной зоне ВТН (Underbring et al., 1970).

Для определения значения коэффициента вариабельности (CV) морфометрических параметров клеток ВТН каждый волосок мы разделили на равные три морфофункциональные зоны — апикальную, среднюю и базальную, учитывая процесс образования ВТН, указанный выше. В табл. 2 представлены результаты статистического анализа трех групп клеток ВТН.

Из данных табл. 2 видно, что во всех трех группах клеток ВТН наблюдается значительная вариабельность размеров клеток. Однако значения CV не превышают 33 %, что свидетельствует об однородности выделенных групп клеток. Разница между средними значениями мор-

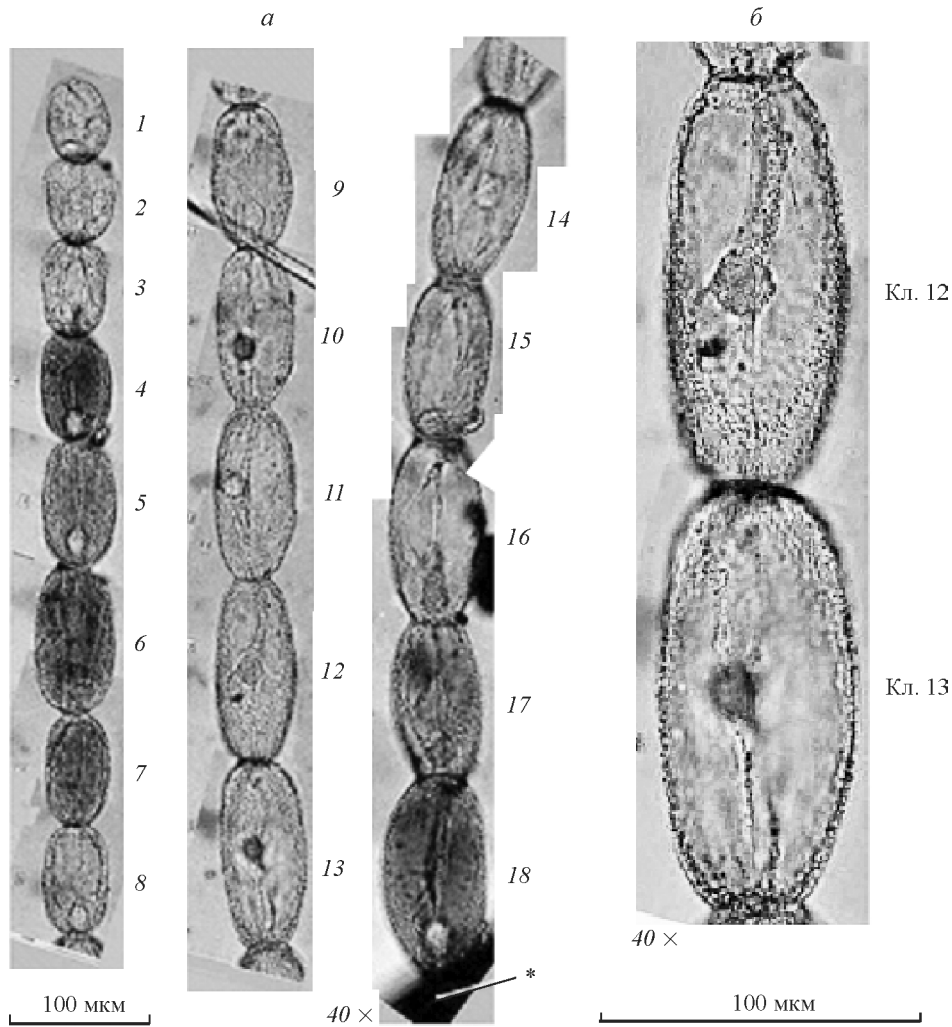


Рис. 1. Внешний вид клеток ВТН традесканции.

а — общий вид одного ВТН; 1—18 — порядковые номера клеток в волоске, где 1 — апикальная клетка, 18 — базальная клетка; звездочка — тычиночная нить. б — клетки № 12 и 13 (Кл. 12 и Кл. 13 соответственно). Об. 40×.

Таблица 1

Морфометрические параметры клеток и моделей ВТН

Номер клетки	Панорама волоска (рис. 1)							
	Стереометрические параметры (3D-модели)		Линейные размеры и цвет клеток					
	AS, мкм ² · 10 ³	V, мкм ³ · 10 ³	L, мкм	D, мкм	L/D	AP, мкм ² · 10 ³	LP, мкм	цвет клеток
1	7.96	64.98	59	44	1.34	2.12	176	Н
2	10.11	91.09	64	46	1.39	2.65	195	Н
3	9.81	84.41	68	44	1.54	2.70	201	Н
4	11.80	112.09	78	48	1.77	3.32	223	Ф
5	13.52	133.19	88	52	1.69	3.98	248	Ф
6	18.00	198.87	108	55	1.96	5.20	289	Ф
7	10.72	92.95	79	42	1.88	3.17	224	Ф
8	10.37	89.89	76	44	1.73	3.05	214	Н
9	17.11	186.44	99	52	1.90	4.80	280	Н
10	18.17	200.39	112	53	2.11	5.04	291	Н
11	20.27	229.71	120	55	2.18	5.60	314	Н
12	21.03	234.83	127	54	2.35	6.19	337	Н
13	22.94	275.08	126	59	2.13	6.64	339	Н
14	22.23	265.03	124	60	2.07	6.47	335	Н
15	19.58	227.28	114	57	2.00	5.69	305	Н
16	23.93	300.24	128	64	2.00	7.07	344	Ф
17	20.72	246.84	113	61	1.85	6.33	322	Ф
18	27.42	371.15	130	71	1.83	8.37	371	Ф

Примечание. AS — площадь поверхности клеток, V — объем клеток (программа 3D-studio MAX), L — максимальная длина и D — ширина профилей клеток, LP — длина периметра профилей клеток, AP — площадь профиля (программа AnalySIS-Olympus). Н — неокрашенные клетки, Ф — клетки фиолетового цвета.

фометрических параметров клеток трех групп достоверна ($P < 0.05$). Необходимо отметить высокую корреляцию между объемом клеток и площадью их профилей. Вытянутость клеток ВТН увеличивается от группы апикальных клеток к группе базальных клеток (отношение L/D изменяется соответственно от 1.54 до 2.04).

3D-моделирование клеток ВТН и получение их стереометрических характери-

стик. Главной процедурой, определяющей точность и воспроизводимость количественных стереометрических данных, является оконтуривание изображения клетки. На рис. 2 показан пример построения 3D-моделей двух клеток ВТН (клетки № 12 и 13 на рис. 1, б). Так как клетки обладают практически осевой симметрией, для построения моделей использован модификатор «Вращение» («Lathe») и редактируемые сплайны программы

Таблица 2

Результаты статистического анализа трех групп клеток ВТН

Группа клеток	Параметры	n	M	±m	σ	CV, %
Апикальная часть	V, мкм ³	55	116.17	5.19	38.52	33
	L/D	54	1.54	0.04	0.32	21
	AP, мкм ²	55	3.41	0.13	0.95	28
Средняя часть	V, мкм ³	55	167.59	5.03	37.30	22
	L/D	56	1.93	0.04	0.29	15
	AP, мкм ²	54	4.57	0.10	0.72	16
Базальная часть	V, мкм ³	62	210.45	7.62	59.99	28
	L/D	60	2.04	0.03	0.25	12
	AP, мкм ²	64	5.51	0.16	1.29	23

Примечание. V — объем клеток, L/D — отношение длины профиля клетки к ширине, AP — площадь поверхности клеток, CV — коэффициент вариальности ($CV = \sigma/M \cdot 100\%$), n — число клеток, M — среднее арифметическое значение, m — ошибка средней арифметической, σ — среднеквадратичное отклонение.

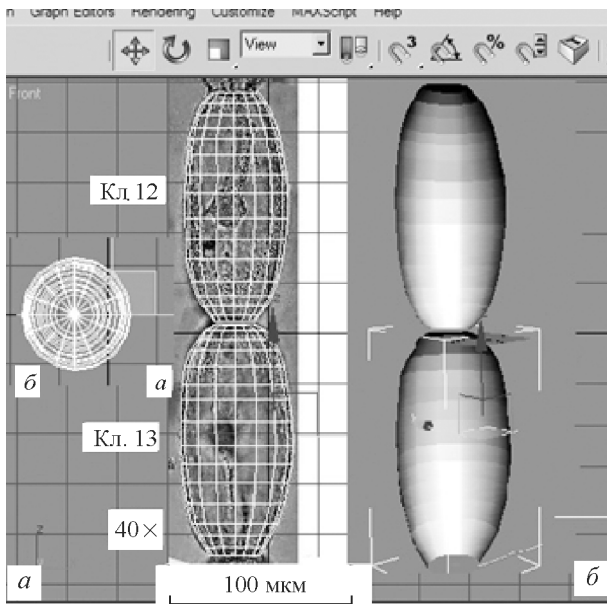


Рис. 2. Построение 3D-моделей клеток № 12 и 13 (программа 3D-studio MAX).

а — сетчатые модели двух клеток; *слева* — вид модели сверху, *справа* — вид спереди. *б* — гладкие модели клеток. Числовые значения *AS* и *V* приведены в табл. 1.

3D-studio MAX. После калибровки (объект-микрометр) площадь поверхности и объем 3D-модели клетки программа рассчитывает автоматически.

Точность оконтуривания зависит от качества первичного изображения, опыта работы оператора с графическими программами и его знания морфологии измеряемых

объектов. Необходимо отметить особенность стенки клеток ВТН: ее поверхность имеет ребристую структуру, что особенно четко видно на фотографиях, полученных на конфокальном микроскопе (рис. 3). Такая структура поверхности клеток требует большого внимания при их оконтуривании.

Для проверки повторяемости оконтуривания клеток ВТН на фотографиях контуры одной и той же клетки были с большими перерывами повторены 50 раз (клетки № 12, рис. 2, б). Показано, что среднее значение площади поверхности клетки равно 20.97 ± 0.05 (доверительный интервал 20.86—21.07, $P < 95\%$); объем клетки — 237.97 ± 0.99 (доверительный интервал 235.99—239.98, $P < 95\%$). Данные показывают высокую воспроизводимость оконтуривания клеток, выполненного одним оператором.

Количественная лазерная 3D-микротомография. Точность определения границ контуров, так же как и в случае получения 3D-моделей, зависит от качества первичного изображения: наличие плотной, толстой и «ребристой» клеточной стенки клеток ВТН осложняет эту процедуру (рис. 3).

Метод лазерной микротомографии (МЛМТ) разработан для микрообъектов произвольной формы и позволяет более точно определить форму клетки после 3D-реконструкции. Это связано с тем, что метод основан на анализе стопки последовательных оптических срезов, что позволяет реконструировать детали конструкции внешней оболочки объекта (Погорелова и др., 2008, 2009). Однако применение МЛМТ ограничено условием оптической прозрачности исследуемого образца. При выполнении этого требования галерея параллельных оптических срезов служит фактическим материалом для количественной 3D-реконструкции клетки (Погорелова и др., 2014, 2016).

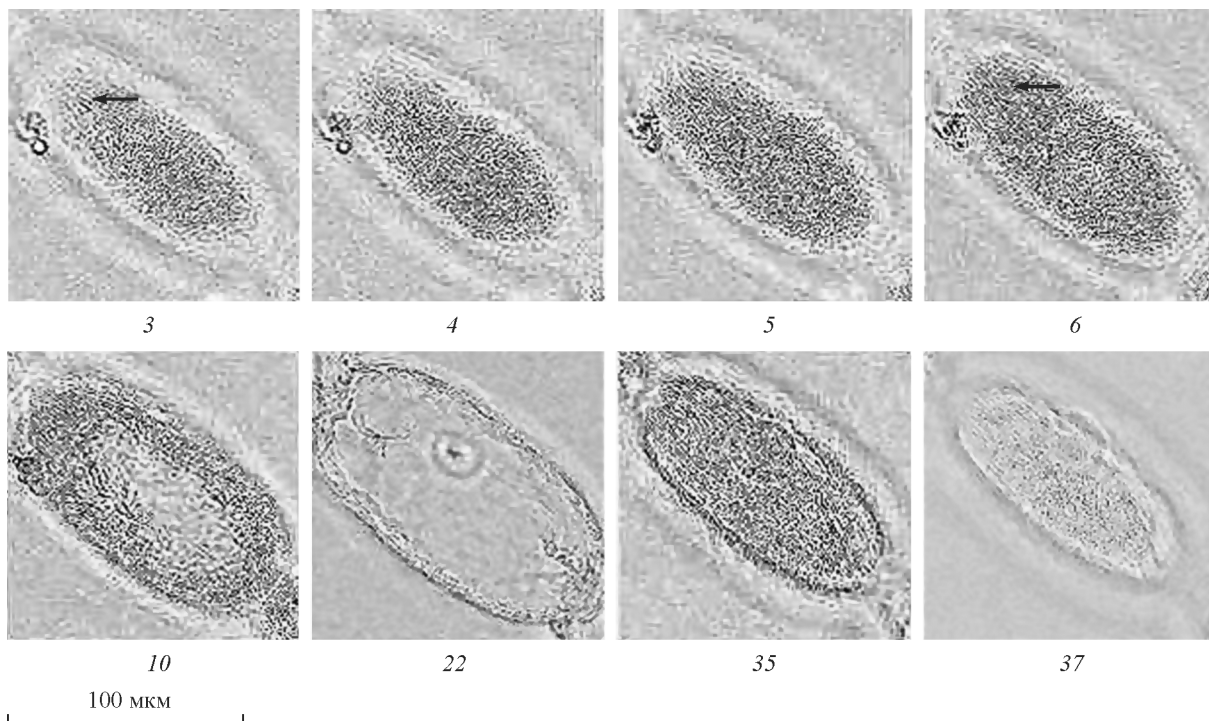


Рис. 3. Оптические срезы клетки № 3 (табл. 3). Конфокальная микроскопия.

Клетки не окрашены. Толщина «оптических» срезов 2 мкм. Освещение — лазер с длиной волны 532 нм. 3—6, 10, 22, 35, 37 — номера срезов, где 3—6, 10 — верхняя поверхность клетки, 22 — «экваториальный» срез, 35, 37 — нижняя поверхность клетки. Стрелками показана «ребристая» структура клеточной стенки. Срез № 22 использован для оконтуривания и построения 3D-модели (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение объемов клеток ВТН традесканции, измеренных на 3D-моделях и с использованием МЛМТ

Номер клетки	Площадь поверхности 3D-модели, $\text{мкм}^2 \cdot 10^3$	Объем 3D-моделей, (VM), $\text{мкм}^3 \cdot 10^3$	Объем 3D-реконструкции (VC), $\text{мкм}^3 \cdot 10^3$, МЛМТ	Различия, % (VM относительно VC)
1	26.68	382	388	-1.6
2	29.12	423	420	+0.7
3	27.70	379	383	-1.1
4	27.01	377	380	-0.8
5	19.82	230	222	+3.6
6	17.28	193	190	+1.6
7	16.83	181	184	-1.6

Примечание. VM — объем клеток (3D-модели), VC — объем клеток, рассчитанный на основе данных, полученных с помощью МЛМТ.

В табл. 3 приведены сравнительные результаты значений объемов клеток ВТН, рассчитанных методом компьютерного 3D-моделирования и полученных в результате количественной лазерной 3D-реконструкции. Видно, что два независимых метода дают сравнимые результаты с различием не более 4 %. Такая точность показывает корректность предложенного подхода компьютерного 3D-моделирования применительно к микрообъекту, обладающему осевой симметрией.

На рис. 4 представлены варианты формы и размеров клеток ВТН при действии на ВТН традесканции мутагенных факторов (Underbrink et al., 1970). При тестировании мутагенов проводится подсчет нормальных, гигантских, карликовых клеток, клеток с задержанным ростом и др. Такой подсчет проводится при визуальной оценке размеров клеток, что может влиять на объективность полученных результатов. По-видимому, необходимо ранжировать приведенные морфологические типы видоизмененных клеток по морфометрическим параметрам, что предотвратит (или уменьшит) влияние субъективной

оценки наблюдаемых изменений морфологии клеток при тестировании действия мутагенных факторов на клетки ВТН. Кроме этого, по-видимому, оправдано оценивать морфологические параметры «клеток-мутантов» в трех зонах каждого волоска, в которых клетки находятся на разных стадиях развития.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-76-20014) (применение количественной стереометрии клеток методами сканирующей микроскопии).

Список литературы

Адлер И.-Д., Коль И., Данфорд Н., Элинг У., Перри М., Родерик Р., Венитт С., Фогель В., Ватерс Р. 1989. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. Женева: Всемирная организация здравоохранения. 86—97. (Adler I.-D., Cole I., Danford N., Ehling U., Parry M., Roderick R., Venitt S., Vogel W., Waters R. 1989. Guide for short-term tests for the detection of mutagenic and carcinogenic chemicals. Hygienic criteria for the state of the environment 51. Geneva: World Health Organization. 86—97.)

Буданцев А. Ю., Демьянов А. Ю. 2017. Деформация тканей в ходе гистологического процессинга. I. Методы морфометрической оценки деформаций. Цитология. 59 (5): 362—368. (Budantsev A. Yu., Demyanov A. Yu. 2017. Deformations of tissues at histological tissue processing. I. Methods for morphometric analysis evaluation of deformations. Tsitologiya. 59 (5): 362—368.)

Евсеева Т. И., Гераськин С. А. 2001. Сочетанное действие факторов радиационной и нерadiационной природы на традесканцию. Екатеринбург: УрО РАН. 156 с. (Evseeva T. I., Geras'kin S. A. 2001. Combined action of factors of radiation and non-radiation nature on *Tradescantia*. Ekaterinburg: Ural Department RAS. 156 p.)

Осипова Р. Г., Шевченко В. А. 1984. Использование традесканции (клоны 02 и 4430) в исследованиях по радиационному и химическому мутагенезу. Журн. общей биол. 95 (2): 226—232. (Osipova R. G., Shevchenko V. A. 1984. The use of *Tradescantia* (clones 02 and 4430) in studies on radiation and chemical mutagenesis. J. General Biol. 95: 226—232.)

Погорелов А. Г., Погорелова В. Н. 2009. Количественная микротомография раннего эмбриона млекопитающих посредством лазерной сканирующей микроскопии. Бюл. эксперим. биол. мед. 148 (10): 478—480. (Pogorelov A. G., Pogorelova V. N. 2009. Quantitative microtomography of the early mamma-

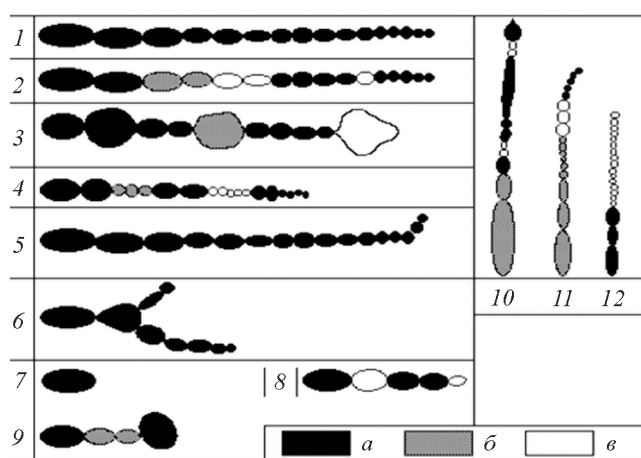


Рис. 4. Типы морфологических изменений в волосках тычиночных нитей традесканции при действии мутагенов.

1 — нормальный волосок, 2 — розовые и бесцветные клетки, 3 — гигантские клетки, 4 — карликовые клетки, 5 — изгибающийся волосок, 6 — разветвленный волосок, 7—9 — волоски с задержанным ростом, 10—12 — сочетания нескольких типов изменений; а — клетки голубого цвета, б — клетки розового цвета, в — бесцветные клетки (по: Underbrink et al., 1970, с изменениями).

lian embryo by laser scanning microscopy. Bull. Exp. Biol. Med. 148 (10) : 672—674.)

Погорелова М. А., Голиченков В. А., Погорелов А. Г. 2014. Дифференциально-вертикальный контраст оптических срезов: лазерная микротомография и количественное трехмерное реконструирование. Оптика и спектроскопия. 116 (3) : 167—172. (Pogorelova M. A., Golichenkov V. A., Pogorelov A. G. 2014. Differential axial contrast of optical sections: laser microtomography and quantitative 3D reconstruction. Optics and Spectroscopy. 116 (3) : 522—528.)

Погорелова М. А., Панайт А. И., Погорелов А. Г. 2016. Лазерная сканирующая микроскопия применительно к раннему эмбриону мыши: цитометрия и изучение морфологии клетки. Биофизика. 61 (3) : 528—536. (Pogorelova M. A., Panait A. I., Pogorelov A. G. 2016. Laser scanning microscopy as applied to early mouse embryo: cytometry and cell morphology analysis. Biophysica. 61 (3) : 528—536.)

Погорелова М. А., Яшин В. А., Погорелов А. Г., Голиченков В. А. 2008. Количественная томография раннего эмбриона мыши. Докл. РАН. 418 (5) : 712—714. (Pogorelova M. A., Yashin V. A., Pogorelov A. G., Golichenkov V. A. 2008. Quantitative tomography of mouse early embryo. Dokl. RAS. 418 (5) : 712—714.)

Cesniene T., Kleizaite V., Dondzinskaite S., Taraskevicius R., Zvingila D., Siuksta R., Rancelis V. 2017. Metal bioaccumulation and mutagenesis in a *Tradescantia* clone following long-term ex-

posure to soils from urban industrial areas and closed landfills. Mutat. Res. Gen. Tox. En. 823 : 65—72.

De Pass A. L., Crain R. C., Hepler P. K. 2001. Inositol 1,4,5 triphosphate is inactivated by a 5-phosphatase in stamen hair cells of *Tradescantia*. Planta. 213 : 518—524.

Ichikawa S., Sparrow A. H., Thompson K. H. 1969. Morphologically abnormal cells, somatic mutations and loss of reproductive integrity in irradiated *Tradescantia* stamen hairs. Radiat. Bot. 9 : 195—211.

Mineyuki Y., Gunning B. S. 1988. Streak time-lapse video microscopy: analysis of protoplasmic motility and cell division in *Tradescantia* stamen hair cells. J. Microscopy. 150 : 41—55.

Molchan T. M., Valster A. H., Hepler P. K. 2002. Actomiosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. Planta. 214 : 683—693.

Sitte P. 1962. Polarisationsmikroskopie der mitose *in vivo* bei staminalhaarzellen von *Tradescantia*. Protoplasma. 54 : 560—572.

Underbrink A. G., Sparrow L. A., Sparrow A. H., Rossi H. H. 1970. Relative biological effectiveness of R-rays and 0,43-MeV monoenergetic neutrons on somatic mutation and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. Radiat. Res. 44 : 187—203.

Wolniak S. M. 1987. Lithium alters mitotic progression in stamen hair cells of *Tradescantia* in a time-dependent and reversible fashion. Eur. J. Cell Biol. 44 : 286—293.

Поступила 29 III 2018

MICROMETRIC ANALYSIS OF STAMEN HAIR CELLS OF *TRADESCANTIA*

A. Yu. Budantsev,* A. Yu. Demyanov, M. A. Pogorelova

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino, 142290;

* e-mail: budantsev@mail.ru

Morphometric characteristics of hair cells of stamens of *Tradescantia* (surface area and cell volume, length and area of the perimeter of cells, etc.) were studied. For each hair, the form of the «morphometric passport» was developed and a quantitative assessment of the variability of metric parameters of living cells in the terminal, middle and basal zones of the hairs. The obtained data are important for various studies of morphology and systems of regulation of plant cell activity, for example the hair cells of the stamens of the *Tradescantia* filaments, and when using hairs as a test system for determination of mutagens.

Key words: stamen hair cells of *Tradescantia*, morphometric measurements, 3D-models of cells, confocal microtomography