

## МИНИМИЗАЦИЯ ПОГРЕШНОСТЕЙ МОРФОМЕТРИИ РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ ПЛАНАРИЙ

<sup>1</sup>Тирас Х.П., <sup>1</sup>Петрова О.Н., <sup>2</sup>Мякишева С.Н., <sup>3</sup>Деев А.А., <sup>3</sup>Асланиди К.Б.

<sup>1</sup>Пуцинский государственный естественно-научный институт,

Пуцино, e-mail: tiras1950@yandex.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Институт биофизики клетки РАН», Пуцино, e-mail: myakisheva@mail.ru;

<sup>3</sup>ФГБУ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»,

Пуцино, e-mail: kbaslanidi@gmail.com

В работе представлены возможности метода прижизненной морфометрии регенерирующих планарий. Предлагаемый метод позволяет избавиться от неопределённости при измерении размеров, связанной с фиксацией препарата. Впервые проведён детальный анализ факторов, влияющих на точность витальной морфометрии планарий и предложены конкретные пути уменьшения ошибки измерения длин и площадей. Показано, что максимальный вклад в суммарную погрешность измерений вносят ошибки оператора при отборе одинаковых особей, при ампутации фрагментов тела планарии, а также ошибки при выборе момента регистрации изображения. Выявлены критерии отбора одинаковых особей и регламентирована численность группы планарий для отдельного эксперимента. Показано, что погрешности, обусловленные техническими характеристиками применяющейся аппаратуры и программного обеспечения, пренебрежимо малы по сравнению с погрешностями, создаваемыми даже опытным экспериментатором. Утверждается, что повышение квалификации экспериментатора позволяет уменьшить ошибку измерения в несколько раз.

**Ключевые слова:** регенерация, планарии, количественный метод, ошибка измерения, прижизненная морфометрия, анализ изображения

## MINIMIZING OF MORPHOMETRIC ERRORS IN PLANARIAN REGENERATION

<sup>1</sup>Tiras H.P., <sup>1</sup>Petrova O.N., <sup>2</sup>Myakisheva S.N., <sup>3</sup>Deev A.A., <sup>3</sup>Aslanidi K.B.

<sup>1</sup>Puschino State Institute of Natural Sciences, Puschino, e-mail: tiras1950@yandex.ru;

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Puschino, e-mail: myakisheva@mail.ru;

<sup>3</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics Russian Academy of Sciences, Puschino, e-mail: kbaslanidi@gmail.com

The paper presents the possibilities of the method of vital morphometry of regenerating planarians. The proposed method eliminates the uncertainty in the measurement of the dimensions associated with the sample fixation. For the first time conducted a detailed analysis of the factors affecting the accuracy of vital morphometry planarians and propose concrete ways to reduce measurement errors in lengths and areas. It is shown that the maximum contribution to the total measurement error made by operator error in the selection of the same individuals with amputation planarian body fragments, as well as errors in selecting the moment of registration of the image. The criteria of selection of the same animals and regulated by the size of the group of planarians to separate experiment. It is alleged that the technical characteristics of the apparatus and software capabilities far exceed even the most experienced operator. This means that training can reduce the error of measurements in several times.

**Keywords:** regeneration, planarian, quantitative method, error measurement, vital morphometry, image analysis

Регуляция процессов регенерации является фундаментальной проблемой современной биологии и в настоящее время исследуется на уровне регуляции процессов пролиферации, миграции и дифференцировки стволовых клеток [3, 4, 12, 14]. Планарии являются классической моделью для исследования процессов восстановления и обновления органов и тканей уже более 200 лет. Первый количественный метод прижизненного исследования процесса регенерации планарий был предложен более 30 лет назад [5], однако широкого распространения до настоящего времени не получил. В основе метода прижизненной морфометрии лежит способность планарий к стандартизации положения тела при одно-

направленном движении в горизонтальной плоскости и наличие чёткой границы между бластемой и пигментированной остаточной частью тела. Предлагаемый метод позволяет избавиться от неопределённости измерения размеров, связанной с фиксацией препарата. Преимущества современных модификаций метода прижизненной морфометрии [3, 4] перед описанием отдельных изображений фиксированного объекта очевидны, однако подавляющее большинство современных исследований базируется на использовании молекулярных маркеров [12, 13, 14, 15]. Недоверие исследователей к прижизненному методу связано, по нашему мнению, с отсутствием детального описания методики измерений и оценок

точности получаемых результатов. Анализ точности метода и возможных путей минимизации ошибок ранее не проводился.

**Целью работы** явился анализ возможностей уменьшения погрешностей морфометрии регенерирующих планарий. Для этого были регламентированы оптимальные условия проведения эксперимента как погрешностей аппаратуры и компьютерных программ, так и самого экспериментатора. Утверждается, что повышение квалификации экспериментатора позволяет уменьшить ошибку измерения морфометрических показателей в несколько раз.

### Материалы и методы исследования

В экспериментах применялась бесполоя раса пресноводных червей – планарий *Dugesia (Girardia) tigrina*. Планарий содержали в аквариумной воде при жёсткости  $dH \approx 10$  градусов,  $pH \approx 6,5$  и температуре  $26^\circ C$ . Кормили личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 10–11 мм после недельного голодания. Регенерация вызывалась ампутацией определённой части планарии. В каждой серии экспериментов обычно использовалось по 30 особей, помещаемых в пластиковую чашку Петри  $d = 40$  мм, содержащих 13 мл аквариумной воды. Для количественной оценки результата регенерации использовали метод прижизненной компьютерной морфометрии [2, 5, 8], который базируется на регистрации фотоконтраста между старыми и новыми частями тела регенерирующей планарии.

Для получения изображений планарий применяли бинокулярный микроскоп Stemi 2000-C, оснащённый цифровой видеокамерой AxioCam MRc (фирма «Zeiss»). Оцифрованные изображения регенерирующих планарий обрабатывались в программе Plana 5.0 [3, 4, 6]. Полученные значения длин и площадей проекции бластемы и регенерирующего фрагмента обрабатывались в программе Microsoft Office Excel 2010. Для каждой группы из 25–30 особей определялось среднее значение параметра и стандартное отклонение от среднего значения. В качестве количественного критерия развития бластемы использовали коэффициент регенерации

$$R = \frac{s}{S} \cdot 100\%,$$

где  $s$  – площадь проекции бластемы;  $S$  – площадь проекции регенерирующего фрагмента [5, 8].

### Результаты исследования и их обсуждение

Метод прижизненной компьютерной морфометрии требует регламентации некоторых параметров эксперимента, однако предполагает и определённый субъективный компонент, определяемый квалификацией оператора.

**Яркость и однородность освещения** поля зрения микроскопа влияют на качество получаемого изображения планарии и на ошибку измерения длин и площадей. Яркость освещения подбирается по мак-

симальному количеству видимых деталей и оттенков серого на изображении планарии. Оператору необходимо тщательно устанавливать яркость и однородность освещения непосредственно перед каждым экспериментом.

**Отбор однородных особей** оператору необходимо осуществлять для каждой серии экспериментов. В идеале следует получить качественное изображение и провести замеры длины и площади проекции каждой планарии, а затем отобрать 30 особей с близкими морфометрическими параметрами. На практике удовлетворительного результата можно добиться при оценке длины планарии в поле зрения микроскопа. При этом следует учитывать, что длина послеоперационной планарии или планарии, разделившейся бесполом путём, восстанавливается через 20 дней, а пропорции тела – только через 30 дней [2, 8]. Это означает, что конкретную особь не следует использовать в очередном эксперименте в течение одного месяца после операции или акта бесполого размножения.

**Ампутация определённых фрагментов планарии** осуществляется оператором, и вклад этого процесса в погрешность эксперимента определяется только опытом оператора. Длительность операции по ампутации определённых частей тела планарии желательно минимизировать. Ограничения на время проведения операции определяются, в частности, тем фактом, что эффект действия слабого магнитного поля зависит от продолжительности экспозиции и времени между операцией и началом экспозиции [3, 4, 6]. Очевидно, что максимальная ошибка, связанная с продолжительностью операции, возникает при физических или химических воздействиях, задаваемых непосредственно или через небольшой промежуток времени после ампутации.

**Регистрация площади проекции и длины тела планарии** является ключевым моментом эксперимента и требует стандартизации положения планарии в горизонтальной плоскости в поле зрения микроскопа. Условиям стандартизации удовлетворяет равномерное горизонтальное движение планарии, когда особь максимально распластана и движется посредством ресничек. Для определения этого момента необходима определённая квалификация оператора, т.к. регистрируемая длина тела и площадь проекции планарии могут быть меньше реальных на 10–20%. Это означает, что из нескольких изображений, полученных на одном и том же регенерирующем фрагменте, следует отбирать изображение с максимальными значениями длины тела и площади проекции.

**Влияние температуры на процесс регенерации планарий** исследовалось в диапазоне от 15 до 35 °С. На рис. 1 изображены средние значения площади проекции бластемы регенерирующей планарии после отсечения головного фрагмента на уровне глаз и стандартное отклонение. Наибольшее значение площади проекции регенерирующей планарии *Dugesia (Girardia) tigrina* через 72 часа после операции было обнаружено при 26 °С [3, 4].

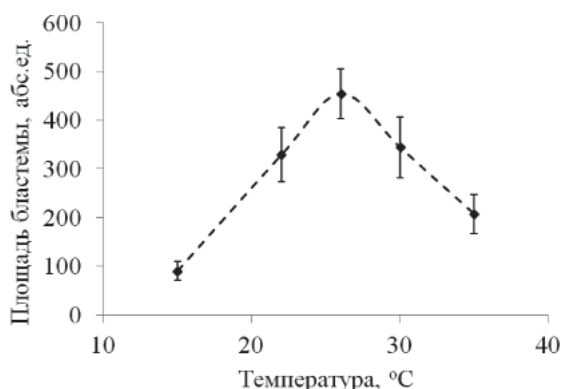


Рис. 1. Температурная зависимость площади проекции бластемы планарий через 72 часа после декапитации

Неконтролируемые колебания температуры вблизи максимума не вызывают достоверных изменений регистрируемых параметров. Более того, величина площади бластемы при 26 °С в 2 раза больше величины, полученной при комнатной температуре (рис. 1). Минимизация ошибок, связанных с разностью температур между сосудами с планариями, расположенными в разных местах одной комнаты, с влиянием годовых и суточных ритмов, достигается термостатированием помещения и затемнением сосудов с планариями, что не учитывалось в наших ранних работах [1, 2, 5–11] и в большинстве современных зарубежных исследований [12–15].

**Влияние фазы процесса регенерации на величину коэффициента регенерации** значительно. Как было показано на рис. 1, процесс регенерации при 26 °С протекает активнее, чем при более низких температурах, и, следовательно, та фаза регенерации, которая при 21 °С наступала через 72 часа после операции, при 26 °С наступит уже через 48 часов. Сравнение значений коэффициентов регенерации от времени после операции при разных температурах приведено на рис. 2. Для того чтобы сократить время эксперимента, можно наблюдать за процессом регенерации планарий при температуре 26 °С, а показания снимать уже через 48 часов. Коэффициент регенерации в таком слу-

чае будет равен примерно 1,9%, что соответствует коэффициенту регенерации при 21 °С на 72 часа. Действительно, при температуре 20–21 °С слабое комбинированное магнитное поле, настроенное в режиме параметрического резонанса на ионы кальция через 72 часа после декапитации, приводило к стимуляции процесса регенерации [6]. При температуре 26 °С стимулирующий эффект регистрировался уже через 48 часов, а через 72 часа эффект слабого поля практически не отличался от фона [3, 4].

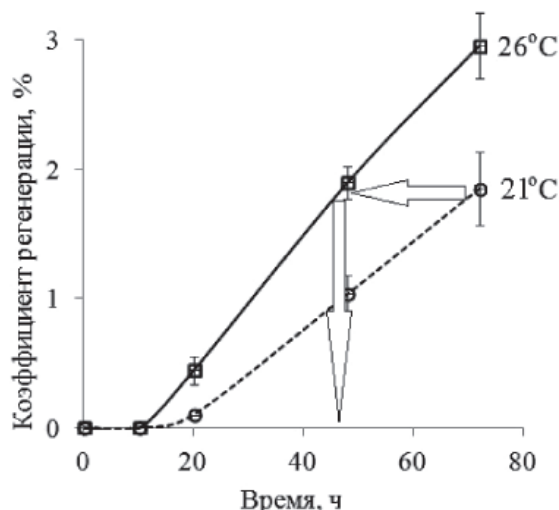


Рис. 2. Изменение коэффициента регенерации планарий в течение 72 часов после декапитации при температурах 21 и 26 °С

Это означает, что отсутствие эффекта физического или химического фактора при произвольном выборе начала и длительности экспозиции вовсе не свидетельствует об отсутствии чувствительности биологического объекта к конкретному воздействию. Причины плохой воспроизводимости результатов со слабыми электромагнитными полями могут крыться в отсутствии должного внимания как к температурным, так и к временным параметрам конкретного эксперимента [3, 4].

**Оценка вклада погрешностей аппаратуры, компьютерных программ и оператора** в ошибку эксперимента может быть проведена на основании измерений, представленных в таблице.

Величины стандартного отклонения от среднего значения площади и длины планарии при разных режимах измерения

Серия измерения	Стандартное отклонение, $\delta$	
	площади $\delta S, \%$	длины $\delta L, \%$
1	0,9	0,13
2	3,4	3,4
3	15,4	11,6

Все измерения были выполнены при оптимальной освещенности поля зрения. В первой серии одно изображение одной планарии замерялось 30 раз, во второй серии – 30 изображений одной планарии замерялось по одному разу, а в третьей серии измерялись у 30 разных планарий по одному разу. Оценка стандартного отклонения проводилась в программе Microsoft Office Excel 2010. Из таблицы следует, что ошибки измерений, выполненных на 30 изображениях одной планарии (серии 2), в несколько раз превосходят ошибки, возникающие при 30-кратном анализе единственного изображения (серия 1). Это означает, что определяемая оператором расплывчатость единственной планарии вносит существенный вклад в ошибку измерения морфометрических параметров (серия 2). Ответственность оператора за точность измерения существенно возрастает при проведении измерений на 30 различных планариях (серия 3). Ошибка при этом складывается из морфометрических различий 30 отобранных особей, из ошибки оператора при хирургическом удалении фрагментов тела планарии, а также из всех ошибок, возникающих в серии 2. Разница между ошибками длин и площадей, полученными в серии 3 и серии 2, определяется только человеческим фактором.

Таким образом, максимальный вклад в ошибку эксперимента вносят морфометрические различия отобранных особей и ошибки экспериментатора при ампутации фрагментов тела планарии. Это означает, что повышение квалификации экспериментатора позволяет уменьшить ошибку измерения морфометрических показателей в несколько раз.

### Заключение

Преимущества компьютерной морфометрии живой планарии по сравнению с изучением отдельных изображений фиксированного объекта очевидны, однако требуют соблюдения четкой инструкции. В частности, показано, что максимальный вклад в погрешность морфометрических измерений вносят ошибки оператора при отборе одинаковых особей, ошибки при ампутации различных фрагментов тела планарии, а также ошибки при выборе момента регистрации изображения, когда особь максимально распластана и движется посредством ресничек. Эти ошибки определяются опытом экспериментатора. Таким образом, повышение квалификации экспериментатора позволяет уменьшить ошибку измерения

морфометрических показателей в несколько раз.

*Работа проведена при поддержке гранта по Госзаданию Министерства образования и науки РФ. (Проект № 2912).*

### Список литературы

1. Асланиди К.Б., Тирас Х.П. Установка для графической регистрации поведения планарий // ЖВНД. – 1981. – т. 31, № 4. – С. 874–877.
2. Тирас Х.П. Морфогенез и способы регенерации планарий // Журнал общей биологии. – 1986. – Т. 47, № 1. – С. 103–109.
3. Тирас Х.П., Петрова О.Н., Мьякишева С.Н., Асланиди К.Б. Биологические эффекты слабых магнитных полей: сравнительный анализ // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12 (часть 7). – С. 1442–1451.
4. Тирас Х.П., Петрова О.Н., Мьякишева С.Н., Попова С.С., Асланиди К.Б. Влияние слабых магнитных полей в разные фазы регенерации планарии // Биофизика. – 2015. – т. 60, № 1. – С. 158–163.
5. Тирас Х.П., Сахарова Н.Ю. Прижизненная морфометрия регенерации планарий // Онтогенез. – 1984. – № 15(1). – С. 42–48.
6. Тирас Х.П., Скавуляк А.Н., Асланиди К.Б., Иваницкий Г.Р. Почему эффекты от воздействия слабых комбинированных магнитных полей на биосистемы не всегда воспроизводимы? // ДАН. – 2012. – т. 443, № 6. – С. 1–3.
7. Тирас Х.П., Сребницкая Л.К., Ильясова Е.Н., Климов А.А., Леднев В.В. Влияние слабого магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina* // Биофизика. – 1996. – т. 41, в. 4. – С. 826–831.
8. Тирас Х.П., Хачко В.И. Показатели и стадии регенерации планарий // Онтогенез. – 1990. – 21(6). – С. 620–624.
9. Тирас Х.П., Шейман И.М. Химические факторы – регуляторы морфогенеза планарий // Онтогенез. – 1984. – т. 15, № 4. – С. 374–380.
10. Шейман И.М. Регуляторы морфогенеза и их адаптивная роль. – М.: Наука, 1984. – 174 с.
11. Шейман И.М., Тирас Х.П. Влияние хода регенерации ганглия на обучение планарий // Онтогенез. – 1981. – т. 12, № 4. – С. 63–638.
12. Adell T., Cebria F., Salo E. Gradients in planarian regeneration and homeostasis // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2010. – Jan;2(1):a000505. doi: 10.1101/cshperspect.a000505.
13. Baguna J. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes // Int J Dev Biol. – 2012. – № 56(1–3). – 19–37. doi: 10.1387/ijdb.113463jb.
14. Reddien PW. Specialized progenitors and regeneration // Development. – 2013. – Mar; № 140(5). – 951–7. doi: 10.1242/dev.080499.
15. Robb SM, Sanchez Alvarado A. Histone modifications and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea* // Curr Top Dev Biol. – 2014. – 108: 71–93. doi: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00004-8.

### References

1. Aslanidi K.B., Tiras H.P. Ustanovka dlja graficheskoy registracii povedenija planarij // ZhVND. 1981. t. 31, no. 4. pp. 874–877.
2. Tiras H.P. Morfogenez i sposoby regeneracii planarij // Zhurnal obshhej biologii. 1986. t.47, no. 1. pp. 103–109.
3. Tiras H.P., Petrova O.N., Mjakisheva S.N., Aslanidi K.B. Biologicheskie jeffekty slabyh magnitnyh polej: sravnitelnyj analiz // Fundamentalnye issledovanija. 2014. no. 12 (chast 7). pp. 1442–1451.

4. Tiras H.P., Petrova O.N., Mjakisheva S.N., Popova S.S., Aslanidi K.B. Vlijanie slabych magnitnyh polej v raznye fazy regeneracii planarii // Biofizika. 2015. t. 60, no. 1. pp. 158–163.
5. Tiras H.P., Saharova N.Ju. Prizhiznennaja morfometrija regeneracii planarij // Ontogenez. 1984. no. 15(1). pp. 42–48.
6. Tiras H.P., Skavuljak A.N., Aslanidi K.B., Ivanickij G.R. Pochemu jeffekty ot vozdejstvija slabych kombinirovannyh magnitnyh polej na biosistemy ne vseгда vosproizvodimy? // DAN. 2012. t. 443, no. 6. pp. 1–3.
7. Tiras H.P., Srebnickaja L.K., Iljasova E.N., Klimov A.A., Lednev V.V. Vlijanie slabogo magnitnogo polja na skorost regeneracii planarij Dugesia tigrina // Biofizika. 1996. t. 41, v. 4. pp. 826–831.
8. Tiras H.P., Hachko V.I. Pokazateli i stadii regeneracii planarij // Ontogenez. 1990. 21(6). pp. 620–624.
9. Tiras H.P., Shejman I.M. Himicheskie faktory reguljatory morfogeneza planarij // Ontogenez. 1984. t. 15, no. 4. pp. 374–380.
10. Shejman I.M. Reguljatory morfogeneza i ih adaptivnaja rol. M.: Nauka, 1984. 174 p.
11. Shejman I.M., Tiras H.P., Vlijanie hoda regeneracii ganglija na obuchenie planarij // Ontogenez. 1981. t. 12, no. 4. pp. 63–638.
12. Adell T., Cebria F., Salo E. Gradients in planarian regeneration and homeostasis // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010. Jan;2(1):a000505. doi: 10.1101/cshperspect.a000505.
13. Baguna J. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes // Int J Dev Biol. 2012. no. 56(1–3). 19–37. doi: 10.1387/ijdb.113463jb.
14. Reddien PW. Specialized progenitors and regeneration // Development. 2013. Mar; no. 140(5). 951–7. doi: 10.1242/dev.080499.
15. Robb SM, Sanchez Alvarado A. Histone modifications and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea* // Curr Top Dev Biol. 2014. 108: 71-93. doi: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00004-8.

---

**Рецензенты:**

Буданцев А.Ю., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, г. Пущино;  
Полозов Р.В., д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 06.03.2015.