

## Navorsingsbriewe

# Ultrastrukturele kwantifisering van mikrotubuli in volledige selprofiële

Ontvang 16 Mei 1991; aanvaar 12 September 1991

### ABSTRACT

#### Ultrastructural quantification of microtubules in complete cell profiles

*The ultrastructural morphometric quantification of cytoplasmic microtubular distribution densities requires electron micrograph magnifications whereby only small cytoplasmic areas are included per negative. Consecutive electron micrographs can be composed in montages to attain complete profiles of high magnification cell sections. Conventional morphometric methods are not suitable for application on areas that may be as great or even greater than 1 m<sup>2</sup> in size. Modifications of conventional morphometric technology to facilitate investigations of this nature are described. Statistical comparison of results obtained with this method and a standard method reflect the soundness of the modifications.*

Die noodsaaklikheid van intakte funksionele mikrotubuli vir insulienvrystelling deur die B-selle van pankreaseilande is welbekend.<sup>1,3</sup> In glukose gestimuleerde B-selle korreleer die hoeveelheid mikrotubuli in die sitoplasma direk met die kwantiteit van insulienvrystelling,<sup>4,6</sup> en word mikrotubuli dus as 'n essensiële komponent van die effektorsisteem van hierdie selle beskou. Ofskoon die mikrotubulêre inhoud van weefsel deur middel van kolgisienbindingstegnieke biochemies bepaal kan word,<sup>7,8</sup> beteken dit in die geval van geïsoleerde eilandjies van Langerhans dat die resultate ook die mikrotubulêre inhoud van al die ander selstipes in eilandweefsel<sup>9</sup> omsluit. In die praktyk word verkreeë resultate aan gebeure in B-selle alleen toegedig, aangesien hierdie selstipe in die eilandweefsel van die meeste spesies in elk geval ongeveer 75% van die totale endokrienselmasse verteenwoordig. Die persentasie B-selle per eilandjie kan egter varieer, trouens Baetens *et al.*<sup>10</sup> onderskei op grond van selsamestelling twee tipes eilandjies in die rotpankreas. In dun snitte kan mikrotubuli egter in spesifieke selle van die eilandjies morfometriese vanaf elektronmikrograwe gekwantifiseer word en is isolering van die eilandjies nie 'n voorvereiste nie. Mikrotubuli word eenvoudig per eenheidsoppervlakte getel.<sup>11-13</sup> Reaven<sup>14</sup> wys egter daarop dat met so 'n benadering die kortste en langste longitudinale segmente van mikrotubuli verkeerdelik gelykwaardig geag word. 'n Wanbeeld van die verspreidingsdigtheid van mikrotubuli kan dus verkry word. Reaven en Reaven<sup>15, 16</sup> Dean<sup>17</sup> en Theron *et al.*<sup>18</sup> oorbrug die probleem deur 'n punttellingsmetode te benut. Deursigtige roosters word in hierdie geval oor die elektronmikrograwe geplaas en die lynafsnidings of punte (P) wat op mikrotubuli asook op die sitoplasma val, afsonderlik getel. Die mikrotubulêre verspreidingsdigtheid ("konsentrasie"), (uitgedruk as 'n persentasie), word verkry deur die vergelyking:

$$(P_{\text{mikrotubuli}}/P_{\text{sitoplasma}}) \times 100.$$

Die relatiewe klein afmetings van mikrotubuli (of die hoë-

vergrotingelektronmikrograwe) beperk die sitoplasma-area wat prakties ondersoek kan word. Daar moet gevolglik teruggeval word op lukrake seleksie van klein sitoplasma-areas uit 'n betrokke sel. In B-selle is mikrotubuli normaalweg nie eweredig deur die sitoplasma versprei nie, maar kom byvoorbeeld in groter konsentrasies in die perinukleêre area voor.<sup>19</sup> Sekresiegranules in gestimuleerde selle konsentreer egter weer aan die kapillêre selpool.<sup>20</sup> "Voorkeurverspreiding" van mikrotubuli kom ook algemeen in ander selsoorte voor.<sup>21</sup> Die anisotrope verspreiding van selorganelle, insluitende mikrotubuli, mag uiteraard morfometriese resultate komprometeer. Gelyktydige bepaling van die mikrotubulêre verspreiding in verskillende sitoplasma-areas van die sel mag noodsaaklik wees in ondersoeke na die spesifieke regionale mikrotubulêre organisasie en moontlike funksionele veranderinge gekoppel daaraan. In 'n ondersoek na mikrotubulêre verspreidingsdigtheid in voorafgedefinieerde sitoplasma-areas van B-selle, is erkende morfometriese tegnologie aangepas waarmee mikrotubuli akkuraat in volledige seldeursnitte gekwantifiseer kan word.

Selprofiële is verkry deur 10 – 15 afsonderlike mikrograwe teen 'n finale afdrukvergroting van x40 000 sô in montage saam te stel dat volledige seldeursnitte daargestel kon word (fig. 1). By vermelde vergroting is die dwarsdeursnit van mikrotubuli presies 1 mm op die montage. Die kriteria waaraan 'n tubulus moet voldoen alvorens dit in die morfometriese metings opgeneem word, is dat dit onvertak en 'n minimumlengte van 5 mm moet hê, wat in beginsel ooreenstem met dié van ander navorsers.<sup>22, 23</sup> Uiteraard was tubuli wat in die dwarste deurgensny is, nie in berekening nie. Die lengte van elke afsonderlike mikrotubulus is met 'n verdeelpasser gemeet en op die foto gemerk. Hierdie gemete lengtes is op papier liniêr sommeer. Die betrokke sitoplasma-area is sorgvuldig deursoek, deur 90° roteer en weer deursoek vir mikrotubuli wat moontlik oorgeslaan kon word. Die hele proses is viermaal herhaal. Die oorgedraagde afstand op die papier is in millimeter gemeet wat dan die eenheidsoppervlakte van die mikro-

tubuli direk in  $\text{mm}^2$  weerspieël. Die betrokke oppervlakte waarin die tubuli voorgekom het, is planimetries bepaal en uitgedruk in  $\text{mm}^2$ . Die mikrotubulêre verspreidingsdigthede is verkry deur die kwosient van die totale mikrotubulêre oppervlakte en die betrokke sitoplasma-oppervlakte. Om die geldigheid en herhaalbaarheid van die morfometriese prosedure (lengtemetingsmetode) te kon-



FIGUUR 1: 'n Fotoweergawe van 'n montage van 'n B-sel uit 'n eilandjie van Langerhans. In die voorbeeld het 12 elektronmikrograwe, teen 40 000x-vergroting, die volledige selprofiel gedek. Mikrotubuli kan nie op die verkleinde weergawe van die oorspronklike montage (800 mm x 500 mm) onderskei word nie.

TABEL 1

Gemiddelde mikrotubulêre verspreidingsdigthede (MVD),  $\times 10^{-4}$ , verkry deur die punttellings- en lengtemetingsmetode vir elke groep van vyf identiese elektronmikrograwe

Groep*	PUNTELLING			LENGTEMETING		
	MVD	SA	%SA	MVD	SA	%SA
1	151	25	16,6	138	8	5,8
2	120	5	4,2	122	7	5,7
3	238	42	17,6	253	15	5,9
4	130	19	14,6	132	5	2,8
5	105	31	29,5	82	7	8,5
Gem	149	24	16,5	145	8	5,9

\* Vyf mikrograwe per groep.

troleer, is dié metode sowel as die punttelmetode op 'n reeks van 25 B-sel mikrograwe toegepas.

Ongeag die bepalingmetode dui die resultate daarop dat die gemiddelde mikrotubulêre verspreidingsdigthede vir die onderskeie groepe dieselfde basiese tendense vertoon. (Groep 3 lewer byvoorbeeld die hoogste waardes op, groep 1 die tweede hoogste, groep 5 die laagste, ensovoorts.) Die gemiddelde waardes vir die twee groepe (25 mikrograwe) verskil nie statisties beduidend nie. Indien die statistiese verspreiding van waardes uit die twee metodes vergelyk word, blyk dit duidelik dat die lengtemetingsmetode vir meer betroubare resultate sorg. Die koëffisiënt van variasie wissel in hierdie geval tussen 3,8% en 8,5% (gem. 5,9%) teenoor die punttellingsmetode waar die reikwydte strek van 4,2% tot 29,5% (gem. 16,5%). Die lengtemetingsmetode kom voor as 'n bruikbare (selfs beter) manier om mikrotubuli in groter sitoplasma-areas te kwantifiseer as ander bekende metodes.

'n Vergelykende ondersoek het getoon dat biochemiese en morfometriese metodes vergelykbare resultate vir die aanwesigheid van mikrotubuli in hepatosiete lewer.<sup>23</sup> Buiten globale ooreenkomstige resultate kan laasgenoemde metode meer uitgebreide inligting verskaf. Die regionale verspreiding van mikrotubuli deur die selsitoplasma en moontlike korrelasie met die verspreiding van ander selorganelle, kan nie biochemies bepaal word nie. Voorts mag die totale mikrotubulêre inhoud van 'n sel onveranderd bly, terwyl funksioneel belangrike regionale verskuiwings in die intrasellulêre voorkoms van die mikrotubuli plaasvind. Die relatiewe aard van sodanige verskuiwings van een sitoplasma-area na 'n ander (byvoorbeeld vanaf perinukleêr na subplasmalemmaal), sonder dat die verspreidingsdigtheid in die intermediêre area verander, vereis die ondersoek van volledige seldeursnitte.

Op selffraksioneringsvlak is dit moontlik om riële lengtes van geïsoleerde mikrotubuli aan te wend om mikrotubuli te kwantifiseer.<sup>24</sup> Op die vlak van intakte selle het Luftig *et al.*<sup>25</sup> wel mikrotubuluskontoerlengtes op enkel elektronmikrograwe ( $\times 23\ 000$ ) sommeer en dit vergelyk met die gewig van kalkeerpapiernatreksels van die betrokke sitoplasma-areas. Ware oppervlakte/oppervlakteverhoudings was gevolglik nie gebruik om verspreidingsdigthede vas te stel nie. Voorts sal sodanige metode ook nie prakties wees vir die ondersoek van volledige seldeursnitte nie.

Morfometrie bly steeds die enigste wyse waarop die intrasellulêre verspreiding van mikrotubuli en moontlike regionale aanpassings in hierdie effektorsisteem van die sel, onder normale fisiologiese of patologiese toestande, kwantitatief nagegaan kan word. In ondersoeke na die sitoplasmiese mikrotubulêre inhoud waar volledige seldeursnitte aangewend is, is die gemodifiseerde lengtemetingsmetode 'n akkurate en relatief eenvoudige metode om die mikrotubulêre inhoud direk vanaf elektronmikrograwe te meet. Die metode kan met dieselfde mate van sukses op kleiner sitoplasma-areas toegepas word.

#### A. CROUS\* en A.M. DE BEER

Departement Fisiologie, Fakulteit Geneeskunde, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Posbus 339, Bloemfontein 9300

\*Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

## LITERATUURVERWYSINGS

1. Howell, S.L. & Tyhurst, M. (1982). Microtubules, microfilaments and insulin secretion, *Diabetologia*, 22, 301-308.
2. Boyd, A.E. (III), Bolton, W.E. & Brinkley, B.R. (1982). Microtubules and beta cell function: Effects of colchicine on microtubules and insulin secretion *in vitro* by mouse beta cells, *J. Cell. Biol.*, 92, 425-434.
3. Van Obberghen, E., Somers, G., Devis, G., Ravazzola, M., Malaisse-Lagae, F., Orci, L. & Malaisse, W.J. (1974). Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system, *Endocrinology*, 95, 1518-1528.
4. McDaniel, M.L., Bry, C.G., Homer, R.W., Fink, C.J. Ban, D. & Lacy, P.E. (1980). Temporal changes in islet polymerized and depolymerized tubulin during biphasic insulin release, *Metabolism*, 29, 762-766.
5. Pipeleers, D.G., Pipeleers-Marichal, M.A. & Kipnis, D.M. (1976). Microtubule assembly and the intracellular transport of secretory granules in pancreatic islets, *Science*, 191, 88-89.
6. Montaque, W., Howell, S.L. & Green, I.C. (1976). Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans, *Horm. Metab. Res.*, 8, 166-169.
7. Montaque, W., Howell, S.L. & Green, I.C. (1975). Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans, *Biochem. J.*, 148, 237-243.
8. Patzelt, C., Singh, A., Le Marchand, Y., Orci, L. & Jeanrenaud, B. (1975). Colchicine-binding protein of the liver, *J. Cell. Biol.*, 66, 609-620.
9. Orci, L. (1982). Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas, *Diabetes*, 31, 538-565.
10. Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A. & Orci, L. (1979). Endocrine pancreas: Three-dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans, *Science*, 206, 1323-1324.
11. Houlston, E., Pickering, S.J. & Maro, B. (1987). Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres, *J. Cell. Biol.*, 104, 1299-1308.
12. Rubin, R.W. & Weiss, G.D. (1975). Direct biochemical measurements of microtubule assembly and disassembly in Chinese hamster ovary cells, *J. Cell. Biol.*, 64, 42-53.
13. Brinkley, B.R. & Cartwright, J. (Jr). (1971). Ultrastructural analysis of mitotic spindle elongation in mammalian cells *in vitro*, *J. Cell. Biol.*, 50, 416-431.
14. Reaven, E. (1982). Stereological analysis on microtubules in cells with special reference to their possible role in secretion, *Methods. Cell. Biol.*, 25, 273-283.
15. Reaven, E.P. & Reaven, G.M. (1975). A quantitative ultrastructural study of microtubule content and secretory granule accumulation in parathyroid glands of phosphate- and colchicine-treated rats, *J. Clin. Invest.*, 56, 49-55.
16. Reaven, E.P. & Reaven, G.M. (1980). Evidence that microtubules play a permissive role in hepatocyte very low density lipoprotein secretion, *J. Cell. Biol.*, 84, 28-39.
17. Dean, P.M. (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic B-cell, *Diabetologia*, 9, 115-119.
18. Theron, J.J., Biagio, R. & Meyer, A.C. (1981). Circadian changes in microtubules, synaptic ribbons and synaptic fields in the pinealocytes of the baboon (*Papio ursinus*), *Cell. Tissue. Res.*, 217, 405-413.
19. Bolton, W.E., Boyd, A.E. (III), Terrell, S.P., Andrews, K.L. & Redwine, W.A. (1982). Human pancreatic B-cells *in vitro*: Microtubule and insulin immunofluorescence, *Diabetologia*, 23, 280-283.
20. Bonner-Weir, S. (1984). Morphological evidence for B-cell polarity in the islets of Langerhans in the rat, *Diabetes*, 33, 81a.
21. Reaven, E.P. & Reaven, G.M. (1977). Distribution and content of microtubules in relation to the transport of lipid, *J. Cell. Biol.*, 75, 559-572.
22. Raven, E.P., Cheng, Y. & Miller, M.D. (1977). Quantitative analysis of tubulin and microtubule compartments in isolated rat hepatocytes, *J. Cell. Biol.*, 75, 731-742.
23. Matsuda, Y., Baraona, E., Salaspuro, M. & Lieber, C.S. (1979). Effects of ethanol on liver microtubules and Golgi apparatus, *Lab. Invest.*, 41, 455-463.
24. Reaven E. & Azhar, S. (1981). Effects of various hepatic membrane fractions on microtubule assembly – with special emphasis on the role of membrane phospholipids, *J. Cell. Biol.*, 89, 300-308.
25. Luftig, R.B., McMillan, P.N., Weatherbee, J.A. & Wehling, R.R. (1977). Increased visualization of microtubules by an improved fixation procedure, *J. Histochem. Cytochem.*, 25, 175-187.