



РЕВИТЦЕР

Алла Вафаевна

**МОДИФИКАЦИЯ ФРАКТАЛЬНОГО ПОДХОДА ДЛЯ АНАЛИЗА ПЕРЕСТРОЕК
ЦИТОСКЕЛЕТА НА ПРИМЕРЕ ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Научный руководитель: **Негуляев Юрий Алексеевич**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Крутецкая Зоя Иринарховна**
доктор биологических наук, профессор, профессор с возложением обязанностей заведующего кафедрой биофизики биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ) (г. Санкт-Петербург)
Сибаров Дмитрий Александрович
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной нейрофизиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН) (г. Санкт-Петербург)

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (ИФ РАН) (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится **20 сентября 2023 г. в 11:00** на заседании диссертационного совета **У.1.5.2.22** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/independent-award-academic-degrees/defences-calendar/> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Клетка – это сложно организованная трехмерная система, обладающая целым рядом высокодинамичных клеточных структур, морфология которых сложна для описания, так как является протяженной, изрезанной, неровной. Примеры этих структур: эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, кристы митохондрий, цитоскелет (в частности актиновый). Форма и перестройки этих структур тесно связаны с функционированием клетки и возможность какой-либо характеристики этих изменений является актуальной задачей для исследователей. Проблема заключается в том, что клеточные структуры достаточно сложно количественно оценить – в настоящее время это чаще всего происходит «на глаз», что может привести к субъективным результатам. Получение численного эквивалента организации или формы позволило бы объективно и непредвзято сравнивать такие структуры в различных экспериментах, например, после воздействия биологически активных веществ. Вычисление фрактальной размерности изображений клеточных структур может дать численный ответ на этот вопрос. Фрактальная размерность – это коэффициент, описывающий структуры или множества на основе количественной оценки их сложности, как коэффициент изменения сложности (детализированности) рисунка с изменением масштаба. Существующие программы для вычисления фрактальной размерности изображений имеют недостаток, который может стать критичным для их использования в биологических задачах ученого-биолога: необходимость выбирать параметры расчета (например, размер и положение сетки для вычисления фрактальной размерности Минковского) вручную, что требует понимания принципов расчета. Учитывая огромное разнообразие размеров и форм клеток в общем, и клеточных систем в частности, некорректный выбор параметров может давать некорректные оценки, которые не позволят проводить сравнительный анализ. Но возможно модифицировать расчет так, чтобы эти параметры определялись с помощью самой программы однозначно, пользуясь каким-то принципом, например на основе положения и размера клеточного ядра, размер и положение которого варьирует в небольших пределах в популяции клеток одного типа. В представленной работе такая модификация была разработана на основе анализа изображений флуоресцентно-окрашенных ядер и фибриллярного актина мезенхимных стволовых клеток (МСК). Эта модель привлекательна тем, что МСК имеют хорошо выраженные стресс-фибриллы.

В настоящее время регенеративная медицина активно разрабатывает методы лечения пораженных тканей организма с помощью клеток-предшественников и мезенхимных стволовых клеток (МСК), однако, не всегда такая терапия обладает высокой эффективностью. Основные проблемы данного вида терапии заключаются в том, что только небольшой процент введенных в организм клеток оказывается и остается в месте повреждения, большая же часть клеток обнаруживается в мелких кровеносных сосудах и, впоследствии, погибает в них [Song and Li, 2011].

Использование различных агентов, влияющих на актиновый цитоскелет и, соответственно, на миграционный потенциал клеток-предшественников и МСК, считается одним из способов преодоления этой проблемы. МСК культивируются исследователями в присутствии этих агентов до того, как клетки будут трансплантированы в организм реципиента. Известно уже много таких веществ, но продолжается и поиск новых.

Одним из потенциальных модуляторов актинового цитоскелета МСК является предсердный натрийуретический пептид (ПНП), он способен оказывать влияние на актиновые структуры и подвижность эндотелиальных клеток [Kook et al., 2003]; так же показано нарушение миграции МСК у мышей с нокаутом рецептора натрийуретического пептида типа А [Mallela et al., 2013a]. Тем не менее, остается неизвестным, способен ли предсердный натрийуретический пептид оказывать существенное влияние на актиновый цитоскелет и миграцию стволовых клеток; этот вопрос недостаточно изучен, как в моделях *in vivo*, так и в моделях *in vitro*.

В современных исследованиях используется большое количество методов оценки комплексных изменений миграционного потенциала и цитоскелета: метод «зарастания раны», измерение параметров формы и размера клеток, окраска актиновых структур и последующий анализ полученных изображений. Одним из методов описания перестроек цитоскелета является оценка фрактальной размерности [Fuseler et al., 2007; Qian et al., 2012]. Изображение сети микрофиламентов можно рассматривать как сложную геометрическую структуру, в таком случае именно фрактальная размерность – дробный коэффициент, используемый для оценки сложных геометрических структур, – является логичным выбором для описания организации актинового цитоскелета и его изменений после различных воздействий. Однако на сегодняшний день использование фрактальной размерности Минковского не является частой практикой в анализе изображений клеточных структур; скорее всего это происходит по причине большого влияния на конечный результат субъективного выбора параметров расчета.

Появление новых подходов в регенеративной медицине и необходимость более детального анализа данных все острее ставит вопрос о квантификации предполагаемых изменений актинового цитоскелета, актуальность таких задач очевидна, как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Есть основания полагать, что в качестве перспективного инструмента оценки перестроек актинового цитоскелета могут быть предложены и использованы новые модификации метода вычисления фрактальной размерности Минковского.

Степень разработанности темы исследования

В современной литературе описаны методы квантификации для фибриллярного актина, самым популярным из которых является вычисление средней интенсивности флуоресценции [Mishra et al., 2019] для двумерного изображения, полученного с помощью флуоресцентной микроскопии. Однако, этот подход может только дать информацию о том, больше или меньше

фибриллярного актина стало в клетке после ее обработки интересующими нас биологически активными веществами. Таким образом, вычисление средней интенсивности флуоресценции будет являться численным эквивалентом сборки или разборки фибриллярного актина. В других ситуациях, когда происходит не сборка или разборка, а изменение конфигурации («формы») фибриллярного актина, вычисление средней интенсивности флуоресценции становится неинформативным и не может быть использован для корректных оценок и получения статистически различимых результатов между экспериментальными группами. В свою очередь, существует фрактальная размерность Минковского [Qian et al., 2012], которая представляет собой коэффициент изменения сложности (детализированности) рисунка с изменением масштаба. Этот коэффициент позволяет количественно оценить сложность структуры, в том числе и для случаев изменения конфигурации фибриллярного актина. Примерно 10 лет назад были предприняты попытки применения фрактальной размерности Минковского для квантификации фибриллярного актина: в работе [Fuseler et al., 2007] проводят расчеты для МСК человека, выявляя влияние оксида азота; в работе [Ristanović et al., 2014] анализируют морфологию дендритов; в работе [Qian et al., 2012] оценивают воздействие микрогравитации на мышинные преостеобласты. Однако фрактальный подход с использованием размерности Минковского не стал повсеместно используемым. Разработанная модификация фрактального подхода позволит оценивать структуру фибриллярного актина в клетках и повысить применимость подхода.

Цель и задачи исследования

Цель исследования. Разработка модифицированного метода вычисления фрактальной размерности Минковского для характеристики перестроек фибриллярного актина в клетках, основанного на автоматическом подборе параметров расчета, учитывающем размер и положение клеточного ядра.

Задачи:

1. Разработать модифицированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского, основанный на автоматическом подборе параметров расчета, учитывающем размер и положение клеточного ядра, используя изображения фибриллярного актина, выявить численный эквивалент морфологической характеристики.
2. С помощью разработанного подхода оценить организацию фибриллярного актина в МСК до и после обработки ингибитором полимеризации актинового цитоскелета латрункулином Б в различных концентрациях.
3. С помощью разработанного подхода проанализировать состояние сети актиновых фибрилл в МСК крысы и человека после культивирования в присутствии предсердного натрийуретического пептида, потенциального модулятора актинового цитоскелета и клеточной подвижности.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработан модифицированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского, устанавливающий параметры вычислений автоматически на основе размера и положения клеточного ядра
2. Корректность разработанного метода показана на примере оценки изменения морфологии фибриллярного актина в МСК человека после обработки ингибитором полимеризации актина латрункулином Б по сравнению с контролем.
3. Разработанный метод определения численного эквивалента для морфологической характеристики цитоскелета позволил продемонстрировать и количественно охарактеризовать влияние предсердного натрийуретического пептида на организацию фибриллярного актина МСК человека и крысы.

Научная новизна работы

В работе впервые разработан и апробирован модифицированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского, автоматически определяющий параметры расчетов. Усовершенствованный подход содержит определение параметров расчета на основе размера и положения клеточного ядра, что позволяет выбирать эти параметры без участия пользователя и быстрее производить вычисления, получать данные, не зависящие от положения изображения клетки на микрофотографии и от решения пользователя. Показано, что усреднение результатов расчета с помощью вычисления размерности при различных положениях исследуемого изображения фибриллярного актина позволяет определить наиболее вероятное значение фрактальной размерности для изображения и избежать статистических выбросов. Показано, что для получения используемых в расчете изображений можно использовать широкопольную флуоресцентную микроскопию наряду с конфокальной без влияния на результирующее значение размерности с помощью разработанного метода.

В работе впервые представлены данные о влиянии предсердного натрийуретического пептида на актиновый цитоскелет и миграцию мезенхимных стволовых клеток. Определены зависимости между концентрациями ПНП и миграционным потенциалом МСК, выделенных из периренального жира крысы и МСК, выделенных из костного мозга 5-6 недельного эмбриона человека. Для изучения эффектов использован современный метод прижизненной цейтраферной съемки для наблюдения за процессом заращения экспериментальной раны, наносимой на монослой МСК. Так же впервые выявлены изменения организации фибриллярного актина МСК с помощью измерения фрактальной размерности изображений в контроле и после воздействия ПНП.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в разработке модифицированного метода вычисления фрактальной размерности Минковского для описания структуры фибриллярного

актина клетки, модифицированный метод в качестве численной «меры» структуры фибрилл позволяет оценить сложность морфологии цитоскелета, представляя цитоскелет как геометрическую фигуру. Численное описание архитектуры фибриллярного актина предоставляет возможность сравнить между собой значения, полученные в различных условиях, и делать выводы о воздействии использованных веществ, что может быть затруднительно сделать при визуальной оценке. Модификации метода, предложенные в работе, позволяют автоматизировать процесс подбора параметров для вычисления фрактальной размерности Минковского, что упрощает и ускоряет рабочий процесс для пользователя.

Практическая значимость заключается в том, что в рамках поставленной задачи полученные результаты дают представление о влиянии предсердного натрийуретического пептида на миграцию МСК, выделенных из периренального жира крысы, и МСК, выделенных из костного мозга 5-6 недельного эмбриона человека. Эти данные указывают на значимость концентрационного диапазона и необходимость дальнейшего изучения механизма влияния ПНП на миграцию и цитоскелет. Перспективы исследования состоят в дальнейшей оценке возможного применения ПНП в регенеративной медицине для усиления миграционного потенциала МСК и преодоления проблемы достижения МСК участков повреждения тканей и их заживления.

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели и выполнения задач в диссертационном исследовании применялись следующие методы клеточной биологии, молекулярной биологии и биофизики клетки: выделение МСК из жировой ткани, культивирование клеток, направленная дифференцировка, выделение РНК, ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени, иммунофлуоресценция, гистохимические окраски, микроскопия (оптическая, флуоресцентная широкопольная, конфокальная), цейтраферная съемка с помощью флуоресцентного микроскопа, метод заживления раны, метод Минковского для измерения фрактальной размерности изображения, компьютерная и статистическая обработка данных.

Личный вклад автора

Вклад Ревитцер А.В. в подготовку диссертации состоял в разработке нового подхода, опирающегося на использовании положения и размера клеточного ядра на микрофотографии при выборе параметров расчета, планировании исследования, проведении лично всех экспериментальных работ на базе Группы ионных механизмов клеточной сигнализации в составе Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук. Идея и способ модификации метода принадлежат лично автору. Написание программного продукта для вычисления фрактальной размерности Минковского изображений фибриллярного актина мезенхимных стволовых клеток велась совместно со старшим преподавателем Высшей школы программной

инженерии Института компьютерных наук и технологий Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого Селиным Иваном Андреевичем. Подготовка изображений, статистический анализ и обработка результатов выполнялась лично диссертантом, написание текстов публикаций проводилось совместно с соавторами.

Апробация работы

Основное содержание диссертационной работы изложено в 10 научных публикациях: 4 статьи в индексируемых в международных базах данных журналах (Web of Science, Scopus, eLIBRARY); 6 по материалам конференций.

Результаты исследования были представлены на VI Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (25 – 27 апреля 2018 г.), конференции с международным участием Неделя науки СПбПУ (19 – 24 ноября 2018 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» (8 – 11 октября 2019 г.), VII Молодежной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (12–15 октября 2020 г.), Всероссийской конференции «Неделя науки ИФНиТ» (16-20 ноября 2020 г.), конференция для молодых ученых LifeSciencePolytech (25-26 ноября 2021 г.).

Результаты работы были включены в отчеты по научно-исследовательской работе по грантам Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) № 16-34-00952 и Российского Научного Фонда (РНФ) № 18-15-00106.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список публикаций по теме диссертации, список литературных источников. Текст диссертации изложен на 132 страницах, содержит 42 рисунка и 8 формул. Список литературы представлен 97 источниками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка модифицированного метода вычисления фрактальной размерности

Минковского для анализа перестроек фибриллярного актина клетки

Вычисление фрактальной размерности Минковского (D) для изображений состоит из следующих этапов (рисунок 1): на изображение (рисунок 1, А) накладывается сетка (рисунок 1, Б) с ячейками некоторого размера (q), после чего проводится подсчет ячеек, которые содержат изображение (N), далее размер сетки уменьшается (рисунок 1, В) и проводится новый подсчет; спустя несколько таких циклов подсчета происходит построение графика зависимости размера ячеек от количества заполненных ячеек в логарифмических координатах (рисунок 1, Г), значение фрактальной размерности Минковского определяется как тангенс угла наклона полученной прямой.

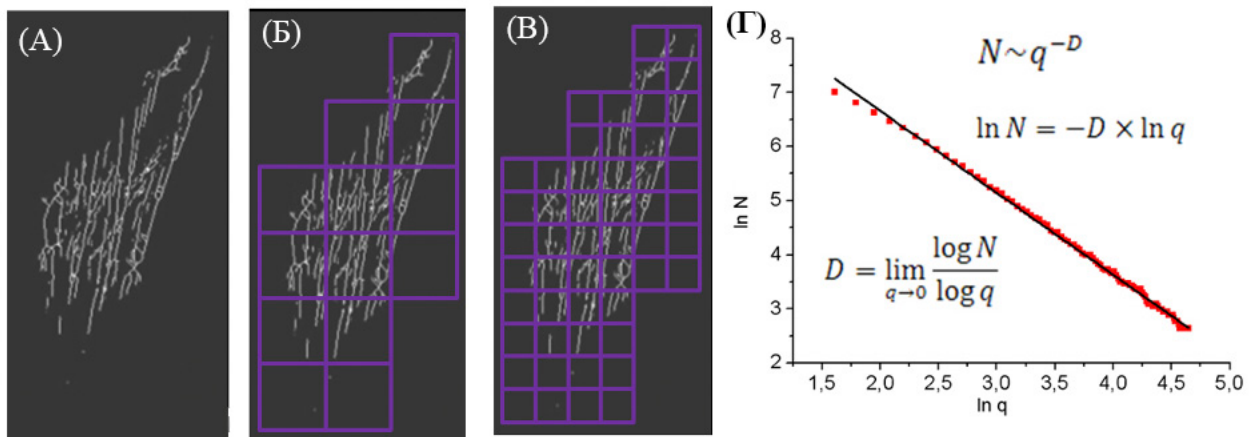


Рисунок 1 – Вычисление фрактальной размерности Минковского для изображения, пояснения в тексте ($D=1.52$)

Для разработки улучшенного метода измерения фрактальной размерности Минковского для изображений клеточных структур было решено автоматизировать подбор параметров вычисления. Для этого в качестве примера обрабатываемых данных были выбраны флуоресцентные изображения окрашенного фибриллярного актина в МСК человека (дермальные фибробласты линии FRSN) до и после воздействия ингибитора полимеризации актина латрункулина Б. Первым шагом в разработке стало изучение распределения возможных значений фрактальной размерности Минковского в зависимости от положения сетки и угла поворота изображения. Было выбрано случайное изображение из контрольной группы (без обработки латрункулином Б), с окрашенным родамином-фаллоидином фибриллярным актином и окрашенным ядром с помощью Hoechst (рисунок 2). Далее на изображение накладывалась сетка с размером ячейки 128 пикселей так, чтобы центр ячейки совпадал с центром ядра (рисунок 2, А, голубая точка) и производился подсчет фрактальной размерности Минковского с шагом уменьшения сетки в два раза, пока размер сетки не достигал 2 пикселей. После производился поворот изображения относительно центра ядра на 5° по часовой стрелке и расчет фрактальной размерности производился заново, так происходило пока изображение не совершало поворот на 360° результаты наносились на график (рисунок 2, Б). Для следующих вычислений сетка, применяемая для расчета, сдвигалась на 50 пикселей вверх (рисунок 2, А, красная точка), вправо (рисунок 2, А, фиолетовая точка), вправо вверх (рисунок 2, А, зеленая точка), так же после расчета проводился поворот изображения и расчеты (рисунок 2, Б). всего получилось 284 значения, по 71 значению в каждой группе (рисунок 2, Б).

Полученные значения фрактальной размерности Минковского рассматривались как распределения значений (рисунок 3). Для каждого положения центра сетки были построены боксплоты с вырезами (рисунок 3, голубой, фиолетовый, красный, зеленый графики), так же боксплот был построен для всех 284 значений (рисунок 3, черный график). Изображение данных в виде боксплотов с вырезами позволяет визуализировать важные статистические параметры:

верхние и нижние значения, выбросы, 25 и 75 процентиля, медиану, 95% доверительный интервал медианы. Так же на графики были нанесены внутригрупповые средние значения в виде крестов (×).

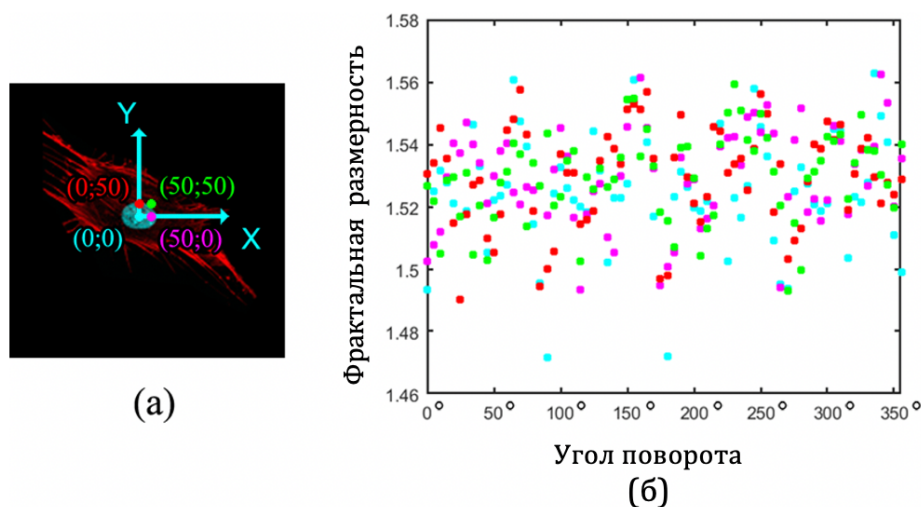


Рисунок 2 – Распределения значений фрактальной размерности Минковского для изображения клетки с окрашенным фибриллярным актином в зависимости от положения сетки и угла поворота изображения. А – четыре (голубая, зеленая, красная, сиреневая точки) расположения центра ячейки накладываемой сетки с сдвигом относительно центра ядра в пикселях. Б – значения фрактальной размерности в зависимости от положения сетки и поворота изображения

Форма графиков распределений, их симметричность, близость значений медианы и внутригруппового среднего указывают на нормальное распределение. Тест Андерсона-Дарлинга для распределения 284 значений фрактальной размерности Минковского (рисунок 3, черный график) показал, что распределение соответствует нормальному, а значит может быть описано с помощью среднего значения. Далее для выбранного изображения было вычислено среднее значение фрактальной размерности Минковского по 7 значениям фрактальной размерности, для которых сетка была расположена относительно центра ядра, и шаг поворота изображения составлял 15 градусов (рисунок 3, (°) кружок), это значение оказалось близким к среднегрупповому значению, а значит может быть использовано в качестве его характеристики. Аналогичные вычисления с другими изображениями показали сходные результаты, по этой причине было решено вычислять фрактальную размерность Минковского по этим принципам.

В работах [Rajković et al., 2017; Ristanović et al., 2014; Smith et al., 1996; Uppal et al., 2010] измерение фрактальной размерности Минковского представлено в качестве удобного и практичного инструмента для численной оценки организации клеточного фибриллярного актина. Диссертационное исследование представляет модернизированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского изображения фибриллярного актина, основанный на автоматическом подборе параметров для расчета, таких как размер ячеек сетки, их позиционирование и усредняющий алгоритм.

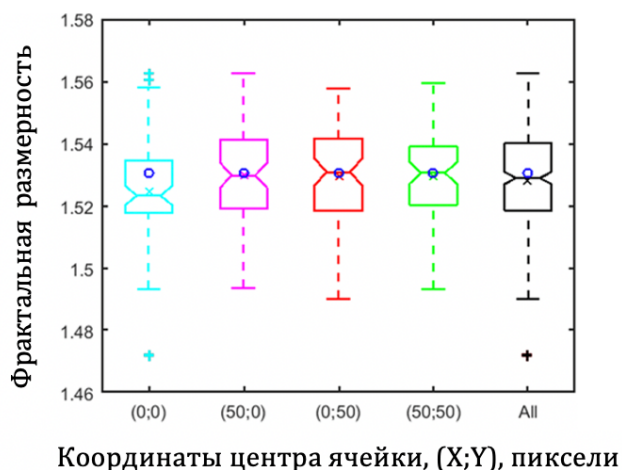


Рисунок 3 – Графики распределения значений фрактальной размерности Минковского для изображения клетки с окрашенным фибриллярным актином в зависимости от положения сетки и угла поворота изображения. Вырезы на боксплотах – доверительный интервал для медианы, крестом (+) обозначены выбросы, крестом (×) обозначено средние значения в соответствующей выборке, кружком (°) – среднее по 7 значениям согласно разрабатываемому подходу

Пошаговый процесс обработки изображения для вычисления фрактальной размерности Минковского по предложенному улучшенному методу представлен на примере флуоресцентного окрашивания дермального фибробласта человека (FRSN, рисунок 4) 1: А – исходное изображение фибробласта FRSN (разрешение 2048 x 2048 пикселей), фибриллярный актин окрашен родамином, конъюгированным с фаллоидином (красный канал), ядро окрашено Hoechst (синий канал). Б – красный канал (клеточное ядро) исходного изображения выделен, бинаризирован (переведен в двухцветный черно-белый формат), обнаружен наибольший регион связанных пикселей. В – построен эллипс, описывающий ядро, определены главная (большая), малая оси и центроид этого эллипса. Г – исходное изображение развернуто так, что главная ось описывающего эллипса стала расположена параллельно оси X. Д – определен наибольший размер ячейки сетки для расчета фрактальной размерности Минковского (этот размер вычисляется как ближайшая степень двойки, большая главной оси эллипса, описывающего ядро), центр рассчитанной ячейки сетки совпадает с центроидом эллипса. Е – красный канал повернутого изображения (содержит изображение фибриллярного актина) бинаризуется. Ж – бинаризованное изображение “скелетонируется” (функция *skeletonize*). З – идет подсчет ячеек, содержащих изображение, после чего размер ячейки уменьшается вдвое и производится новый подсчет. И – вычисляется фрактальная размерность Минковского скелета изображения с помощью построения зависимости логарифма размера ячеек сетки от логарифма количества ячеек, содержащих изображение; значение фрактальной размерности рассчитывается как тангенс угла наклона полученной линии и в данном примере составляет 1.41.

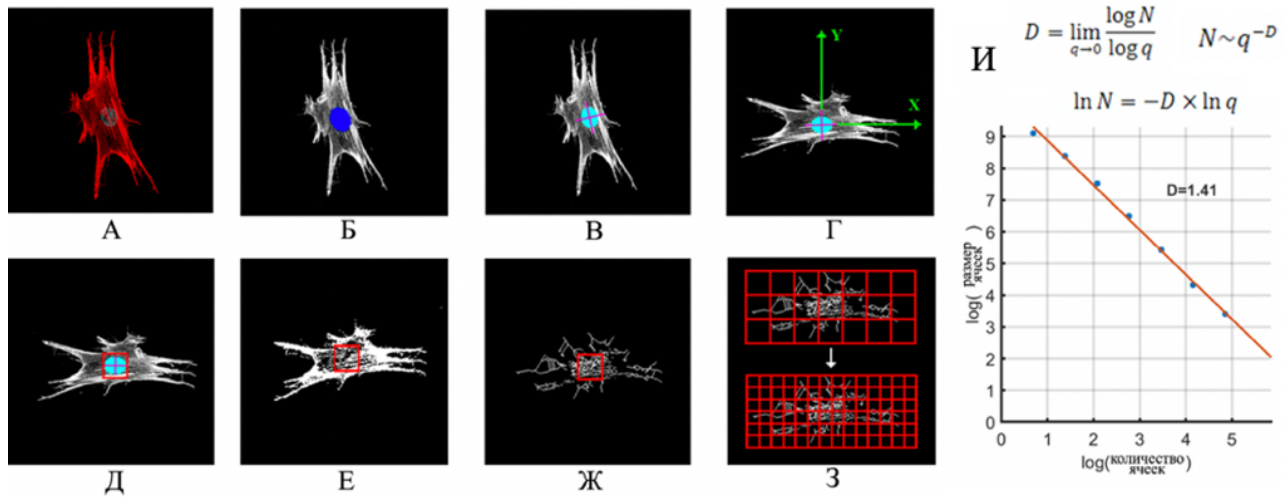


Рисунок 4 – Демонстрация пошагового процесса обработки флуоресцентного изображения фибробласта FRSN для вычисления фрактальной размерности Минковского по предложенному улучшенному методу (пояснения в тексте)

Было обнаружено, что значение фрактальной размерности Минковского для изображения фибриллярного актина клеток линии FRSN зависит от угла поворота изображения и положения сетки, используемой для вычисления. Таким образом, значение фрактальной размерности Минковского для одной и той же клетки может значительно отличаться, так как и сама клетка, и сетка для расчета могут быть расположены на микрофотографии случайным образом. Поэтому, единственное посчитанное значение фрактальной размерности Минковского случайно расположенной клетки не может характеризовать реальное (наиболее вероятное) значение для этого изображения фибриллярного актина клетки.

Для выявления значения фрактальной размерности Минковского необходимо выяснить, какие значения может принимать фрактальная размерность Минковского в зависимости от положения изображения и сетки, и какому виду распределения эти значения будут соответствовать. Для этого при расчетах значений фрактальной размерности Минковского репрезентативное изображение дермального фибробласта (с окрашенным ядром и фибриллярным актином) поворачивали с шагом 5° и затем сдвигали наложенную сетку. Таким образом, всего было рассчитано 284 значения фрактальной размерности, и, при этом, данная выборка соответствовала нормальному распределению согласно критерию Шапиро – Уилка. Поэтому для описания генеральной совокупности распределения значений фрактальной размерности Минковского можно использовать выборочное среднее и выборочное стандартное отклонение. В дальнейшем было решено оценивать значение фрактальной размерности Минковского для изображения клетки по 7 положениям, полученным с помощью поворота исходного изображения на 15° [Revittser et al., 2021]. Это усредненное значение в дальнейших расчетах берется для вычисления среднего значения для группы клеток, культивируемых в различных экспериментальных условиях. Зависимость величины фрактальной размерности Минковского фибриллярного актина от положения клетки на

микрофотографии ранее обсуждалась в статье [Ristanović et al., 2014] для нейронов. Авторы решили эту проблему таким же образом – с помощью поворота изображения и усреднения результирующего значения фрактальной размерности Минковского.

Также, для корректного вычисления фрактальной размерности Минковского важно выбрать такой диапазон размеров ячеек вычислительной сетки, чтобы зависимость размера ячеек от количества ячеек, содержащих изображение, построенный в логарифмических координатах, аппроксимировался линейной функцией. Размеры актиновых структур в клетке варьируются от мономера (глобулы) актина (около 4 нм) до масштабов клетки (до 150 мкм для некоторых видов клеток) [Dominguez and Holmes, 2011]. Часто наибольший размер ячейки определяется на усмотрение исследователя, например, для вычисления фрактальной размерности Минковского изображения фибриллярного актина сердечных фибробластов, полученного с помощью конфокального микроскопа и увеличения 40×, исследователи выбрали размер 207 пикселей [Fuseler et al., 2007], а в приложении FracLac для ImageJ (NIH, США) установлен рекомендуемый максимальный размер ячейки, составляющий 45% от изображения.

В подходе, предложенном в настоящем исследовании, процесс определения максимального размера ячейки автоматизирован – программа определяет его самостоятельно на основе размера изображения ядра клетки в пикселях как ближайшую степень 2, большую главной оси эллипса, описывающего изображение ядра. Размер ядра клетки выбран в качестве параметра для вычисления фрактальной размерности Минковского, исходя из природы культивируемых клеток: охарактеризованная клеточная линия мезенхимных стволовых клеток (до начала дифференцировки или клеточного старения) представляет собой популяцию клеток, обладающих сходной морфологией, в том числе и близкими размерами самих клеток и их ядер. Кроме этого, для МСК, находящихся в интерфазе, размер изображения ядра будет меньше, чем 45% площади изображения самой клетки. Минимальный размер сетки для расчета фрактальной размерности определялся как 2 пикселя на основании двух факторов. Первый из них – разрешающая способность конфокального микроскопа составляет примерно 200 нм (для 40× объектива 2 пикселя составляет около 311 нм). Второй из них – толщина изображения “скелета” фигуры (составляет 1 пиксель), используемая для расчета фрактальной размерности Минковского, не превышает размера 2 пикселя – минимального размера ячейки.

В представленных экспериментах использовались изображения, полученные на конфокальном микроскопе с объективом 40×. Для клеток линии FRSN в контроле размер максимальной ячейки для вычисления фрактальной размерности Минковского составил 128 пикселей (около 20 мкм). Далее при каждом шаге размер ячеек уменьшался вдвое, пока не достигал 2 пикселей. В итоге, для построения графика (в логарифмических координатах) зависимости размера ячеек от количества ячеек, необходимых для покрытия изображения, получали 7

экспериментальных значений. Коэффициент корреляции R^2 , полученной для этих точек, находился в интервале 0.999-0.991 для различных изображений дермальных фибробластов, что указывает на практически линейную зависимость переменных и подтверждает удачный выбор диапазона размера ячеек для расчета фрактальной размерности Минковского.

В данной работе разработанный модифицированный расчет фрактальной размерности Минковского применялся к изображениям фибриллярного актина клеток линии FRSN, обработанных ингибитором полимеризации актина латрункулином Б в течение 30 мин перед фиксацией (рисунок 5).

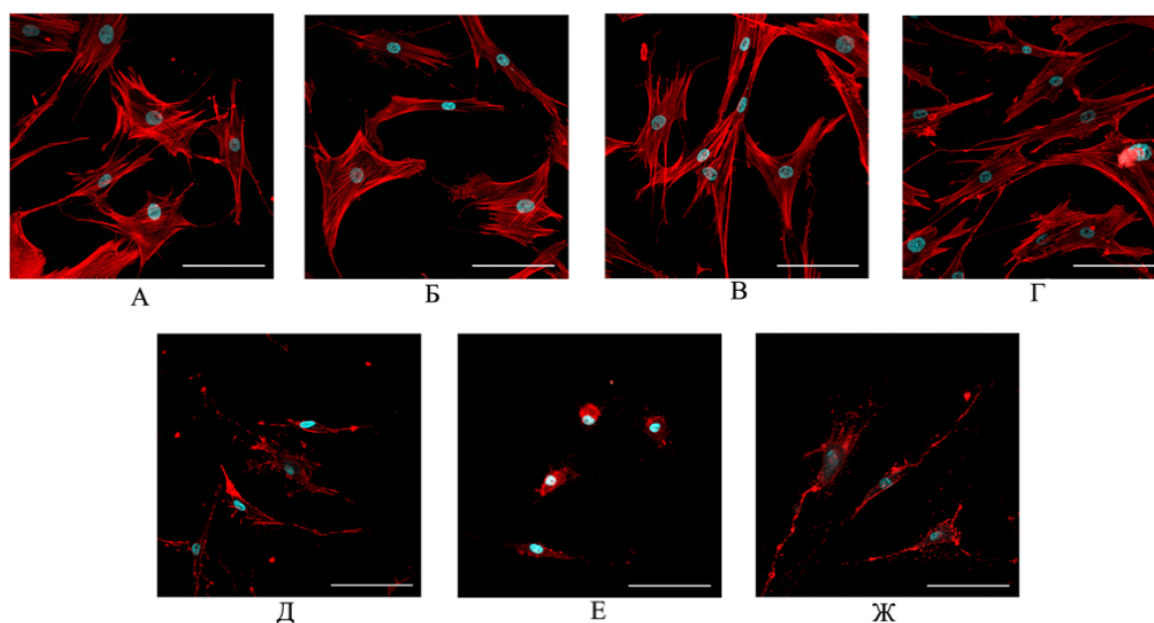


Рисунок 5 – Фибриллярный актин в дермальных фибробластах в контроле (а), при обработке диметилсульфоксидом в концентрации 10 мкМ в течение 30 мин (б), и при обработке латрункулином Б в течение 30 мин в концентрациях: 10 нМ (в), 50 нМ (г), 500 нМ (д), 1000 нМ (е) и 10 мкМ (ж). Ядра окрашены Ноеchst (голубой), фибриллярный актин окрашен родамин-фаллоидином (красный), визуализировано с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа. Размерная линейка 100 мкм

Расчет показал достоверные различия между значениями фрактальной размерности Минковского контрольной группы и экспериментальными группами, обработанными 500 нМ, 1000 нМ, 10 мкМ латрункулина Б, эти различия коррелировали с видимыми изменениями организации фибриллярного актина, из чего можно сделать вывод, что модифицированный расчет фрактальной размерности Минковского позволяет достоверно оценивать перестройки цитоскелета. В качестве следующего эксперимента для оценки фрактальной размерности Минковского были получены два типа микрофотографий одних и тех же клеток линии FRSN с помощью различных типов микроскопии, а именно конфокальной (а1-4) и имитации широкопольной (б1-4) флуоресцентной микроскопии (рисунок 6).

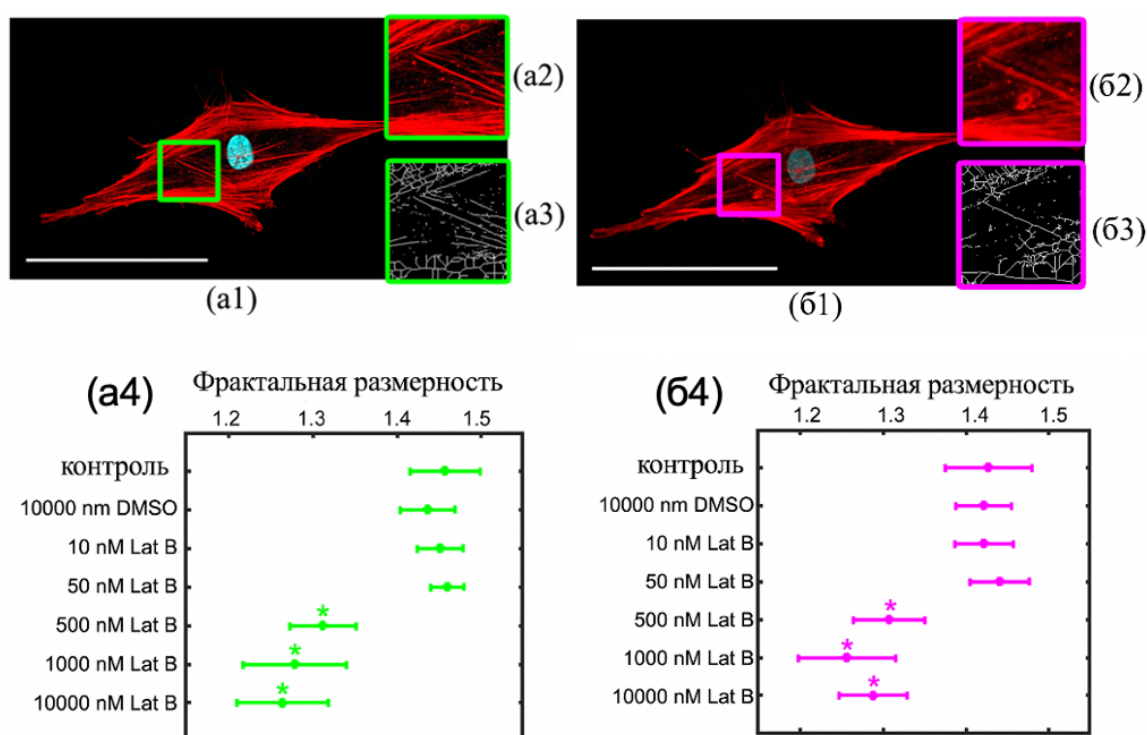


Рисунок 6 – Изображения и расчет фрактальной размерности Минковского для фибриллярного актина репрезентативного дермального фибробласта (из контрольной группы без обработки), окрашенного родамин-фаллоидином (красный). Ядра окрашены Ноехст (голубой). Фотографии выполнены с помощью (a1) конфокального микроскопа и (b1) имитации широкопольного флуоресцентного микроскопа (a2, b2 – увеличенные в два раза участки изображений a1 и b1, соответственно, a3, b3 – скелеты изображений a2 и b2. a4 и b4 – значения фрактальной размерности изображений в различных экспериментальных условиях). Размерная линейка 50 мкм.
* $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, обработанной диметилсульфоксидом, в каждой группе $n=15$ клеток

Значения для единичных клеток и среднегрупповые значения фрактальной размерности Минковского в различных экспериментальных группах показали схожие результаты для обоих типов изображений, коэффициент корреляции R^2 оказался высоким и, таким образом, показал тесную линейную связь между парами измерений. Метод Блэнда – Алтмана так же подтвердил согласованность этих оценок: систематическое расхождение (средняя величина разности) и степень разброса результатов (стандартные отклонения разности) невелики по значению, разности пар измерений лежат в пределах систематического расхождения $\pm$ двукратная степень разброса результатов (рисунок 7).

Подводя итоги, важно отметить, что подход программного определения размеров сетки ячеек для расчета фрактальной размерности Минковского позволяет значительно упростить и автоматизировать процесс расчетов. Также данный метод показал хороший результат расчета для небольших групп данных (по 15 изображений единичных клеток в каждой группе), и его можно применять к микрофотографиям, полученным с помощью как конфокальной, так и широкопольной

флуоресцентной микроскопии. Не каждая современная лаборатория обладает доступом к такому дорогостоящему оборудованию, как конфокальный микроскоп или высокопроизводительные сканирующие системы, позволяющие получать изображения высокого разрешения и/или большое количество изображений. Поэтому можно утверждать, что представленный модифицированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского может быть применим к оценке перестроек фибриллярного актина клетки по изображениям объектов интереса в целом ряде задач, и не требует использования дорогих оптических систем получения флуоресцентных изображений.

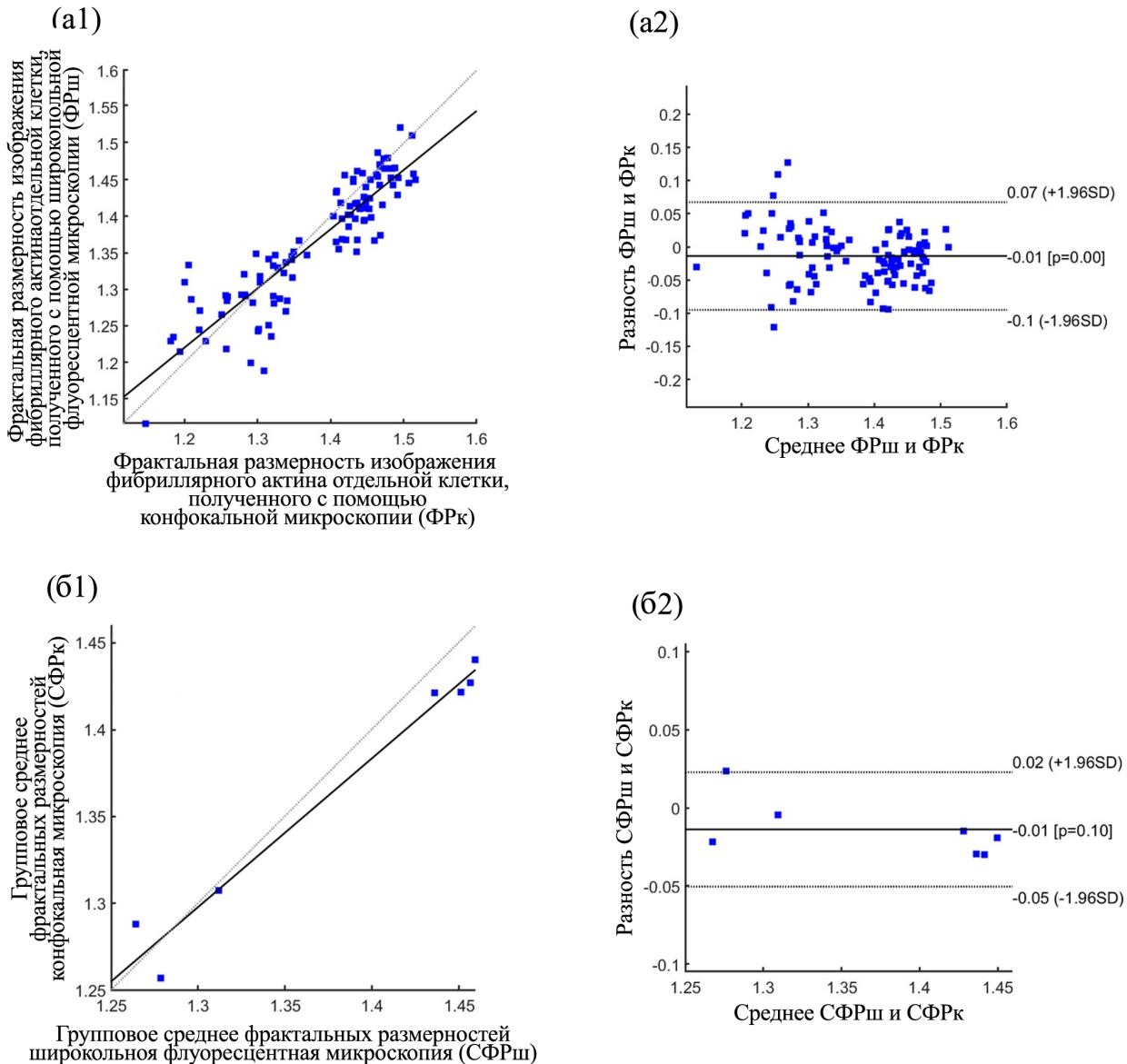


Рисунок 7 – График корреляции и график Блэнда – Алтмана для значений фрактальной размерности. Графики a1 и a2 построены с использованием значений фрактальной размерности Минковского для единичных клеток (n=105). ФРш и ФРк – фрактальные размерности для изображений, полученных с помощью широкопольной и конфокальной микроскопии, соответственно. Графики б1 и б2 построены для среднегрупповых значений фрактальной размерности Минковского (n=7), препараты были обработаны латрункулином Б, в каждой экспериментальной группе по n=15 клеток

2. Мезенхимные стволовые клетки как модель для *in vitro* исследований перестройки актинового цитоскелета

В современной науке мезенхимные стволовые клетки активно используются в качестве модельного объекта для разнообразных исследований *in vitro*, в том числе и для исследований актинового цитоскелета [Cai et al., 2016; Fuseler et al., 2007; Mishra et al., 2019; Qazi et al., 2017; Qian et al., 2012].

В представленной работе дермальные фибробласты человека (линия FRSN) служили в качестве экспериментальной модели различных степеней разборки фибриллярного актина после воздействия латрункулина Б для дальнейшей квантификации с помощью модифицированного метода измерения фрактальной размерности Минковского [Revittser et al., 2021].

В ходе дальнейшего исследования [Revittser et al., 2020; Ревитцер и Негуляев, 2018] МСК, выделенные из периренального жира крысы и МСК, выделенные из костного мозга 5-6 недельного эмбриона человека (линия FetMSC) выступали как экспериментальные модели для изучения воздействия ПНП на актиновый цитоскелет и клеточную подвижность.

3. Сравнительное исследование влияния предсердного натрийуретического пептида на организацию фибриллярного актина в МСК различного происхождения

Для изучения влияния ПНП на фибриллярный актин использовались МСК, выделенные из периренального жира крысы и МСК, выделенные из костного мозга 5-6 недельного эмбриона человека, описанные выше. С помощью ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентных окрасок в выбранных клеточных линиях были обнаружены рецепторы, способные связываться с ПНП, а именно циклические гуанилатциклазы NPRA и NPRB, а также рецептор клиренса NPRC. Из трех рецепторов наибольшим сродством к ПНП обладают NPRA и NPRC [Kouyoumdzian et al., 2018], поэтому за выявленные эффекты, скорее всего, отвечает сигнальный путь, связанный с активацией рецептора NPRA. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в МСК крысы и человека были обнаружены рецепторы всех трех типов [Abdelalim and Tooyama, 2009; Mallela et al., 2013b; Niehage et al., 2011].

Культивирование в присутствии ПНП не показало драматических изменений в морфологии МСК человека и крысы, однако, было принято решение о дальнейшем изучении влияния ПНП на фибриллярный актин МСК различного происхождения. Выявление фибриллярного актина в МСК проводилось с помощью окрашивания фиксированных клеток родамином, конъюгированным с фаллоидином, ядра были окрашены Hoechst, полученные (с помощью конфокального микроскопа) микрофотографии подвергались визуальной оценке. В процессе наблюдения было выявлено, что в МСК крысы, культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП, происходит частичная разборка фибриллярного актина, а клетки, культивируемые в присутствии 1000 нМ ПНП крысы, не отличаются от контроля (рисунок 8).

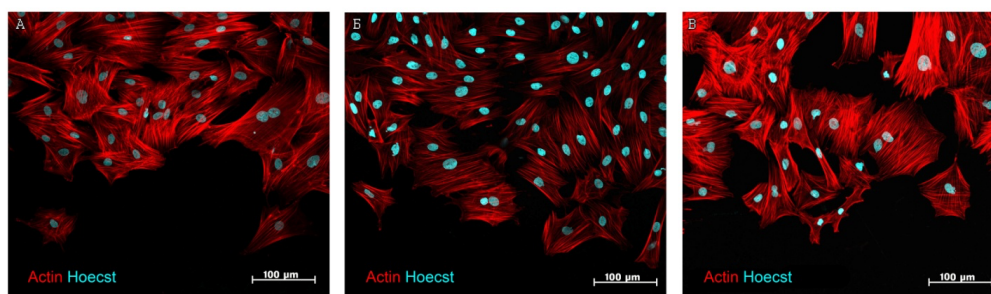


Рисунок 8 – Фибриллярный актин МСК крысы. А – контрольный образец; Б - образец, культивируемый в присутствии 10нМ ПНП в течение 24 ч перед экспериментом; В - образец, культивируемый в присутствии 1000нМ ПНП в течение 24ч перед экспериментом

В экспериментах по зарастанию раны наблюдалось ускорение зарастания экспериментальной раны, нанесенной на МСК крысы, культивируемые в присутствии 10 нМ ПНП крысы, относительно контрольных клеток и клеток, культивируемых в присутствии 1000 нМ ПНП крысы (рисунок 9).

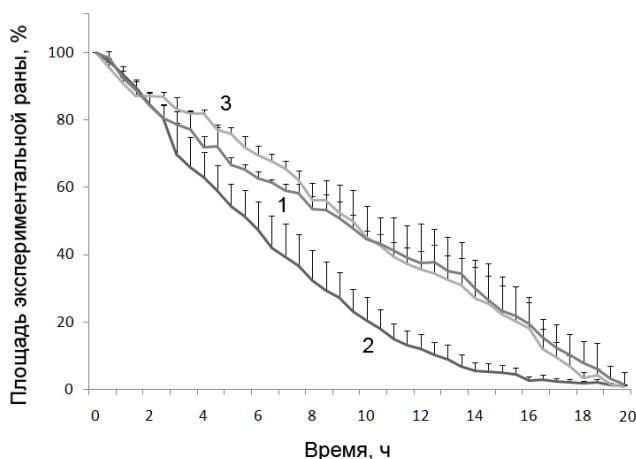


Рисунок 9 –Динамика зарастания экспериментальных ран, нанесенных на МСК крысы: контрольный образец (кривая 1); образец, инкубируемый с 10нМ ПНП в течение 24 ч перед экспериментом (кривая 2); образец, инкубируемый с 1000нМ ПНП в течение 24ч перед экспериментом (кривая 3)

Наблюдаемая разборка достоверно подтверждена и с помощью численных методов – измерения относительной интенсивности флуоресценции и фрактальной размерности Минковского (рисунок 10). Было обнаружено, что фрактальная размерность актинового цитоскелета отличается у клеток, инкубируемых с 10нМ ($1,52 \pm 0,01$) от контроля ($1,57 \pm 0,02$) и клеток, инкубируемых с 1000нМ ($1,59 \pm 0,01$). Относительная интенсивность флуоресценции показала, что клетки, инкубируемые с 1000нМ, обладают достоверно значимыми отличиями с контролем и клетками, инкубируемыми с 10нМ, - значение параметра составило $54,7 \pm 6,1\%$ по сравнению с $100 \pm 8,8\%$ и $109,7 \pm 18,4\%$ соответственно. Фрактальная размерность и интенсивность флуоресценции показали несколько разные результаты, что может быть объяснено различным подходом в вычислении этих параметров.

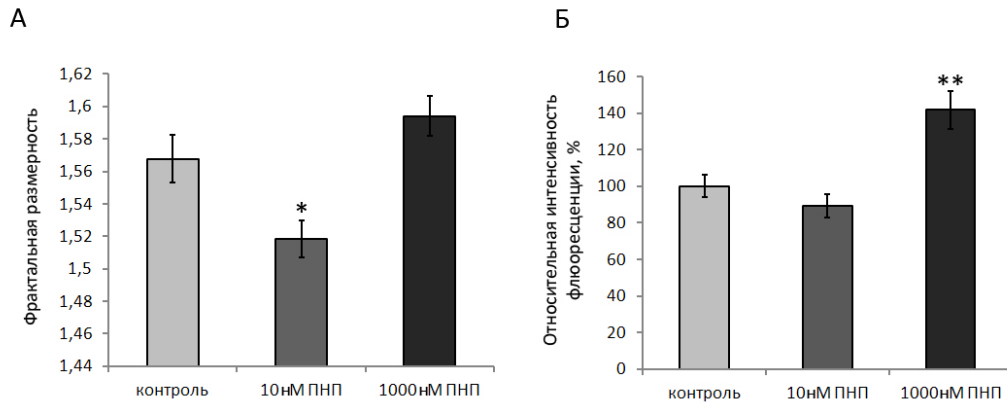


Рисунок 10 – Изменения параметров актинового цитоскелета МСК крысы при воздействии 10нМ и 1000нМ ПНП в течение 24ч перед измерением. А – фрактальная размерность; Б – относительная интенсивность флюоресценции, нормализовано относительно контроля. ** $p < 0.05$; * $p < 0.005$

В литературе влияние ПНП на МСК *in vitro* было ранее изучено: эндотелиальные клетки аорты и полый вены увеличивали скорость миграции при добавлении к ним 10 нМ ПНП [Kook et al., 2003].

Несмотря на это, в МСК человека, культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП человека в течение 24 ч перед экспериментом, происходит сборка фибриллярного актина, в то время как МСК человека, культивируемые в присутствии 1000 нМ ПНП человека, визуально не отличаются от контроля (рисунок 11).

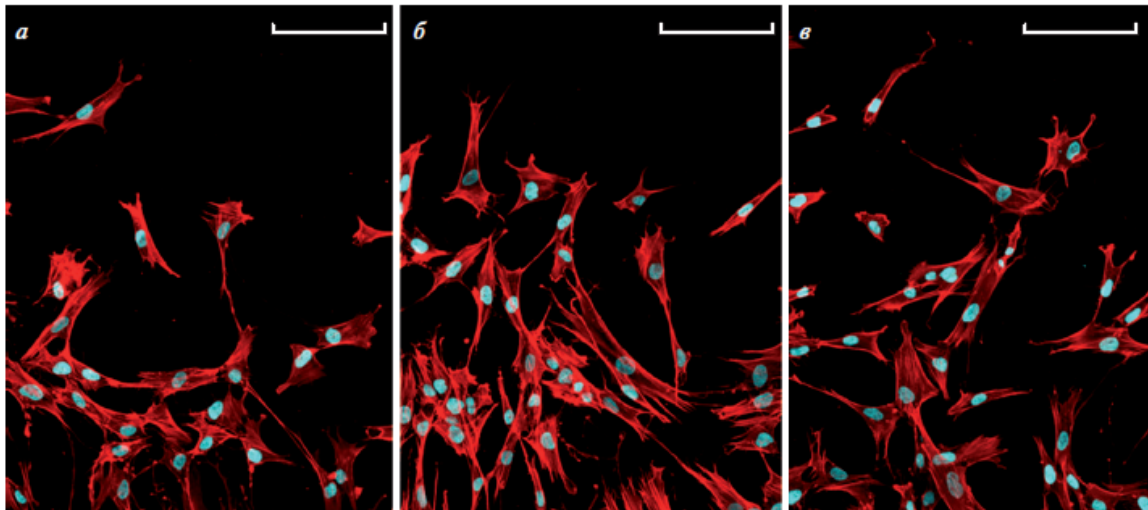


Рисунок 11 – Фибриллярный актин FetMSC, окрашенный родамином, конъюгированным с фаллоидином, ядра окрашено Ноест, размерная линейка 100 мкм. А – контрольный образец. Б – образец, культивируемый в присутствии 10 нМ ПНП. В – образец, культивируемый в присутствии 1000 нМ ПНП

В экспериментах по застанию раны наблюдалось замедление застания экспериментальной раны, нанесенной на МСК человека, культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП человека, относительно контрольных клеток и клеток, культивируемых в присутствии 1000 нМ ПНП человека, что так же согласуется со сборкой фибриллярного актина (рисунок 12).

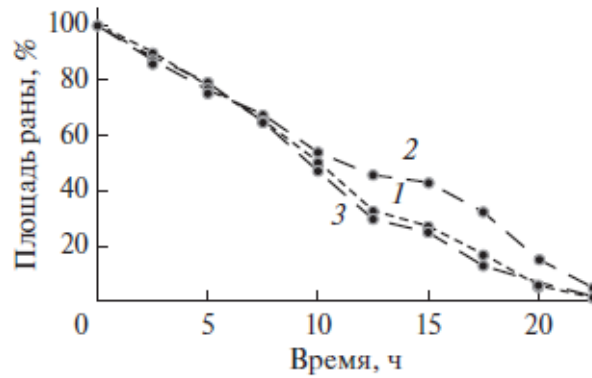


Рисунок 12 – Графики застывания ран, нанесенных на монослой клеток FetMSC без обработки (1), культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП в течение 24 ч перед экспериментом (2), культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП (или 1000 нМ) в течение 24 ч перед экспериментом (3)

Наблюдаемая сборка достоверно подтверждалась с помощью измерения относительной интенсивности флуоресценции и фрактальной размерности Минковского (рисунок 13). Среднегрупповые значения и стандартные отклонения фрактальной размерности Минковского (относительной интенсивности флуоресценции) составили 1.47 ± 0.04 ($100 \pm 13\%$) для контрольной группы клеток, для клеток, культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП 1.56 ± 0.04 ($132 \pm 16\%$), клеток, культивируемых в присутствии 1000 нМ ПНП 1.44 ± 0.06 ($96 \pm 11\%$). Достоверные отличия ($p < 0.05$) были обнаружены между контрольной группой и группой клеток, культивируемых в присутствии 10 нМ ПНП.

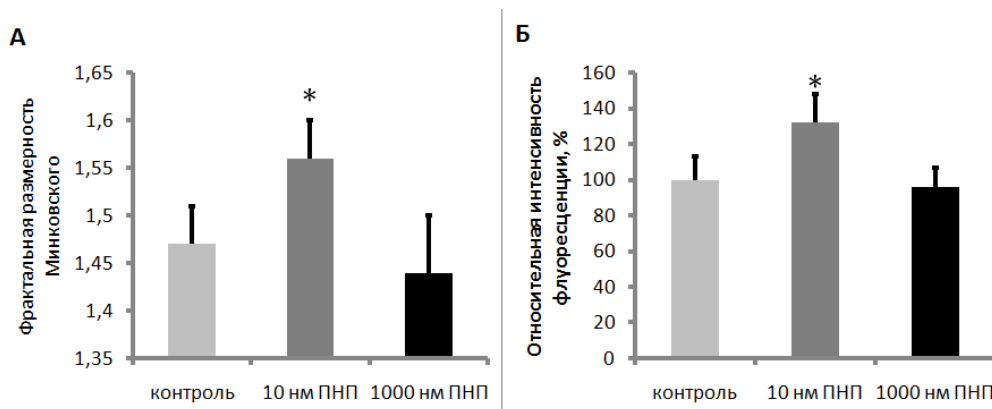


Рисунок 13 – Изменения параметров актинового цитоскелета FetMSC при воздействии 10нМ и 1000нМ ПНП в течение 24ч перед измерением. А – фрактальная размерность; Б – относительная интенсивность флуоресценции, нормализовано относительно контроля. * $p < 0.05$

МСК человека в этом контексте ранее изучены не были, однако в эндотелиальных клетках сосудов человека было выявлено схожее влияние ПНП на фибриллярный актин, а именно присутствие 10 нМ ПНП в питательной среде являлось причиной полимеризации актина в эндотелиоцитах [Chen et al., 2004]. Такие же результаты наблюдались и в другой работе [Kook et al., 2003]: добавление ПНП к клеткам в малых концентрациях (10 нМ) вызывало полимеризацию актина.

Интересным вопросом становится то, что ПНП оказывал влияние на клетки исключительно в малых концентрациях (10 нМ), но не в больших (1000 нМ). Встречаются и другие вещества с подобным типом влияния, называемым bell-shape или u-shape [Reynolds, 2010], например, на ангиогенез и миграцию клеток сосудов человека. В малых концентрациях бортезомиб [Veschini et al., 2007] и трансформирующий фактор роста бета один [Pepper et al., 1993] способны усиливать ангиогенез, в то время как эндостатин [Celik et al., 2005] ингибирует ангиогенез только в малых концентрациях.

Различное влияние ПНП на миграцию у МСК крысы и человека так же можно объяснить. На сегодняшний день влияние пептида на МСК различного происхождения практически не изучено, но скорее всего, различие связано как с источником МСК (костный мозг и периренальный жир), так и с видовой принадлежностью клеток (крыса и человек). Например, МСК костного мозга человека и МСК зубной пульпы человека по-разному отвечают на лекарства против вируса иммунодефицита человека [Gibellini et al., 2015], так же и у МСК костного мозга и МСК жировой ткани обнаружены различия в экспрессии генов и в регенеративном потенциале [Zhou et al., 2019]. В литературе есть данные о сравнении МСК костного мозга человека и МСК костного мозга крысы [Scuteri et al., 2014]: выявлено, что эти клетки обладают отличающимся дифференцировочным потенциалом *in vitro*, то есть по-разному отвечают на одни и те же вещества, способствующие дифференцировке.

Для оценки перестроек фибриллярного актина, возникающих в ходе воздействия ПНП, были применены подходы численной оценки: фрактальная размерность Минковского и относительная интенсивность флуоресценции. Для МСК крысы результаты оценки с помощью фрактальной размерности Минковского несколько отличались от результатов измерения относительной интенсивности флуоресценции (с помощью измерения фрактальной размерности Минковского детектировалась разборка фибриллярного актина, а с помощью относительной интенсивности флуоресценции – нет). Для МСК человека результаты оценки с помощью фрактальной размерности Минковского совпали и с результатами относительной интенсивности флуоресценции (детектировалась сборка). Сходные результаты применения численных методов для реорганизации актина показаны в работе [Fuseler and Valarmathi, 2016], в ней изучалось влияние монооксида азота на миграцию и фибриллярный актин МСК человека. Фрактальная размерность Минковского позволила детектировать разборку фибриллярного актина.

Таким образом, действие ПНП различается в зависимости от концентрации вещества и типа МСК, при этом ПНП выступает как вещество, способное влиять на цитоскелет и миграцию МСК, что оставляет возможность для потенциального применения ПНП в регенеративной медицине. Подводя итоги, фрактальная размерность Минковского показала себя как объективный метод для выявления перестроек фибриллярного актина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ состояния сложных клеточных структур является важной экспериментальной задачей для биологии и биофизики. При изучении морфологии клетки необходимы не только визуальные наблюдения исследователя, но и объективные подходы количественной оценки организации и перестроек ее частей. Одним из методов, позволяющих численно представить сложность различных структур клетки, является вычисление фрактальной размерности Минковского. Однако этот метод не приобрел широкой распространенности, так как большинство приложений, рассчитывающих размерность, требуют обширных знаний в математике для корректного подбора вычислительных параметров. Чтобы решить эту проблему, в ходе диссертационного исследования была разработана программа для вычисления фрактальной размерности Минковского на примере флуоресцентных изображений окрашенного фибриллярного актина мезенхимных стволовых клеток с программным подбором параметров расчета, которые учитывают положение и размер окрашенного ядра клетки. Она самостоятельно определяет максимальный размер ячейки для box-counting алгоритма, выделяет канал, содержащий интересующее изображение, производит его бинаризацию, скелетонизацию и дальнейший расчет фрактальной размерности Минковского. Разработанная программа была успешно применена к вычислению фрактальной размерности Минковского для дермальных фибробластов человека, обработанных ингибитором полимеризации актина латрункулином Б, мезенхимных стволовых клеток крысы, обработанных ПНП, и мезенхимных стволовых клеток человека, выделенных из костного мозга 5-6 недельного эмбриона человека, обработанных ПНП. Программный анализ выявил уменьшение значения фрактальной размерности Минковского для изображений фибриллярного актина дермальных фибробластов человека после обработки латрункулином Б, полученные значения согласовывались с визуальной оценкой изображений. Также программный анализ выявил изменения значений фрактальной размерности Минковского для МСК, обработанных ПНП: уменьшение для обработанных 10 нМ ПНП МСК крысы, увеличение для обработанных 1000 нМ ПНП МСК крысы, увеличение для обработанных 10 нМ ПНП МСК человека, таким образом ПНП способен влиять на организацию актиновых фибрилл в МСК. Учитывая эти результаты, можно сделать вывод, что разработанный программный продукт может быть успешно применен для анализа морфологии структур в клетке.

ВЫВОДЫ

1. Разработан и апробирован модифицированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского для анализа актиновых структур цитоскелета МСК, основанный на учете размера и положения клеточного ядра.
2. Применение модифицированного метода позволяет достоверно количественно оценить степень деполимеризации на примере МСК человека (дермальные фибробласты линии FRSN) при обработке ингибитором полимеризации актина латрункулином Б.

3. Модифицированный метод вычисления фрактальной размерности Минковского позволил выявить концентрационно-зависимое влияние предсердного натрийуретического пептида на организацию актинового цитоскелета в МСК человека и крысы, экспрессирующих рецепторы к ПНП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Revittser A.**, Selin I., Negulyaev Y., & Chubinskiy-Nadezhdin V. The analysis of F-actin structure of mesenchymal stem cells by quantification of fractal dimension. PloS one, 2021, Vol. 16, No. 11, pp. e0260727 (Web of Science, Scopus, eLIBRARY)
2. **Revttser A. V.**, Chubinsky-Nadezhdin V. I., and Negulyaev Yu. A. The Effect of Atrial Natriuretic Peptide on Reorganization of Actin Cytoskeleton and Migration of Human Mesenchymal Stem Cells, Cell and Tissue Biology, 2020, Vol. 14, No. 2, pp. 154–159 (Web of Science, Scopus, eLIBRARY)
3. **Revittser A. V.**, Neguliaev Yu. A. Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Fetal Bone Marrow Using Rosiglitazone, Cell and Tissue Biology, 2018, Vol. 12, No. 5, pp. 367–372 (Web of Science, Scopus, eLIBRARY)
4. **Ревитцер А.В.**, Негуляев Ю.А. Влияние предсердного натрийуретического пептида на миграцию мезенхимных стволовых клеток, выделенных из периренального жира крысы. Цитология. 2018. 12(60): 983 – 986 (Web of Science, Scopus, eLIBRARY)

Тезисы:

1. **Ревитцер А.В.**, Селин И.А., Негуляев Ю.А. Оценка изображений фибриллярного актина дермальных фибробластов с помощью фрактальной размерности Минковского, используя конфокальную и широкопольную флуоресцентную микроскопию. Научная конференция для молодых ученых 25-26 ноября 2021 Тезисы докладов. СПб: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2020. С. 24 – 25
2. **Ревитцер А.В.** Разработка метода оценки изменений фибриллярного актина в клетке с применением фрактальной размерности Минковского. Сборник материалов Всероссийской конференции «Неделя науки ИФНиТ» 16-20 ноября 2020 года. СПб: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2020. С. 286 – 287
3. **Ревитцер А.В.** Исследование перестроек фибриллярного актина в мезенхимных стволовых клетках с помощью фрактальной размерности Минковского. Материалы VII МОЛОДЁЖНОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН 12–15 октября 2020 г. Гены и Клетки. 2030. 3(XV): 28 (eLIBRARY)
4. **Ревитцер А. В.**, Чубинский-Надеждин В. И., Негуляев Ю. А. Реорганизация фибриллярного актина в мезенхимных стволовых клетках после культивирования в присутствии предсердного натрийуретического пептида. Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий». Гены и Клетки. 2019. 3(XIV): 46 (eLIBRARY)
5. **Ревитцер А.В.**, Негуляев Ю.А. IN VITRO исследование миграции мезенхимных клеток, выделенных из периренального жира крысы. Сборник тезисов VI Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. СПб. 2018. С. 89 – 90
6. **Ревитцер А.В.**, Негуляев Ю.А. Характеристика актинового цитоскелета стволовых клеток крысы, выделенных из периренального жира, с помощью фрактальной размерности. Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19 – 24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. СПб: ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2018. С. 173 – 175