

УДК 57.081.23

РАЗРАБОТКА И ПРОГРАММНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ АЛГОРИТМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СРЕДНЕЙ ДЛИНЫ САРКОМЕРА КАРДИОМИОЦИТА

© 2019 г. Т.А. Мячина* **, К.А. Бутова* **, О.Н. Лукин* **

*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

**Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

E-mail: tyachina.93@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

После доработки 01.07.2019 г.

Принята к публикации 12.07.2019 г.

Представлен разработанный авторами настраиваемый алгоритм для определения средней длины саркомера в изолированных кардиомиоцитах, активно сокращающихся в ненагруженных или нагруженных условиях. Алгоритм основан на применении дискретного преобразования Фурье и включает в себя дополнительную обработку исходного сигнала саркомерной исчерченности кардиомиоцита и полученного в результате дискретного преобразования Фурье амплитудно-частотного спектра для более точного определения длины саркомера. Продемонстрирована эффективность алгоритма для анализа данных саркомерной исчерченности изолированных клеток сердца.

Ключевые слова: кардиомиоцит, саркомер, сократительный ответ, дискретное преобразование Фурье.

DOI: 10.1134/S0006302919050119

Изолированные сократительные клетки сердечной мышцы (кардиомиоциты) являются удобным экспериментальным объектом для изучения механических характеристик сокращения, так как позволяют избежать влияния соединительной ткани и эндотелия, значительно изменяющих вязкоэластичные свойства миокарда [1–4]. Кардиомиоциты могут быть задействованы в различных исследованиях, в том числе при изучении региональной и трансмуральной функциональной неоднородности различных участков миокарда [4–6]. При этом сократительный ответ самого кардиомиоцита, т.е. амплитуда его укорочения, может отличаться от сократительного поведения составляющих его саркомеров, как по причине внутренней неоднородности свойств саркомеров и наличия внутреннего укорочения [7], так и в силу ограничений, связанных с недостаточной фиксацией измерительно-задающих устройств к кардиомиоциту [4]. Поэтому динамическое изменение длины саркомера, по сравнению с длиной клетки или мышцы, является наиболее информативным и точным для оценки механических характеристик сократительной активности миокарда в условиях *in vitro* [1,4,7–9].

Однако существует проблема адекватной регистрации динамического сигнала саркомерной ис-

черченности, связанная с ограничениями измерительной аппаратуры и невозможностью полной пространственной фиксации измеряемого профиля этой исчерченности из-за подвижности активно сокращающегося кардиомиоцита [1,9]. При этом если в условиях эксперимента с заданием (не)контролируемой нагрузки на изолированный миоцит (например, при использовании метода карбоновых волокон [3,4]) неточность определения саркомерной исчерченности снижается за счет механической фиксации самой клетки, то в условиях ненагруженных сокращений могут возникать заметные смещения кардиомиоцита из поля зрения. Кроме того, для оценки сократительного ответа клетки и всех составляющих ее саркомеров необходима обширная автономная обработка массива данных с учетом наличия неоднородности среди отдельных саркомеров [2,4,10], что препятствует быстрой регистрации сокращений и снижает точность определения их амплитудных и временных характеристик.

Большинство методов определения длины саркомеров кардиомиоцита основано на использовании быстрого или дискретного преобразования Фурье [1,8–11]. Применимость этих алгоритмов зависит от размера области изображения клетки, выбранной для анализа [10]. На сегодняшний день может быть использовано изображение целого кардиомиоцита для регистрации

Сокращения: ДПФ – дискретное преобразование Фурье.

саркомерной динамики с активно сокращающейся клетки [1,8,10,11], но в большинстве случаев сохраняется необходимость выбора ограниченной области саркомерной исчерченности с целью ускорения регистрации данных [9,12]. При этом существующие программные реализации лишены возможности расширенной пользовательской настройки алгоритма определения средней длины саркомера, а также не предусматривают использования безотносительно к режиму нагружения кардиомиоцита, т.е. как для ненагруженного, так и нагруженного сокращений.

Для корректной оценки саркомерной динамики в кардиомиоците, активно сокращающемся в ненагруженном или нагруженном режиме, нами был разработан настраиваемый алгоритм для определения средней длины саркомера в ограниченном регионе кардиомиоцита. Алгоритм основан на методе дискретного преобразования Фурье и реализован в рамках разработанного нами программного обеспечения EcarAll6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы здоровые крысы линии Вистар (самки и самцы возрастом два-три месяца).

Получение изолированных кардиомиоцитов. Одиночные кардиомиоциты были получены с использованием стандартной методики ретроградной перфузии (по Лангендорфу) целого сердца крысы модифицированным раствором Кребса–Хенселейта, содержащим коллагенлитический фермент для разрушения соединительной ткани [13]. Измерения сократительной активности кардиомиоцитов были выполнены в растворе Тироде следующего состава (в мМ): NaCl – 140, KCl – 5,4, MgSO₄ – 1, HEPES – 10, глюкоза – 11,1, CaCl₂ – 1,25.

Метод карбоновых волокон. Реализация сокращений кардиомиоцитов в ауксотоническом (нагруженном) режиме при последовательном увеличении степени диастолического растяжения клетки осуществлялась при помощи метода карбоновых волокон [3,4,14–16]. Были использованы карбоновые волокна толщиной 7 мкм (Tsukuba Materials Information Laboratory Ltd., Япония), вклеенные в специальные стеклянные держатели. Держатели с карбоновыми волокнами монтировали на независимых прецизионных микроманипуляторах с использованием системы управления микропозиционирующими устройствами MP285 (Sutter Instrument, США). Для задания растяжения клетки и регистрации ее укорочения использовали два карбоновых волокна, которые механически фиксировали к концам кардиомиоцита за счет адгезии и сил электростатического взаимодействия.

Регистрация данных. Измерение механической функции изолированных кардиомиоцитов выполняли при помощи системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения для регистрации сигнала изображения клетки в проходящем свете ZEN 2010 (Carl Zeiss, Германия). Непосредственно перед измерением в зоне наилучшей саркомерной исчерченности клетки выбирали узкую область сканирования высотой в два-три пикселя и длиной, соответствующей длине всего кардиомиоцита, включая карбоновые волокна, в случае нагруженного сокращения (рис. 1а и 1б). Это позволяло осуществлять сканирование изображения клетки в выбранной области со скоростью 300–500 кадров в секунду (~2–3 мс на кадр) и регистрировать изменение длины саркомеров клетки с высокой временной дискретизацией. Результат сканирования такого изображения представлял собой профиль изменения интенсивности сигнала, который имел периодический характер, связанный с саркомерной исчерченностью клетки (рис. 1в и 1г). Изображения регистрировали с интервалом 2–3 мс, их последовательность позволяла анализировать динамику саркомерной длины в активно сокращающемся кардиомиоците.

Программное обеспечение. Интерфейс и модули программного обеспечения EcarAll6 были разработаны в среде объектно-ориентированного программирования IDE Borland Delphi 6 (Borland International Inc., США) с использованием языка программирования Object Pascal.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходный сигнал. В качестве исходного (входного) сигнала для алгоритма выступает последовательность изображений области сканирования кардиомиоцита, алгоритм анализирует отдельно каждое такое изображение, по профилю саркомерной исчерченности которого определяется средняя длина саркомера. В случае использования карбоновых волокон получаемый профиль интенсивности включает два провала яркости, соответствующих положению волокон. Профиль интенсивности сигнала представляет собой функцию пространственного смещения от левой границы изображения, поэтому основная частота сигнала определяется как расстояние между пиками периодической составляющей, для которой рассчитывается среднее значение длины саркомера.

Начальные пользовательские настройки алгоритма. На начальном этапе алгоритм определения среднего значения длины саркомера позволяет пользователю вручную задать величину отступа от края миоцита (при регистрации ненагруженного сокращения) или внутренних краев карбо-

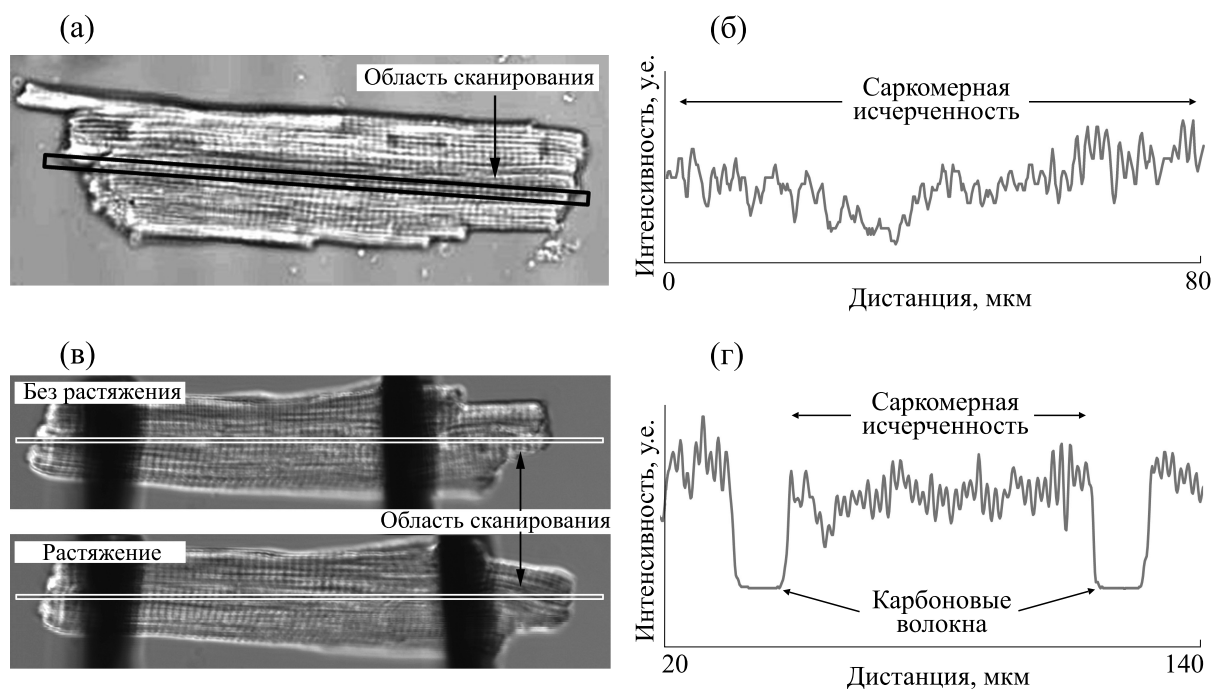


Рис. 1. Регистрация профиля саркомерной истерченности в изолированном кардиомиоците: (а) — изображение кардиомиоцита в ненагруженном режиме сокращения; (б) — пример профиля интенсивности изображения кардиомиоцита при сокращении в ненагруженном режиме; (в) — изображение кардиомиоцита в нерастянутом и растянутом состоянии при использовании карбоновых волокон; (г) — пример профиля интенсивности изображения кардиомиоцита при сокращении в нагруженном режиме с использованием карбоновых волокон, области с минимальной интенсивностью соответствуют положениям волокон. На панелях (а) и (в) показана область, для которой строится профиль интенсивности изображения кардиомиоцита. Данные на панелях (в) и (г) адаптированы и модифицированы из работы [13].

новых волокон (при регистрации ауксотонического сокращения при разной степени растяжения клетки) и не включать в анализ часть сигнала, близко расположенного к указанным краям. Это позволяет уменьшить неточность определения длины саркомера, если в исходную область сканирования включены участки изображения за пределами клетки. В случае использования карбоновых волокон, из анализа исключаются участки изображения за пределами карбоновых волокон (данные участки не подвергаются растяжению при увеличении длины клетки), а также участки, близко расположенные к внутренним краям карбоновых волокон (данные участки могут иметь искажения саркомерной истерченности из-за искривления поверхности клетки вблизи карбоновых волокон).

Также вручную задаются минимальное и максимальное допустимое значение длины саркомера (например, 1,3 и 2,5 мкм, что соответствует физиологическому диапазону длин саркомеров). Это позволяет исключить из анализа гармоники слишком высокой или низкой пространственной «частоты», которые могут перекрывать по интенсивности основную гармонику.

Наконец, до начала работы алгоритма пользователем вручную задаются следующие параметры: близость к пику спектрального распределения (*Proximity*) и максимальное число гармоник. Параметр *Proximity* задает, в пределах какой величины можно отклоняться от пика спектра «пространственных» частот для определения диапазона длин саркомеров, в котором будет вычисляться среднее значение длины саркомера (рис. 2а). Например, при *Proximity* = 90% для спектра пространственных частот будет определяться окно интенсивностей от 90% до 100% пика интенсивности, далее будут находиться соответствующие этому окну самое меньшее и самое большее значения длины саркомера, затем для этого диапазона длин будет определяться средняя длина саркомера. Причина использования такого параметра состоит в том, что спектр частот может иметь не один острый пик, а форму с двумя близко расположенными пиками, каждый из которых достаточно достоверно описывает среднюю длину саркомера. Такая ситуация возможна, если в исходном сигнале истерченности имеются две «популяции» саркомеров с различными длинами (например, из-за внутренней неоднородности распределения длин саркомеров в кардиомиоци-

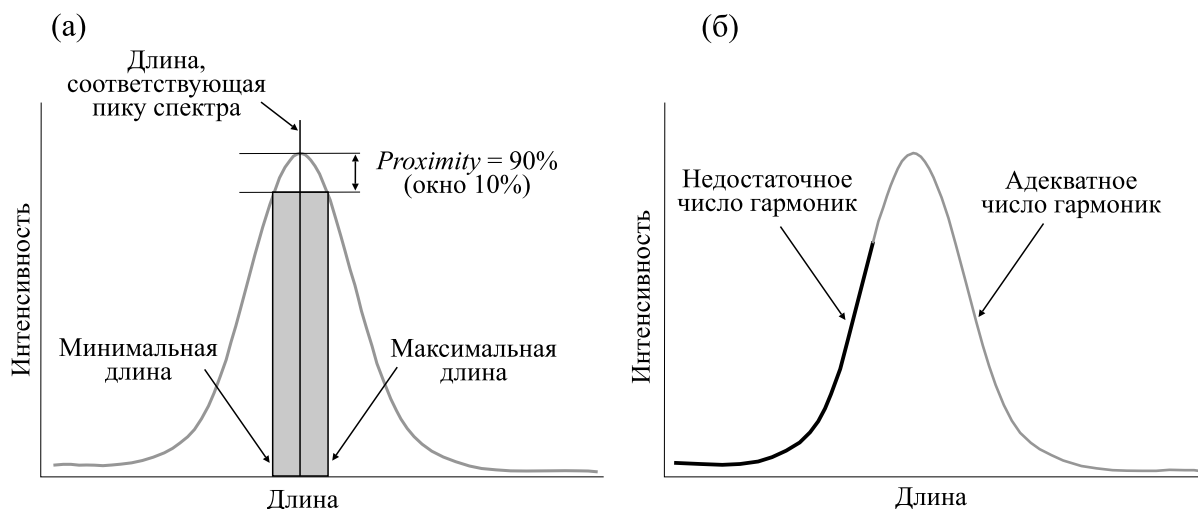


Рис. 2. Пояснение к начальным настройкам алгоритма определения средней длины саркомера: (а) — параметр *Proximity* задает окно относительно пика спектра пространственных частот для определения средней длины саркомеров (затененная область в примере на рисунке); (б) — максимальное число гармоник определяет корректность определения основной гармоники, при недостаточном числе гармоник спектр частот не содержит основную гармонику.

те). В этом случае целесообразно определять не длину саркомера, соответствующую пику спектра гармоник, а некоторый диапазон длин для нескольких квазипиковых значений. Чем ниже значение параметра *Proximity*, тем менее точно вычисляется средняя длина саркомера. Максимальное число гармоник, которые алгоритм будет определять в периодическом сигнале, прямо влияет на возможность определения правильной основной гармоники, поскольку уменьшение этого числа приводит к сужению исследуемого спектра частот (рис. 2б). При задании слишком маленького числа гармоник спектр будет ограничен диапазоном длин, не включающим основную гармонику, т.е. спектральный сигнал будет неинформативен и средняя длина саркомера будет определена некорректно.

Как было указано выше, длина саркомеров в исходном сигнале может быть распределена неравномерно. В связи с этим средняя длина саркомера (SL_{MEAN}) в заданном диапазоне длин по желанию пользователя может определяться без учета или с учетом относительной амплитуды интенсивности (веса) каждой пространственной частоты; в последнем случае средняя длина саркомера вычисляется по формуле:

$$SL_{\text{MEAN}} = \frac{\sum_{i=1}^N SL_i * I_i}{\sum_{i=1}^N SL_i},$$

где N — число рассчитываемых гармоник, SL — «пространственная» частота гармоники (соответ-

ствует определенной длине саркомера), I — интенсивность гармоники.

Исключение низкочастотной компоненты. Непосредственно до применения к исходному сигналу саркомерной исчерченности метода дискретного преобразования Фурье (ДПФ) пользователь может задать исключение низкочастотных колебаний этого сигнала, которые могут возникнуть из-за неравномерной яркости изображения клетки или наличия посторонних структур в области регистрации изображения (например, ядра или митохондрии). Для исключения низкочастотной составляющей применяется глубокая фильтрация исходного сигнала с управляемыми настройками фильтра, затем исходный сигнал корректируется с учетом базового уровня отфильтрованного сигнала (рис. 3а).

Метод дискретного преобразования Фурье. Далее в алгоритме реализуется ДПФ для определения спектральной характеристики сигнала профиля интенсивности, т.е. строится распределение интенсивности гармоники периодического сигнала исчерченности от ее частоты. В данном случае сигнал имеет не временное, а пространственное изменение (изменение яркости изображения по горизонтали), в связи с этим периоды составляющих его гармоник определяются в единицах длины. Откорректированный с учетом вышеописанных настроек сигнал исчерченности является входным массивом для ДПФ, где определяется частотный спектр, состоящий из массивов реальных и мнимых чисел. При необходимости, к этим массивам может быть применена раздельная фильтрация, после чего результирующие

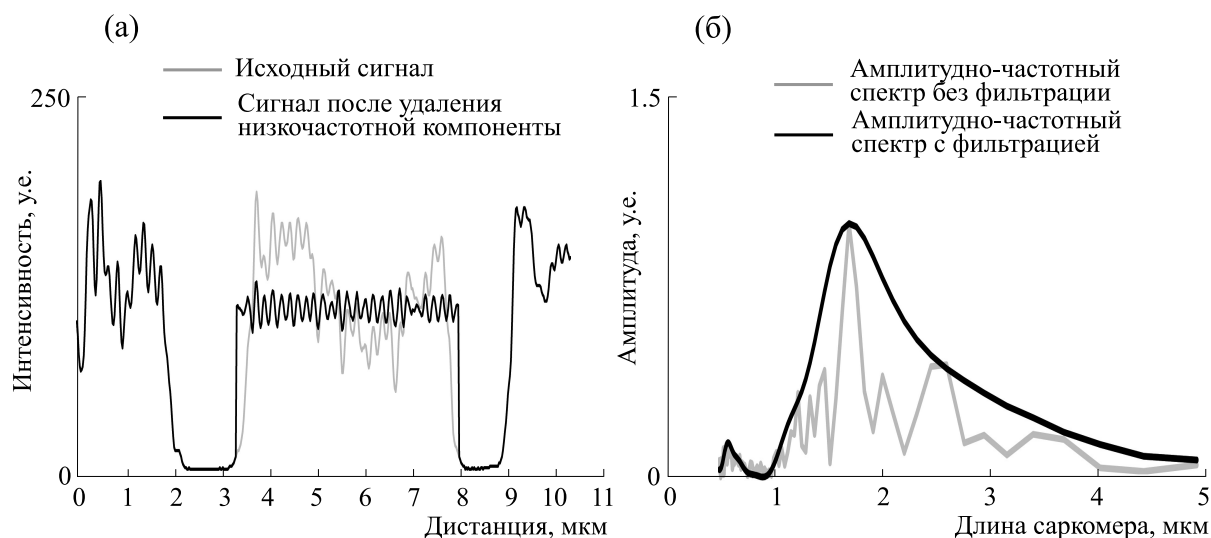


Рис. 3. Примеры использования дополнительных настроек в алгоритме определения средней длины саркомера: (а) — исключение низкочастотной компоненты исходного сигнала исчерченности; (б) — фильтрация амплитудно-частотного спектра, полученного после применения ДПФ.

отфильтрованные массивы реальных и мнимых чисел для частотного спектра используются для повторной «сборки» этого спектра и вычисления средней длины саркомера уже на основе этого спектра. Полученный амплитудно-частотный спектр также может быть подвергнут фильтрации с пользовательскими настройками. Например, в случае если амплитудно-частотный спектр содержит два близко расположенных пика, или имеет отклонения вблизи одного пика, применение этого фильтра может дать более точную оценку средней длины саркомера (рис. 3б).

Завершающим этапом является определение пикового значения амплитудно-частотного спектра, и все последующие вычисления средней длины саркомера (с учетом описанных ранее параметров) привязываются к этому пику. Именно из амплитудно-частотного спектра выделяется основная гармоника или диапазон гармоник в соответствии со значениями параметров *Proximity*, максимального числа гармоник, минимального и максимального допустимого значения длины саркомера. Для этой гармоники вычисляется длина саркомера. При использовании описанных выше фильтров (исключение низкочастотного компонента, фильтрация массивов реальных и мнимых чисел частотного спектра, фильтрация амплитудно-частотного спектра) вычисляются три различных значения средней длины саркомера, которые можно сопоставлять друг с другом и оценивать степень искажения вычисления при включении/выключении фильтра.

Пример работы алгоритма определения средней длины саркомера показан на рис. 4. Алгоритм может применяться при динамическом измене-

нии длины саркомера в случаях ненагруженного или нагруженного сокращения изолированного кардиомиоцита и реконструкции саркомерной динамики, в том числе при задании диастолического растяжения кардиомиоцита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании был разработан и протестирован настраиваемый алгоритм для вычисления средней длины саркомера, основанный на исходном паттерне поперечно-полосатой исчерченности. Как и многие другие методы, описанные в литературе [1,8,9,11], наш алгоритм базируется на применении дискретного преобразования Фурье для определения основного пространственного периода в сигнале поперечной исчерченности кардиомиоцита. Однако имеется принципиальное отличие в исходных данных, используемых для нашего алгоритма, поскольку эти данные получены при сканировании узкого длинного региона кардиомиоцита. В этом случае невозможно реализовывать расширенные корректировки, обязательные для данных, зарегистрированных с целого кардиомиоцита (например, осуществлять оценку смещения миоцита относительно линии сканирования или неоднородности популяции саркомеров в различных областях клетки). Это накладывает ограничения на применения представленного в данной работе алгоритма по сравнению с другими алгоритмами [1,8,10]. С другой стороны, задание узкого региона сканирования изображения клетки позволило обеспечить временную дискретизацию, приемлемую для регистрации механического ответа кардиомиоцита с высокой точностью.

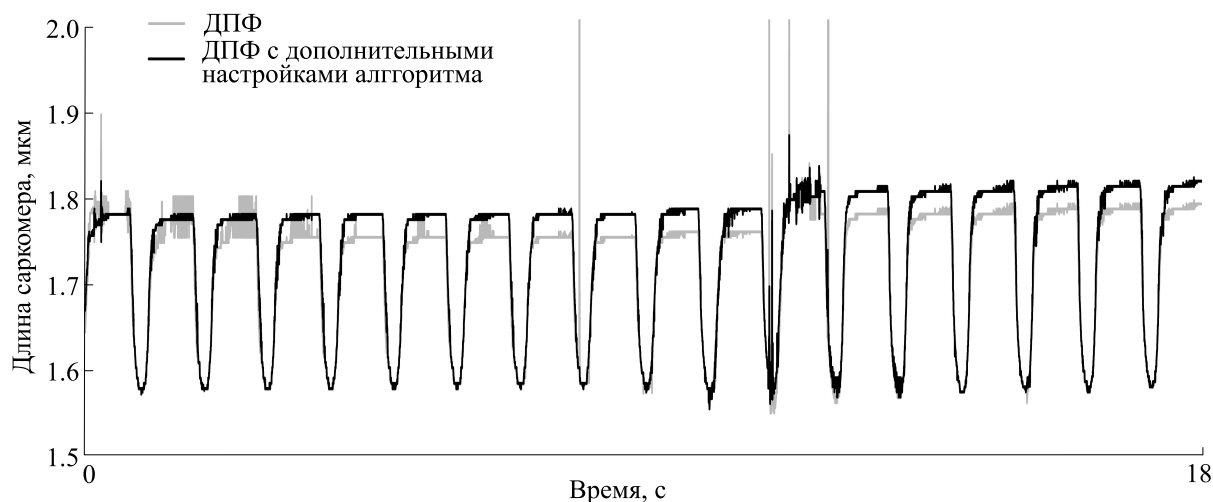


Рис. 4. Репрезентативный пример работы алгоритма определения средней длины саркомера при использовании дополнительных настроек (исключение низкочастотной компоненты, фильтрация амплитудно-частотного спектра).

Представленный в данной работе алгоритм был полностью реализован в самостоятельно разработанном программном обеспечении EgarAll6. Для этого есть ряд технических причин. Во-первых, первоначально данные регистрировали в коммерческой программе ZEN2011 (Carl Zeiss, Germany), которая не предоставляет возможности применения ДПФ для определения саркомерной динамики. Во-вторых, по сравнению с другими коммерчески доступными программными обеспечениями, специализирующимися на анализе данных саркомерной исчерченности (например, IonWizard 6.0, IonOptix Ltd.), наше программное обеспечение позволяет настраивать ДПФ-алгоритм поиска основной гармоник в сигнале саркомерной исчерченности и сохранять исходные данные профилей исчерченности, а не только полученные средние значения длины саркомера, что дает возможность реализации расширенного анализа динамики саркомеров [1,8,10].

Также разработанный нами алгоритм предусматривает возможность дополнительной фильтрации данных, которая необходима в случае нарушения регистрируемого паттерна саркомерной исчерченности вследствие неравномерного освещения клетки или присутствия в кадре структур, не являющихся саркомерами. Подобно ранее описанным в литературе методам [1,10], нами было реализовано установление основного «тренда» исходного сигнала (путем исключения низкочастотной компоненты) непосредственно до запуска ДПФ. Кроме того, разработанный нами алгоритм включает дополнительные фильтры с пользовательскими настройками, реализуемые уже после ДПФ.

Таким образом, представленный в данной работе настраиваемый алгоритм определения сред-

ней длины саркомера является адекватным для оценки механической функции саркомера в активно сокращающемся изолированном кардиомиоците при задании различных условий нагрузки или степени диастолического растяжения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер НИОКТР №АААА-А18-118020590031-8), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-04-00572-а) и постановления Правительства РФ № 211 от 16.03.2013 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с подопытными животными проводились в соответствии с международными правилами обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU) и были одобрены комиссией Института иммунологии и физиологии УрО РАН по контролю за лабораторными животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Peterson, M. Kalda, and M. Vendelin, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304** (6), C519 (2013).
2. A. J. Brady, *Physiol. Rev.* **71** (2), 413 (1991).
3. G. Iribe, *Biological, Physical and Technical Basics of Cell Engineering* (Springer, Singapore, 2018), pp. 193–207.
4. G. Iribe, M. Helmes, and P. Kohl, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292** (3), H1487 (2007).
5. O. Cazorla, J. Y. Le Guennec, and E. White, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32** (5), 735 (2000).
6. A. Khokhlova, G. Iribe, P. Kononov, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **114**, 276 (2018).

7. P. P. de Tombe and H. E. D. J. ter Keurs, J. Mol. Cell. Cardiol. **91**, 148 (2016).
8. G. Bub, P. Camelliti, C. Bollensdorff, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **298** (5), H1616 (2010).
9. C. Pasqualin, F. Gannier, A. Yu, et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. **311** (2), C277 (2016).
10. B. W. Infantolino, M. J. Ellis, and J. H. Challis, Anat. Rec. **293** (11), 1913 (2010).
11. M. Helmes, A. Najafi, B. M. Palmer, et al., Cardiovasc. Res. **111** (1), 66 (2016).
12. T. Myachina, A. Khokhlova, I. Antsygin, and O. Lookin, IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. **350**, 012011 (2018).
13. O. N. Lookin and Y. L. Protsenko, Biophys. J. **63** (3), 441 (2018).
14. J. Y. Le Guennec, E. White, F. Gannier, et al., Exp. Physiol. **76** (6), 975 (1991).
15. S. Sugiura, S. Nishimura, S. Yasuda, et al., Nature Protocols **1** (3), 1453 (2006).
16. G. Iribe, T. Kaneko, Y. Yamaguchi, and K. Naruse, Prog. Biophys. Mol. Biol. **115** (2–3), 103 (2014).

The Development and Program Implementation of an Algorithm for Estimating a Mean Sarcomere Length of a Cardiomyocyte

T.A. Myachina* **, K.A. Butova* **, and O.N. Lookin* **

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomayskaya 106, Yekaterinburg, 620049 Russia

**Ural Federal University, ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia

This study describes our adjustable algorithm for determination of a mean sarcomere length in isolated cardiomyocytes during active contraction under unloaded or loaded conditions. The algorithm is based on the discrete Fourier transform and implements additional processing of an input signal for sarcomere striation in cardiomyocyte and the amplitude-frequency spectral curve obtained after the discrete Fourier transform for more precise determination of sarcomere length. The effectiveness of the algorithm to analyze sarcomere striation patterns from isolated cardiac cells is shown.

Keywords: cardiomyocyte, sarcomere, contractile response, discrete Fourier transform