

УДК 57.087.3

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР АКТИНА, МЕЧЕННОГО ФАЛЛОИДИНОМ

© 2024 г. А. В. Ревитцер^{1, *}, Ю. А. Негуляев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

*E-mail: eetytnet@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.2023

После доработки 13.02.2024

Принята к публикации 16.02.2024

Клетка — это сложно организованная трехмерная система, обладающая целым рядом высокодинамичных структур, морфология которых сложна для описания, так как является протяженной, изрезанной, неровной. Актиновый цитоскелет, состоящий из фибриллярного и глобулярного актина, а также вспомогательных белков, регулирующих его организацию, является одной из таких структур. Изучение его организации и динамики — актуальный вопрос современной цитологии. Форма и перестройки актинового цитоскелета тесно связаны с функционированием клетки. Возможность какой-либо (качественной или количественной) характеристики изменений актинового цитоскелета позволяет подтверждать или опровергать гипотезы в ходе исследований, а также делать новые предположения. Количественная характеристика помогает объективно и непредвзято сравнивать актиновые структуры в различных экспериментах, выявляя воздействия биологических, химических и физических стимулов. В настоящее время для численной оценки актиновых структур клетки существует несколько доступных и легко реализуемых подходов с помощью бесплатного программного продукта ImageJ. В представленном обзоре обобщены методы анализа изображений внутриклеточных структур актина, меченных фаллоидином, с помощью ImageJ. Рассмотренные методы позволяют получать количественную характеристику организации актиновых структур для дальнейшей оценки и сравнения результатов экспериментов.

Ключевые слова: фибриллярный актин, количественная характеристика организации актиновых структур, фрактальная размерность Минковского

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки; GV (grey value) — интенсивность серого; MGV (mean grey value) — относительная интенсивность серого; L (length) — суммарная длина актиновых фибрилл клетки; D (dimension) — фрактальная размерность Минковского.

DOI: 10.31857/S0041377124030101, EDN: PDYRCM

Актиновый цитоскелет является белковой каркасной структурой, находящейся в клетке. Кроме очевидной каркасной функции он участвует и в других клеточных процессах — подвижности немышечных клеток, сигналинге, эндоцитозе и экзоцитозе, делении клетки (Dominguez, Holmes, 2011). Актиновые структуры в клетке представлены глобулярным и фибриллярным актином, находящимися в постоянном динамическом балансе — в присутствии АТФ происходит полимеризация актина на одном конце нити и деполимеризация на другом. Кроме глобулярного и фибриллярного актина в формировании актиновых фибрилл участвуют другие белки, называемые актин-связывающими, которые обеспечивают кэпирование, ветвление и объединение актиновых фибрилл (Vallénus, 2013; Dominguez, Holmes, 2011). Актиновые фибриллы в клетке — высокодинамичная структура, реагирующая на изменения биохими-

ческого и физического окружения, поэтому важной задачей при изучении актина в клетке является регистрация его состояний до и после различных воздействий в ходе эксперимента.

Организацию актина в клетке возможно выявлять с помощью Вестерн-блоттинга фибриллярного и глобулярного актина (Domanski et al., 2016). Но чаще всего организацию актина оценивают на основании визуализации структур, используя микрофотографии, полученные с помощью широкопольного или конфокального микроскопа. Для выявления фибриллярного актина его окрашивают с помощью цветных флуоресцентных меток, соединенных со специфическими антителами или фаллоидином, который специфично связывается с фибриллярным актином (Vallénus, 2013; Mishra et al., 2019). После этого по полученным фотографиям актиновые фибриллы оценивают визуально или прибегают к цифровым

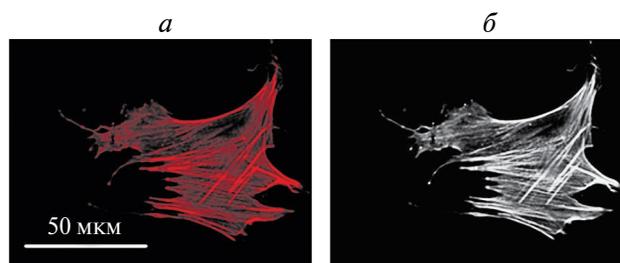
методам, самым популярным из которых является вычисление относительной интенсивности флуоресценции. Но кроме этого метода, который дает минимум структурной информации, существуют и другие, несколько реже используемые — расчет суммарной длины актиновых филаментов в клетке и фрактальная размерность Минковского для изображений фибриллярного актина.

В научной среде широко известен свободно распространяемый программный продукт ImageJ (НИН, США) (Schneider et al., 2012), и разнообразные плагины, интегрированные в эту систему, позволяющие реализовать более специфичные подходы к вычислениям; кроме этого, существуют и отдельные программные решения. Целью данной обзорной статьи является обобщение информации о реализации в программе ImageJ трех самых популярных методов цифрового анализа перестроек актиновых структур. Приведены основные алгоритмы обработки изображений с использованием микрофотографий клеток, окрашенных родамином, конъюгированным с фаллоидином.

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА

Измерение относительной интенсивности флуоресценции фибриллярного актина является наиболее распространенным методом для количественной оценки фибриллярного актина в клетке в настоящее время. Подход вычисления относительной интенсивности флуоресценции основан на кодировании яркости изображений: например, для изображения в оттенках серого глубина цвета одного пикселя принимает значение от 0 до 255 при 8-битном кодировании; при суммировании этих значений яркости и делении полученной суммы на количество пикселей вычисляется относительная интенсивность флуоресценции (рис. 1).

Реализация вычислений относительной интенсивности флуоресценции в ImageJ. Расчет в ImageJ производится согласно следующим этапам: в меню Analyze выбираются настройки Set_Measurements, а в них — подпункт MGV. Затем необходимо выбрать и открыть обрабатываемое изображение (например, для серий изображений, полученных с помощью микроскопов Olympus через плагин Olympus_Viewer в меню Plugins), после чего через меню Image — подменю Channels и функции Split_Channels; разделить выбранное изображение по каналам, далее выбрать канал, содержащий изображение фибриллярного актина, затем, используя функцию Freehand_Selections, обвести по периметру изображение клетки и в меню Analyze выбрать Measure;



$$MGV = \frac{\sum_{i=1}^N GV_i}{N}$$

Количество серого, %	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Значение пикселя	255	229	204	178	153	128	102	76	51	25	0
Оттенок											

Рис. 1. Схематическая визуализация вычисления средней интенсивности флуоресценции фибриллярного актина мезенхимной стволовой клетки (МСК). *a* — Микрофотография МСК, окрашенной родамином, конъюгированным с фаллоидином. *b* — Перевод канала, содержащего изображение фибриллярного актина, в оттенки серого. *v* — Формула для вычисления относительной интенсивности флуоресценции (MGV, mean grey value), где GV (grey value) — численный эквивалент яркости пикселя, а *N* — число пикселей в изображении цитоскелета. *z* — Примеры кодирования численных эквивалентов цветов пикселей для 8-битного изображения (GV).

результат вычисления относительной интенсивности флуоресценции появится во всплывающем окне, после чего его следует записать в программу, работающую с табличными данными (например, Excel (Microsoft, USA), но в ImageJ также можно проводить расчеты), и переходить к следующему измерению, после получения достаточного числа измерений вычисляется среднegrupповое значение, которое впоследствии сравнивается с вычисленным средним для других групп.

Средняя интенсивность флуоресценции — интуитивно понятный подход, позволяющий численно охарактеризовать изменения при сборке или разборке фибриллярного актина, так как чем больше в клетке окрашенного фибриллярного актина, тем больше относительная интенсивность флуоресценции (Hao et al., 2012). Этот подход хорошо себя зарекомендовал, и его интуитивно понятная реализация активно используется при оценке организации фибриллярного актина во многих других работах (Numasawa et al., 2011; Liu et al., 2015; Lu et al., 2015; Revittser et al., 2020). Часто этот метод служит единственным подходом для измерения и количественного подтверждения

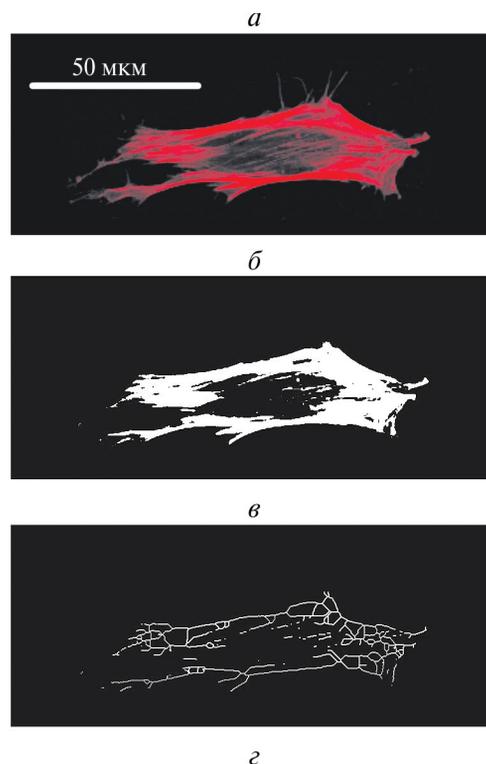
наблюдаемой сборки или разборки микрофиламентов, как, например, в предшествующих исследованиях перестроек цитоскелета, инициированных деструкцией рафтов (Chubinskiy et al., 2013) или селективной активацией ионных каналов (Chubinskiy et al., 2019).

Вычисление относительной интенсивности флуоресценции как метод имеет существенное преимущество — независимость результата от размера клетки и ее формы, доступность программного обеспечения и простая реализация вычислений. Однако есть и недостатки: результат сильно зависит от параметров, выставяемых при получении микрофотографии, таких как выдержка, интенсивность лазера (при использовании конфокальной микроскопии), поэтому очень важно следить за тем, чтобы все группы микрофотографий были получены при одинаковых параметрах. Очевидной и самой существенной особенностью метода является факт, что полученные измерения в большей степени будут свидетельствовать о количественном значении фибриллярного актина, но не будут содержать качественную информацию о распределении или форме фибрилл. Эти ограничения делают необходимым поиск и развитие новых современных подходов, включающих анализ организации и динамики фибриллярных структур в клетке.

РАСЧЕТ СУММАРНОЙ ДЛИНЫ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ В КЛЕТКЕ

Суммарная длина фибриллярного актина является информативным параметром для оценки изменений, возникающих в структуре актинового цитоскелета клетки. Данный показатель рассчитывается как сумма длин всех фибрилл, выявленных на микрофотографии клетки (Lichtenstein et al., 2003; Vindin et al., 2014). Реализация этого расчета возможна при использовании плагина `Measure_Skeleton_Length` (Niemistö et al., 2005) (рис. 2).

Реализация вычислений суммарной длины фибриллярного актина (L) клетки с помощью плагина `Measure_Skeleton_Length` в `ImageJ`. Порядок вычисления параметра состоит из предобработки изображения с помощью `ImageJ`. Выбранную для расчетов микрофотографию необходимо открыть, далее необходимо выбрать и отделить от остальных канал, в котором находится изображение фибриллярного актина (в меню `Image` подменю `Channels`, в нем — функция `Split_Channels`), после этого полученное изображение перевести в формат без оттенков серого — бинаризовать (`Binarize`), а затем провести построение множества пикселей, равноудаленных от границ фигуры — скелета фигуры (функция `Skeletonize`). Затем в изображении нужно выделить



$$L = \sum_{i=1}^N l_i; L = \sum_{j=1}^{N'} p_j$$

Рис. 2. Вычисление суммарной длины фибриллярного актина клетки. *a* — МСК, окрашенная родамином, конъюгированным с фаллоидином. *б* — Бинаризованное изображение фибриллярного актина. *в* — Скелет фигуры. *з* — Формула для расчета суммарной длины фибриллярного актина клетки, где L — суммарная длина фибриллярного актина в клетке, l — длина отдельных филаментов, N — количество отдельных филаментов, N' — количество отдельных пикселей, принадлежащих скелету фигуры, p — пиксель.

клетку (используя `Freehand_Selections`) и рассчитать длину с помощью кнопки плагина `Measure_Skeleton_Length` с изображением скелета фигуры. Безусловно, скелет фигуры — это приблизительное, а не точное изображение фибрилл. Тем не менее даже такой параметр может дать представление об организации, расположении и количестве фибрилл в клетке и позволяет сравнивать результаты контрольных и экспериментальных групп (Lichtenstein et al., 2003).

Некоторые исследовательские группы развили и улучшили этот подход в собственных программных продуктах. Например, реализован автоматизированный подход, позволяющий определять границы клеток на микрофотографии, выделять в них филаменты и подсчитывать их длину (Vindin et al., 2014). Кроме того, использован метод, позволяющий учитывать значения не только длины, но и ширины актиновых филаментов при анализе (Alioscha-Perez et al., 2016).

ВЫЧИСЛЕНИЕ ФРАКТАЛЬНОЙ РАЗМЕРНОСТИ МИНКОВСКОГО

Актиновый цитоскелет клетки обладает сложной изрезанной формой, которая может изменяться при воздействии различных биологически активных веществ, при этом их изменения не всегда можно охарактеризовать количественно с помощью относительной интенсивности флуоресценции (Revittser et al., 2021). Существует фрактальная размерность Минковского — коэффициент, описывающий структуры на основе количественной оценки их сложности в контексте расположения в пространстве (Longley, Batty, 1989), описывающий количественную связь между масштабом и детализацией изображения. Изображение окрашенного фибриллярного актина на микрофотографии, полученное с помощью флуоресцентной

микроскопии, подлежит оценке с помощью этого метода (Smith et al., 1996).

Само вычисление фрактальной размерности происходит следующим образом: на изображение накладывается сетка из квадратных ячеек, происходит подсчет ячеек, содержащих изображение, далее размер ячейки уменьшается (например, в два раза или на три пикселя, правило может быть любым); снова происходит подсчет ячеек, содержащих изображение, и далее после изменения размера сетки процесс повторяется еще несколько раз. Далее строится зависимость количества ячеек сетки, необходимых для покрытия изображения от их размера. Эта зависимость аппроксимируется прямой по методу наименьших квадратов; коэффициент фрактальной размерности Минковского вычисляется как тангенс угла наклона этой прямой (рис. 3) (Bishop, Peres, 2016).

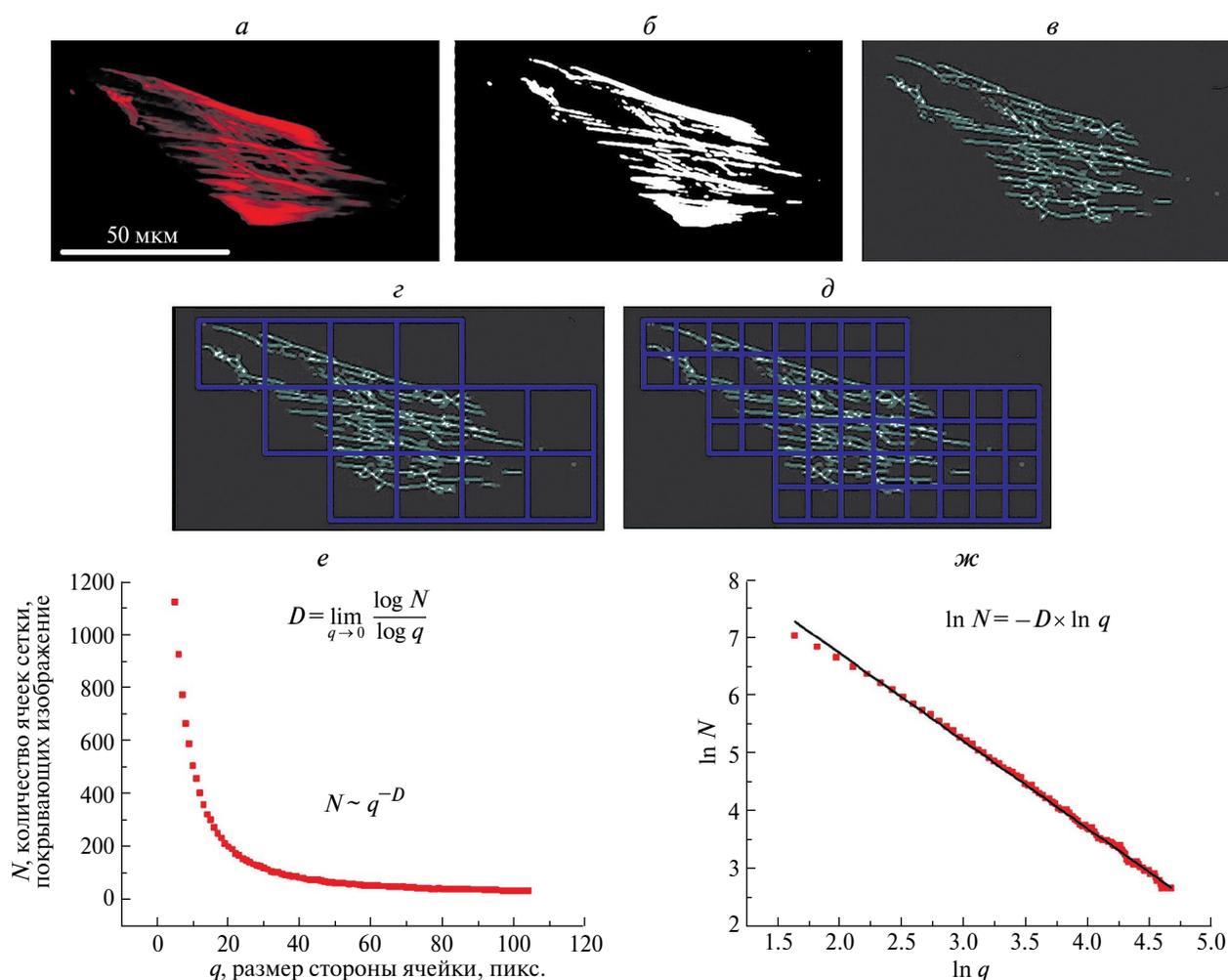


Рис. 3. Этапы вычисления фрактальной размерности Минковского в плагине FracLac. *a* — Микрофотография МСК окрашенного родамином, конъюгированным с фаллоидином. *б* — Результат операции бинаризации изображения на рисунке *a*. *в* — Результат операции скелетонизации изображения (*б*). *г, в* — Сетка для вычисления фрактальной размерности Минковского, наложенная на изображение *в*. *е* — График зависимости количества ячеек сетки (N), покрывающих изображение, от размера стороны ячейки (q). *ж* — Тот же график (*е*) построенный в логарифмических координатах, приближенный аппроксимирующей прямой; фрактальная размерность Минковского (D) рассчитывается как тангенс угла наклона этой прямой (относительно горизонтальной оси).

Реализация вычислений фрактальной размерности Минковского с помощью плагина FracLac для ImageJ. Самый широко используемый программный продукт из свободно распространяемых инструментов для подсчета фрактальной размерности Минковского — это плагин FracLac (Karperien et al., 2013) для программы ImageJ (рис. 3). Порядок обработки изображения с помощью плагина состоит из первоначальной подготовки изображения с помощью ImageJ. Пользователем выбирается изображение для расчетов, далее его необходимо открыть в приложении, после чего через меню Image, подменю Channels и функции Split_Channels выбранное изображение разделяется по цветовым каналам, далее в канале, содержащем изображение фибриллярного актина, производится бинаризация (Binarize) и далее построение скелета полученной фигуры (Skeletonize). Затем в изображении выделяется область интересующей клетки с помощью инструмента Freehand_Selection. Далее необходимо открыть плагин FracLac в ImageJ, выбрать меню BC (box-counting — еще одно название фрактальной размерности Минковского), установить размеры ячеек для расчета в специальном окошке и произвести расчет через кнопку ОК. Эти действия позволят получить результат вычисления фрактальной размерности Минковского для выбранного изображения клетки (Revittser et al., 2022). Далее полученный результат из всплывающего окна необходимо перенести в программу, работающую с табличными данными.

Плагин FracLac является доступным и понятным инструментом, позволяющим провести необходимые вычисления (Fuseler et al., 2007; Qian et al., 2012), однако они могут сильно зависеть от параметров, выбираемых пользователем при расчётах, что может привести к недостоверным результатам. Вопрос подбора параметров решен в программном продукте (Revittser et al., 2021), подбор положения и размера ячеек полностью автоматизирован, для расчета необходимо только выбрать микрофотографию интересующей клетки, но для его запуска необходим коммерческий продукт MATLAB (MathWorks, США) — программная среда, в которой он реализован.

Вычисление фрактальной размерности Минковского является менее популярным подходом по сравнению с вычислением средней интенсивности флуоресценции и суммарной длиной актиновых фибрилл ввиду его менее понятной на интуитивном уровне и более сложной математической реализации, тем не менее есть основания полагать, что он позволяет выявлять изменения цитоскелета, недоступные для квантификации с помощью относительной интен-

сивности флуоресценции (Revittser et al., 2021). Так как коэффициент фрактальной размерности Минковского характеризует самоподобие изображения в определенных масштабах, с его помощью возможно выявить изменения, связанные с реорганизацией фибриллярного актина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Некоторые изменения актинового цитоскелета возможно увидеть глазом, в то время как для менее выраженных изменений организации такая оценка может оказаться недостаточной и, кроме того, она субъективна и зависит от опыта и конкретных предпочтений наблюдателя (Revittser et al., 2021). С помощью квантификации возможно получить объективный численный эквивалент наблюдаемых изменений. Например, увеличение параметра относительной интенсивности флуоресценции и суммарной длины фибриллярного актина говорит о сборке актинового цитоскелета (Lichtenstein et al., 2003; Fuseler et al., 2007; Revittser et al., 2022); уменьшение фрактальной размерности Минковского может говорить как о разборке, так и о изменении организации расположения фибриллярного актина в клетке (Fuseler et al., 2007; Qian et al., 2012).

Цифровые подходы для квантификации изменений применимы не только к актиновому цитоскелету (Fuseler et al., 2007; Alioscha-Perez et al., 2016; Zonderland et al., 2019; Revittser et al., 2022), но и к многим другим клеточным структурам: микротрубочкам (Shu et al., 2021; Huang et al., 2021), дендритам нейронов (Ristanović et al., 2014; Rajković et al., 2017), распределению ионов кальция в клетке (Miroshnikova et al., 2021).

Для всех описанных выше подходов возможно найти улучшенные версии (Vindin et al., 2014; Alioscha-Perez et al., 2016; Liu et al., 2018; Revittser et al., 2021), однако обычно они не связаны с ImageJ, а реализованы в собственных программных продуктах, которые чаще всего находятся и в закрытом доступе, и требуют работы с платными программными средами, что снижает их доступность для исследовательских групп.

Помимо рассмотренных выше методов появляются и более сложные, например, классификация изображений фибриллярного актина с помощью машинного обучения и искусственного интеллекта (Nanguneri et al., 2019; Oei et al., 2019; Liu et al., 2022; Bhavna et al., 2023) для реализации которых необходимо иметь специальное оборудование и более узкие знания для точной настройки и интерпретации

результатов, но, возможно, в ближайшем будущем подобные полностью автоматизированные подходы станут общедоступными.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность Морачевской Елене Алексеевне за помощь в написании обзора.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института цитологии РАН. Никакого дополнительного финансирования на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alioscha-Perez M., Benadiba C., Goossens K., Kasas S., Dietler G., Willaert R., Sahli H. 2016. A robust actin filaments image analysis framework. *PLOS Comput. Biol.* V. 12: e1005063.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005063>
- Bhavna R., Sonawane M. 2023. A deep learning framework for quantitative analysis of actin microridges. *Npj Systems Biol. Applications.* V 9. P. 21.
<https://doi.org/10.1038/s41540-023-00276-7>
- Bishop C. J., Peres Y. 2016. Minkowski and Hausdorff dimensions in fractals in probability and analysis. Cambridge: Cambridge University Press. P. 1.
<https://doi.org/10.1017/9781316460238.002>
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Efremova T.N., Khaitlina S.Y., Morachevskaya E.A. 2013. Functional impact of cholesterol sequestration on actin cytoskeleton in normal and transformed fibroblasts. *Cell Biol. Int.* V. 37. P. 617
<https://doi.org/10.1002/cbin.10079>
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V. Y., Vassilieva I. O., Sudarikova, A.V., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A. 2019. Agonist-induced Piezo1 activation suppresses migration of transformed fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 514. P. 173.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.139>
- Domanski D., Zegrocka-Stendel O., Perzanowska A., Dutkiewicz M., Kowalewska M., Grabowska I., Maciejko D., Fogtman A., Dadlez M., Koziak K. 2016. Molecular mechanism for cellular response to β -escin and its therapeutic implications. *PLoS One.* V. 11. P. e0164365.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164365>
- Dominguez R., Holmes C. K. 2011. Actin structure and function. *Ann. Rev. Biophys.* V. 40. P. 169
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>
- Fuseler J. W., Millette C. F., Davis J. M., Carver W. 2007. Fractal and image analysis of morphological changes in the actin cytoskeleton of neonatal cardiac fibroblasts in response to mechanical stretch. *Microscopy and Microanalysis.* V. 13. P. 133.
<https://doi.org/10.1017/S1431927607070225>
- Hao X., Wu J., Shan Y., Cai M., Shang X., Jiang J., Wang H. 2012. Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living HeLa cells. *J. Physics. Condensed Matter.* V. 24. 164207
<https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/16/164207>
- Huang Q., Chai H., Wang S., Sun Y., Xu W. 2021. 0.5-Gy X-ray irradiation induces reorganization of cytoskeleton and differentiation of osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* V 23. P. 379.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12018>
- Karperien A., Ahammer H., Jelinek H. F. 2013. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers Cell. Neurosci.* V. 7. P. 3.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00003>
- Lichtenstein N., Geiger B., Kam Z. 2003. quantitative analysis of cytoskeletal organization by digital fluorescent microscopy. *Cytometry.* V. 54. P. 8.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.10053>
- Liu C., Fan Y., Zhou L., Zhu H., Song Y., Hu L., Wang Y., Li Q. 2015. Pretreatment of mesenchymal stem cells with angiotensin ii enhances paracrine effects, angiogenesis, gap junction formation and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* V. 188. P. 22.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.425>
- Liu Y., Mollaeian K., Ren J. 2018. An image recognition-based approach to actin cytoskeleton quantification. *Electronics.* V. 7. P. 443.
<https://doi.org/10.3390/electronics7120443>
- Liu Y., Zhang J., Bharat C., Ren J. 2022. Cellular actin cytoskeleton morphology identification for mechanical characterization using deep learning. *IEEE Access.* V. 10: 97408.
<https://doi.org/10.1109/ACCESS.2022.3203720>
- Longley P.A., Batty M. 1989. Fractal measurement and line generalization. *Computers & Geosci.* V. 15. P. 167.
[https://doi.org/10.1016/0098-3004\(89\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0098-3004(89)90032-0)
- Lu A., Wang L., Qian L. 2015. The role of eNOS in the migration and proliferation of bone-marrow derived endothelial progenitor cells and in vitro angiogenesis. *Cell Biol Int.* V. 39. P. 484.
<https://doi.org/10.1002/cbin.10405>
- Miroshnikova Y.A., Manet S., Li X., Wickström S.A., Faurobert E., Albiges-Rizo C. 2021. Calcium signaling mediates a biphasic mechanoadaptive response of endothelial cells to cyclic mechanical stretch. *Mol. Biol. Cell.* V. 32. P. 1724
<https://doi.org/10.1091/mbc.E21-03-0106>

- Mishra P., Martin D. C., Androulakis I. P., Moghe P. V.* 2019. Fluorescence imaging of actin turnover parses early stem cell lineage divergence and senescence. *Sci. Reports.* V. 9. P. 10377.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46682-y>
- Nanguneri S., Pramod R. T., Efimova N., Das D., Jose M., Svitkina T., Nair D.* 2019. Characterization of nanoscale organization of F-Actin in morphologically distinct dendritic spines in vitro using supervised learning. *eNeuro.* V. 6: ENEURO.0425-18.2019.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0425-18.2019>
- Niemistö A., Dunmire V., Yli-Harja O., Zhang W., Shmulevich I.* 2005. Robust Quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Transactions on Medical Imaging.* V. 24. P. 549.
<https://doi.org/10.1109/tmi.2004.837339>
- Numasawa Y., Kimura T., Miyoshi S., Nishiyama N., Hida N., Tsuji H., Tsuruta H., Segawa K., Ogawa S., Umezawa A.* 2011. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio).* V. 29. P. 1405.
<https://doi.org/10.1002/stem.691>
- Oei R. W., Hou G., Liu F., Zhong J., Zhang J., An Z., Xu L., Yang Y.* 2019. Convolutional neural network for cell classification using microscope images of intracellular actin networks. *PLoS One.* V. 14: e0213626.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213626>
- Qian A. R., Li D., Han J., Gao X., Di S. M., Zhang W., Hu L. F., Shang P.* 2012. Fractal dimension as a measure of altered actin cytoskeleton in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity using 3-D/2-D clinostats. *IEEE Transactions Bio-Med. Eng.* V. 59. P. 1374.
<https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2187785>
- Rajković N., Krstonošić B., Milošević N.* 2017. Box-counting method of 2D neuronal image: method modification and quantitative analysis demonstrated on images from the monkey and human brain. *Comput. Mathemat. Methods Med.* V. 2017: 8967902.
<https://doi.org/10.1155/2017/8967902>
- Revittser A. V., Chubinskiy-Nadezhdin V. I., Negulyaev Yu. A.* 2022. Analysis of fibrillar-actin rearrangements in fetal human mesenchymal stem cells using the Minkowski fractal dimension. *Cell Tiss. Biol.* V. 16. P. 576.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X22060074>
- Revittser A. V., Chubinsky-Nadezhdin V. I., Negulyaev Yu. A.* 2020. The Effect of atrial natriuretic peptide on reorganization of actin cytoskeleton and migration of human mesenchymal stem cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 14. P. 154.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X20020091>
- Revittser A., Selin I., Negulyaev Y., Chubinskiy-Nadezhdin V.* 2021. The analysis of F-actin structure of mesenchymal stem cells by quantification of fractal dimension. *PLoS One.* V. 16: e0260727.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260727>
- Ristanović D., Stefanović B. D., Puškaš N.* 2014. Fractal analysis of dendrite morphology using modified box-counting method. *Neurosci. Res.* V. 84. P. 64.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.04.005>
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.* 2012. NIH image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature methods.* V. 9. P. 671. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554542/>
- Shu S. T., Li W. F., Smithgall T. E.* 2021. Visualization of host cell kinase activation by viral proteins using GFP fluorescence complementation and immunofluorescence microscopy. *bio-protocol.* V. 11: e4068
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4068>
- Smith T. G., Lange G. D., Marks W. B.* 1996. Fractal methods and results in cellular morphology — dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods.* V. 69. P. 123.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00080-5)
- Vallenius T.* 2013. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open Biol.* V. 3: 130001.
<https://doi.org/10.1098/rsob.130001>
- Vindin H., Bischof L., Gunning P., Stehn J.* 2014. Validation of an algorithm to quantify changes in actin cytoskeletal organization. *J. Biomol. Screening.* V. 19. P. 354.
<https://doi.org/10.1177/1087057113503494>
- Zonderland J., Wieringa P., Moroni L.* 2019. A quantitative method to analyse F-actin distribution in cells. *Methods X.* V. 6. P. 2562.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.10.018>

METHODS FOR IMAGE ANALYSIS OF INTRACELLULAR STRUCTURES OF ACTIN LABELED WITH PHALLOIDIN

A. V. Revittser^a, *, Y. A. Negulyaev^a

^a *Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*

**e-mail: eetytnet@gmail.com*

A cell is a complex three-dimensional system, which possesses a number of highly dynamic structures with extended, rugged, and uneven morphology. The actin cytoskeleton consists of fibrillar and globular actin, as well as auxiliary proteins that regulate organization. The shape and the rearrangements of actin cytoskeleton are closely related to functioning of the cell. The ability to characterize these changes allows scientists to confirm or refute any hypotheses in the research. Obtaining a numerical equivalent of the actin cytoskeleton organization could help compare actin structures in biological experiments (example: exposure to biologically active substances). The review summarizes methods for analyzing images of intracellular actin structures labeled with phalloidin using ImageJ. The methods considered make it possible to obtain a quantitative characteristic of the organization of actin structures for further evaluation and comparison of experimental results.

Keywords: fibrillar actin, quantitative values of the organization of actin structures, Minkowski fractal dimension