

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc679035>

EDN: FCCW0V



Метод количественной оценки сократительной активности миотуб

П.А. Махновский, Т.Ф. Вепхвадзе, Д.В. Попов

Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Миотубы — многоядерные терминально дифференцированные клетки, которые широко используются для изучения изменений, вызванных сократительной активностью мышц, метаболическими нарушениями и миопатиями. Способность к сокращению является ключевым показателем зрелости мышечных клеток, поэтому количественная характеристика этого показателя необходима для оценки степени дифференцировки миотуб. Существующие методы оценки вызванной сократительной активности миотуб имеют ряд ограничений: короткие анализируемые интервалы записи, невозможность отличить клеточную активность от артефактов и др.

Цель. Разработать метод количественной оценки вызванной сократительной активности миотуб, учитывающий период их сокращения-расслабления и влияние артефактов, а также позволяющий анализировать десятки циклов сокращения-расслабления.

Методы. Миотубы C2C12 на 9–11-й день дифференцировки стимулировали электрическим током в течение 1 ч: в течение 300 мс — последовательные биполярные прямоугольные импульсы длительностью 2 мс (45 Гц, 1,7 мА/лунка) и в течение 700 мс — покой. Сократительную активность регистрировали на видео (40 с в начале и в конце каждой сессии) и затем количественно характеризовали с помощью существующих методов, основанных на оценке смещения участка изображения или изменения яркости пикселей, а также с помощью разработанного метода, основанного на оценке среднего стандартного отклонения яркости пикселей в скользящем окне.

Результаты. Предложенный нами метод по сравнению с существующими на порядок снизил влияние артефактов (изменение фокуса и движение частиц в среде) на индекс сократительной активности миотуб, а также коэффициент вариации между техническими повторами — в 2 раза. Увеличение продолжительности анализируемой записи (до 40 с) позволило снизить вариативность (в 1,4–2,3 раза) относительно коротких видеозаписей. Программа для языка python (<https://github.com/maxrauel/movindex>) выложена в открытом доступе.

Заключение. В работе предложен количественный метод оценки вызванной сократительной активности миотуб, позволяющий эффективно удалять артефакты, связанные с движением частиц в культуральной среде и изменением фокуса, а также оценивать среднюю сократительную активность в кадре (поле зрения) в течение длительного времени.

Ключевые слова: сократительная активность; миобласты; миотубы; индекс сократительной активности.

Как цитировать:

Махновский П.А., Вепхвадзе Т.Ф., Попов Д.В. Метод количественной оценки сократительной активности миотуб // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 4. С. 337–346. DOI: 10.17816/gc679035 EDN: FCCW0V

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc679035>

EDN: FCCW0V

Quantitative Method for Assessing Contractile Activity of Myotubes

Pavel A. Makhnovskii, Tatiana F. Vepkhvadze, Daniil V. Popov

Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Myotubes are multinucleated terminally differentiated cells widely used to study changes induced by muscle contractile activity, metabolic disorders, and myopathies. The ability to contract is a key indicator of muscle cell maturity; therefore, quantitative assessment of this property is essential for evaluating the degree of myotube differentiation. Existing methods for assessing evoked contractile activity of myotubes have several limitations, including short analyzed recording intervals and the inability to distinguish true cellular activity from artifacts.

AIM: This study aimed to develop a method for quantitative evaluation of evoked myotube contractile activity that accounts for contraction–relaxation cycles and artifact effects and enables analysis of dozens of contraction–relaxation events.

METHODS: C2C12 myotubes on days 9–11 of differentiation were electrically stimulated for 1 hour using sequential bipolar rectangular pulses with 2 ms duration (45 Hz, 1.7 mA per well) for 300 ms, followed by 700 ms of rest. Contractile activity was recorded on video (40 s at the beginning and end of each session) and quantified using existing methods based on the assessment of displacement within an image region or pixel intensity variation, as well as a newly developed method based on calculating the mean standard deviation of pixel intensity within a moving window.

RESULTS: The proposed method reduced artifact influence (focus drift and particle movement in the medium) on the myotube contractile activity index by an order of magnitude compared with existing approaches, and decreased the coefficient of variation between technical replicates twofold. Extending the analyzed recording duration (to 40 seconds) further reduced variability (by 1.4–2.3 times) compared with shorter video recordings. The Python implementation of the method is available in open access (<https://github.com/maxpauel/movindex>).

CONCLUSION: This study proposes a quantitative method for evaluating evoked myotube contractile activity, which enables effective elimination of artifacts associated with particle motion in the culture medium and focus instability, as well as assessment of the mean contractile activity within the imaging frame (field of view) over an extended period of time.

Keywords: contractile activity; myoblasts; myotubes; contractile activity index.

To cite this article:

Makhnovskii PA, Vepkhvadze TF, Popov DV. Quantitative Method for Assessing Contractile Activity of Myotubes. *Genes & cells*. 2025;20(4):337–346. DOI: 10.17816/gc679035 EDN: FCCW0V

ОБОСНОВАНИЕ

Культура миобластов (миотуб) является популярной моделью для исследования молекулярных механизмов миогенеза и дифференцировки мышечных клеток, а также нарушений, возникающих в скелетной мускулатуре при метаболических заболеваниях (ожирение и сахарный диабет 2-го типа) и миопатиях, а также для изучения механизмов адаптации скелетной мышцы к сократительной активности. В большинстве этих исследований применяются миотубы — многоядерные терминально дифференцированные клетки, поэтому повышенное внимание уделяется оценке степени их дифференцировки. Для этого используют цитологические показатели (количество ядер на клетку, диаметр и индекс слияния миотуб), экспрессию некоторых саркомерных белков и метаболические характеристики миотуб (скорость дыхания и потребления глюкозы). Важно отметить, что основная функция зрелой мышечной клетки — это сокращение. Поэтому оценка способности миотуб к сокращению (например, вызванному с помощью электрического тока) — это ключевой показатель, характеризующий степень их дифференцировки. Интересно, что многие исследователи отмечают: многоядерные миотубы (особенно полученные из первичных миобластов) не всегда способны сокращаться в ответ на электростимуляцию [1–4], что указывает на недостаточную степень их дифференцировки и подчёркивает важность корректной оценки этого показателя.

Вызванную сократительную активность миотуб оценивают с помощью экспертной оценки видеозаписей [5] и количественно, по скорости смещения одной или нескольких миотуб, которая отражает амплитуду их сокращений. Этот показатель определяют с помощью специальных проприетарных программ для анализа движений [6]; программ, входящих в программное обеспечение микроскопов [7, 8]; или пакетов для языков python [5, 9] и MATLAB [10, 11]. Оценка смещения даёт возможность определить динамику сократительной активности и проанализировать фазы сокращения и релаксации отдельных миотуб, но не позволяет количественно охарактеризовать их сократительную активность в поле наблюдения в совокупности.

Альтернативный показатель количественной оценки вызванной сократительной активности миотуб — это индекс движения, отражающий амплитуду сокращений и долю сокращающихся клеток в кадре. Для этого анализируют изменение яркости каждого пикселя на нескольких последовательных кадрах [1] или максимальную разность яркости для четырёх последовательных кадров [12] и затем находят среднее значение этих показателей для всех пикселей. Нужно отметить, что в вышеуказанных работах для расчёта индекса движения (индекса сократительной активности) миотуб использовали интервал между кадрами меньший, чем период их вызванного сокращения. В других работах для решения этой проблемы

анализировали кадры, соответствующие сокращению и релаксации миотуб, и находили разницу яркости каждого пикселя между соседними кадрами, а не относительно начального кадра [13, 14]. Стоит также отметить, что в этих исследованиях анализировали видеозаписи длительностью только несколько кадров/секунд, что ограничивает интерпретацию полученных данных. Более того, описанные подходы оценивают усреднённый индекс движения по всему кадру, что не позволяет учитывать неоднородность сократительной активности между различными клетками. Кроме того, подходы, используемые для оценки вызванной сократительной активности миотуб, не могут разделить сигналы, ассоциированные с сокращающимися клетками, от сигналов, ассоциированных с артефактами (например, движение каких-либо частиц в культуральной среде, нарушение фокусного расстояния, искажения на краях кадра и т. п.).

ЦЕЛЬ

Цель исследования — разработать метод количественной оценки вызванной сократительной активности миотуб, учитывающий период их сокращения-расслабления и влияние артефактов, а также не позволяющий анализировать десятки циклов сокращения-расслабления.

МЕТОДЫ

Культивирование клеток и дифференцировка

В эксперименте использовали миотубы, полученные из мышечных миобластов клеточной линии C2C12 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Россия). Миобласты быстро размораживали и помещали в 10 мл среды DMEM High Glucose без сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и затем центрифугировали 10 мин при 400 g и 20 °C. Осадок ресуспендировали в ростовой среде, содержащей DMEM High Glucose с 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и 1% L-глутамин (BioninLabs, Россия), и рассеивали в 6-луночные планшеты (Eppendorf, Германия) с плотностью 65 тыс. клеток на лунку. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе MCO-170 AIC-PE (Panasonic, Япония) при 37 °C и 5% CO₂. При достижении конfluence 90% клетки переводили на дифференцировочную среду, содержащую DMEM High Glucose с 2% лошадиной сывороткой (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) и 1% L-глутамин.

Электростимуляция миотуб

Электростимуляцию начинали на 5-е сутки дифференцировки и проводили в течение 6 сут. Клетки стимулировали 1 раз в сутки в течение 1 ч, в режиме, имитирующем естественную ритмическую сократительную активность мышц (например, при локомоциях): стимуляция 300 мс (последовательные биполярные прямоугольные импульсы

длительностью 2 мс; 45 Гц, 1,7 мА на лунку 6-луночного планшета) и покой 700 мс. Культуральную среду меняли до и после каждой электростимуляции. Сократительную активность записывали на видео на 9, 10 и 11-е сутки дифференцировки в начале и в конце часовой сессии электростимуляции.

Для электростимуляции использовали установку, разработанную в лаборатории физиологии мышечной деятельности Государственного научного центра Российской Федерации — Института медико-биологических проблем Российской академии наук и состоящую из источника постоянного тока GPR-6030D (GW Instek, Тайвань) и формирователя импульсов собственной разработки. Для управления установкой и задания протокола стимуляции использовали программу, разработанную в нашей лаборатории (язык Delphi). Регистрацию и контроль величины тока осуществляли с помощью аналогово-цифрового преобразователя E-440 (L-Card, Россия) и программы PowerGraph («Дискофт», Россия). Для электростимуляции миотуб использовали самодельный электрод, состоящий из графитовых пластин шириной 17 мм и толщиной 3 мм, смонтированных на покрытой биологически инертным лаком печатной плате («Резонит», Россия). Этот электрод позволяет стимулировать половину лунок в стандартном 6-луночном планшете, а другую использовать в качестве нестимулируемого контроля. Ширина графитовых пластин и размер отверстий изготовленного электрода были больше, чем в доступном коммерческом аналоге (C-Dish, IonOptix, США), что позволило увеличить количество клеток, стимулируемых в лунке, и поле для фото/видео съёмки — в 2,5 раза (приложение 1).

Видеозапись сокращений

Видео съёмку вызванной сократительной активности проводили в течение 40 с в трёх различных лунках на трёх произвольных полях зрения при увеличении 20×, используя микроскоп ZOE Cell Imager (Bio-Rad, США) и систему видеозахвата DVI2USB Solo (Epiphan Systems, Канада) с разрешением кадра 1920×1080 пикселей и частотой 7,5 Гц.

Оценка динамики и скорости сокращения при вызванной сократительной активности

Для оценки движущихся областей в кадре (в поле зрения) и скорости их движения использовали программу OpenHeartWare (<https://github.com/loslab/ohw>) [9] с настройками: ширина блока 4 пикселя, задержка 1 кадр, максимальное смещение 7 пикселей. Затем рассчитывали среднюю скорость движущихся областей.

Расчёт индекса сократительной активности миотуб при электростимуляции

Видеозаписи длительностью 40 с разбивали на кадры в формате .png с помощью программы MPlayer v. 1.4, затем матрицы яркости каждого кадра анализировали в среде программирования R (для чтения изображений

и их перевода в числовые матрицы использовали пакет 'png'; для параллельных вычислений — 'parallel'; для построения тепловых карт — 'pheatmap', 'gplots' и 'colorspace'). Индекс движения каждого пикселя рассчитывали как изменение его яркости, используя четыре разные метрики:

1) стандартное отклонение яркости пикселя для всех кадров;

$$SD = \sigma(x_i),$$

где x_i — яркость для каждого кадра;

2) средний модуль разности яркости пикселя в первом и последующих кадрах (интервал между кадрами 0,8 с) [1, 12];

$$(|x_5 - x_1| + |x_4 - x_1| + |x_3 - x_1| + |x_2 - x_1|) / 4,$$

где $x_1 \dots x_5$ — значения яркости в пяти кадрах с интервалом 0,8 с;

3) средняя разность максимального и минимального значения яркости пикселя в скользящем окне (ширина 7 кадров; шаг, соответствующий периоду сокращения-расслабления, — 7 кадров) [13, 14];

$$\frac{\sum \max(x(t-s), x(t-s-1), \dots, x(t-s-k+1)) - \min(x(t-s), x(t-s-1), \dots, x(t-s-k+1))}{t},$$

где t — индекс шага, s — размер шага ($s=7$), k — ширина окна ($k=7$), $x(t-s-i)$ — значение яркости, индекс в скобках соответствует номеру кадра;

4) среднее стандартное отклонение яркости пикселя в скользящем окне (ширина 7 кадров, шаг 7 кадров):

$$\frac{\sum \sigma(x(t-s), x(t-s-1), \dots, x(t-s-k+1))}{t},$$

где t — индекс шага, s — размер шага ($s=7$), k — ширина окна ($k=7$), $x(t-s-i)$ — значение яркости, индекс в скобках соответствует номеру кадра.

Затем для каждого метода рассчитывали индекс сократительной активности в кадре (поле зрения) как среднее значение индекса движения каждого пикселя для всех пикселей. Тепловые карты строили по стандартному отклонению яркости пикселей или усреднённому значению стандартного отклонения в скользящем окне.

Для анализа видеозаписей и расчёта индекса сократимости написана программа movindex на языке python (<https://github.com/maxpauel/movindex>). Программа включает следующие шаги: 1) обрезку краёв видео (опционально); 2) экспорт кадров видео; 3) чтение кадров в виде матриц яркости пикселей в серой шкале; 4) расчёт среднего стандартного отклонения для кадров; 5) расчёт индекса сократимости (среднего стандартного отклонения в скользящем окне с заданным размером окна и шагом окна в размерности количества кадров);

5) генерацию тепловых карт, отражающих стандартное отклонение яркости пикселей и стандартное отклонение в скользящем окне; 6) запись графика изменения яркости в зависимости от кадра для пикселя с наибольшим стандартным отклонением; 7) запись результатов в текстовый файл. Для программы movindex предусмотрена возможность параллельных вычислений (опция — количество ядер). Инструкции по установке и использованию программы описаны на странице в Github (<https://github.com/maxpauel/movindex>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что сократительная активность миотуб увеличивается во время одной сессии электростимуляции [1–3]. Поэтому в нашей работе сократительную активность миотуб регистрировали в начале и в конце каждой сессии электростимуляции; сократительную активность оценивали, используя скорость движущихся областей миотуб и индекс сократительной активности, рассчитанный четырьмя разными методами, и затем определяли вариативность этих показателей для трёх технических повторов.

Скорость движущихся областей отдельных миотуб

На каждой видеозаписи определяли движущиеся области и затем рассчитывали их среднюю скорость движения (программа OpenHeartWare) [9]. Средняя скорость движущихся областей значительно различалась (от 1,8 мкм/с до 10,8 мкм/с) между разными записями (тепловая карта и динамика средней скорости движущихся областей на рис. 1), что указывает на большую гетерогенность этого показателя не только внутри кадра, но и между записями.

Изменение яркости пикселя и коррекция артефактов

При движении объектов в кадре изменяется яркость соответствующих пикселей, что можно охарактеризовать стандартным отклонением яркости каждого пикселя за несколько кадров (и усреднённым значением по кадру).

Тепловая карта (рис. 2, а) показывает величину стандартного отклонения для каждого пикселя на 40-секундной записи: хорошо видны сокращающиеся миотубы,

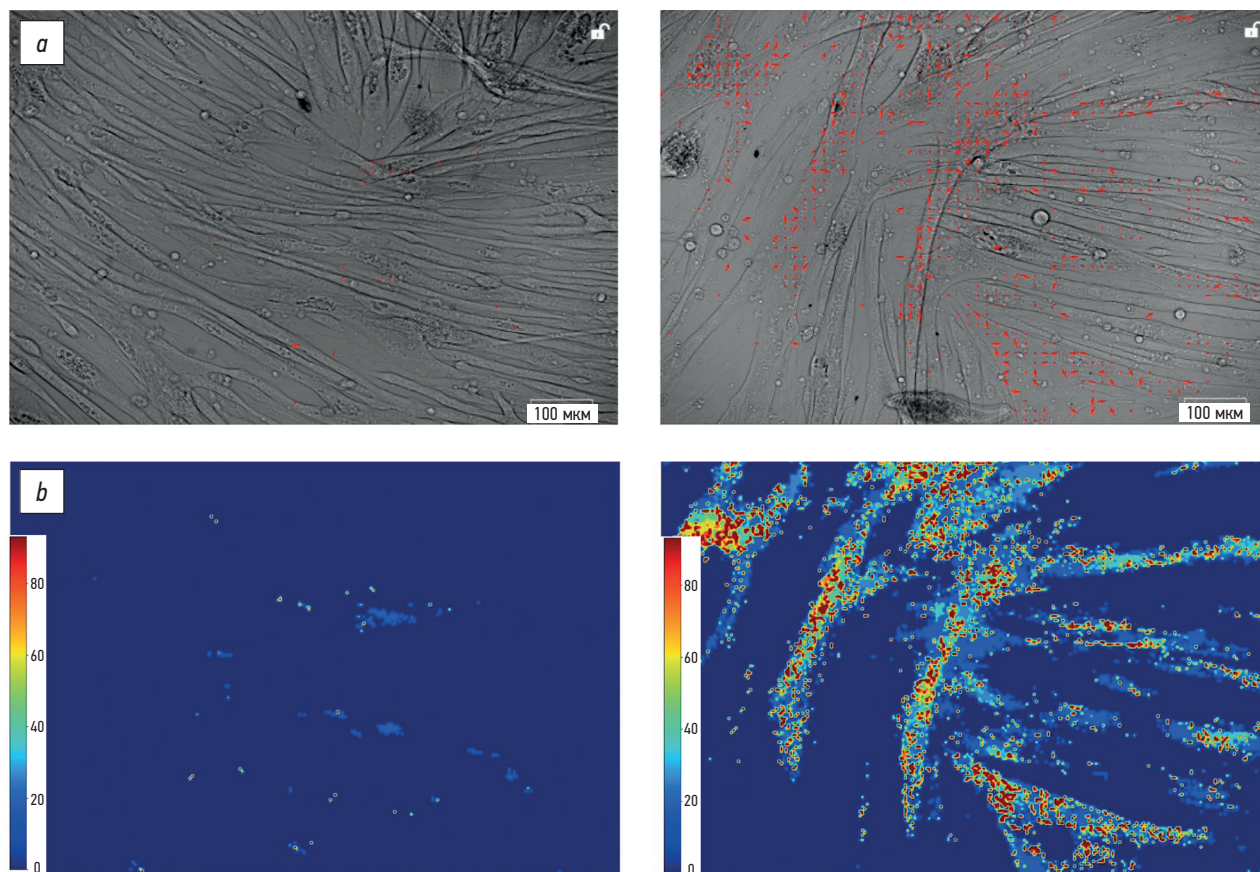


Рис. 1. Анализ движения миотуб C2C12 с низким (слева) и высоким (справа) уровнем вызванной сократительной активности (программа OpenHeartWare [9]): а — движущиеся области на кадре в момент сокращения, бар 100 мкм; б — тепловая карта скорости движущихся областей в момент сокращения; с — динамика средней скорости движущихся областей в кадре за 40 с электростимуляции.

Fig. 1. Analysis of C2C12 myotube motion with low (left) and high (right) levels of evoked contractile activity (OpenHeartWare software [9]): а, moving regions within the frame at the moment of contraction; scale bar, 100 μ m; б, heat map of the velocity of moving regions at the moment of contraction; с, changes of the mean velocity of moving regions within the frame during 40 s of electrical stimulation.

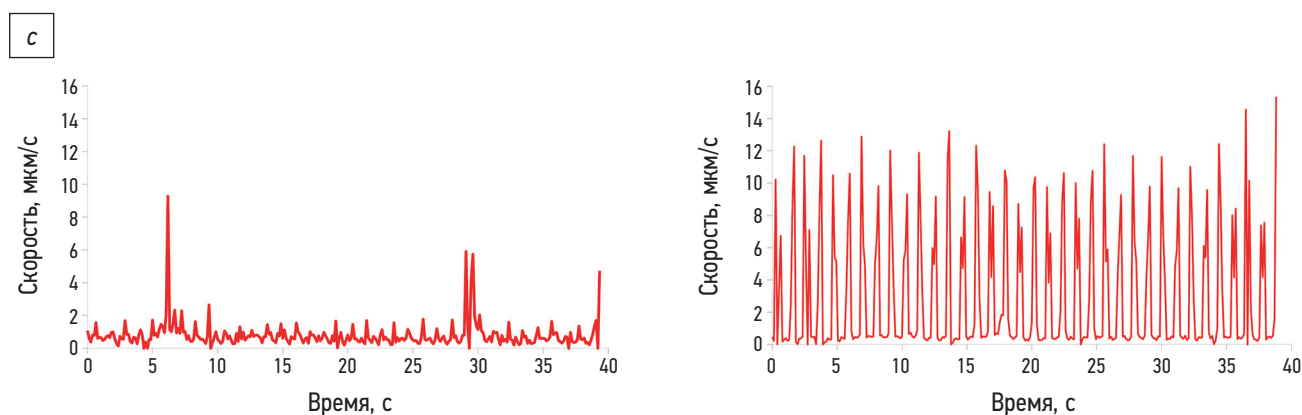


Рис. 1. Окончание.

Fig. 1. The End.

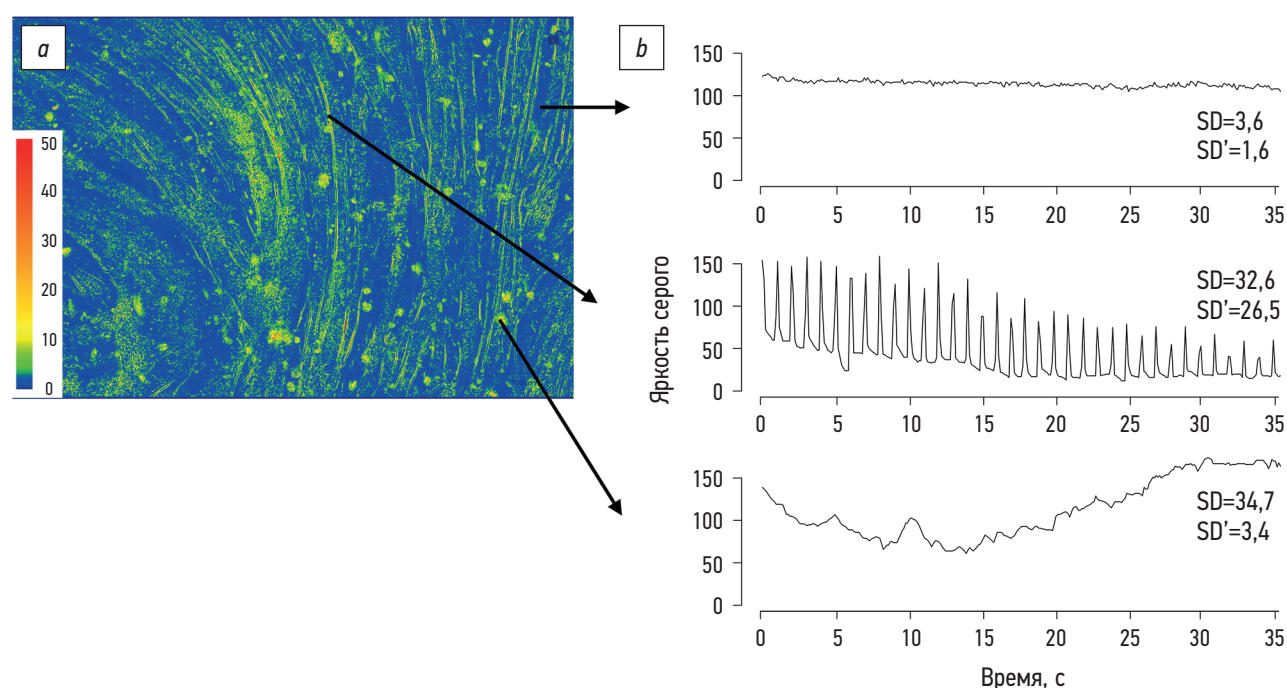


Рис. 2. Изменение яркости в кадре во время 35-секундной электростимуляции миотуб C2C12: *a* — тепловая карта стандартного отклонения яркости каждого пикселя (SD); *b* — изменение яркости трёх разных пикселей: фоновая область без сокращений (вверху); сокращающаяся миотуба (посередине); артефакт (плавающая частица), вызванный перемещением частиц в среде (внизу). Изменение яркости с помощью среднего стандартного отклонения в скользящем окне (SD') позволило значительно (на порядок) снизить влияние артефакта (сопоставление значений SD и SD').

Fig. 2. Gray-intensity variation within the frame during 35-s electrical stimulation of C2C12 myotubes: *a*, heat map of the standard deviation (SD) of each pixel's intensity; *b*, intensity changes in three different pixels: a background region without contractions (top), a contracting myotube (middle), and an artifact (floating particle) caused by particle motion in the medium (bottom). Adjustment of intensity variation using the mean standard deviation in a moving window (SD') markedly (by an order of magnitude) reduced artifact influence (comparison of SD and SD').

а также места с локальным изменением яркости, не связанным с сокращением клеток. Эти артефакты вызваны движением частиц (части открепившихся клеток) в среде (плавное без осцилляций изменение яркости во времени; рис. 2, *b*) или изменением фокуса (резкое изменение яркости; данные не показаны).

С целью коррекции артефактов рассчитывали стандартное отклонение для каждого пикселя в скользящем окне (7 кадров, приблизительно 1 цикл сокращения) и затем — среднее значение стандартного отклонения

для всех окон (т. е. для всей записи). Это позволило на порядок снизить стандартное отклонение для пикселей от артефактов, достигнув величины, характерной для несокращающегося фона. При этом снижение данного показателя для пикселей от сокращающейся миотубы было незначительным (см. рис. 2, *b*). На рис. 3 представлены примеры коррекции вклада артефактов (изменения фокуса и движения частиц в среде) в оценку изменения яркости пикселей с помощью среднего стандартного отклонения в скользящем окне.

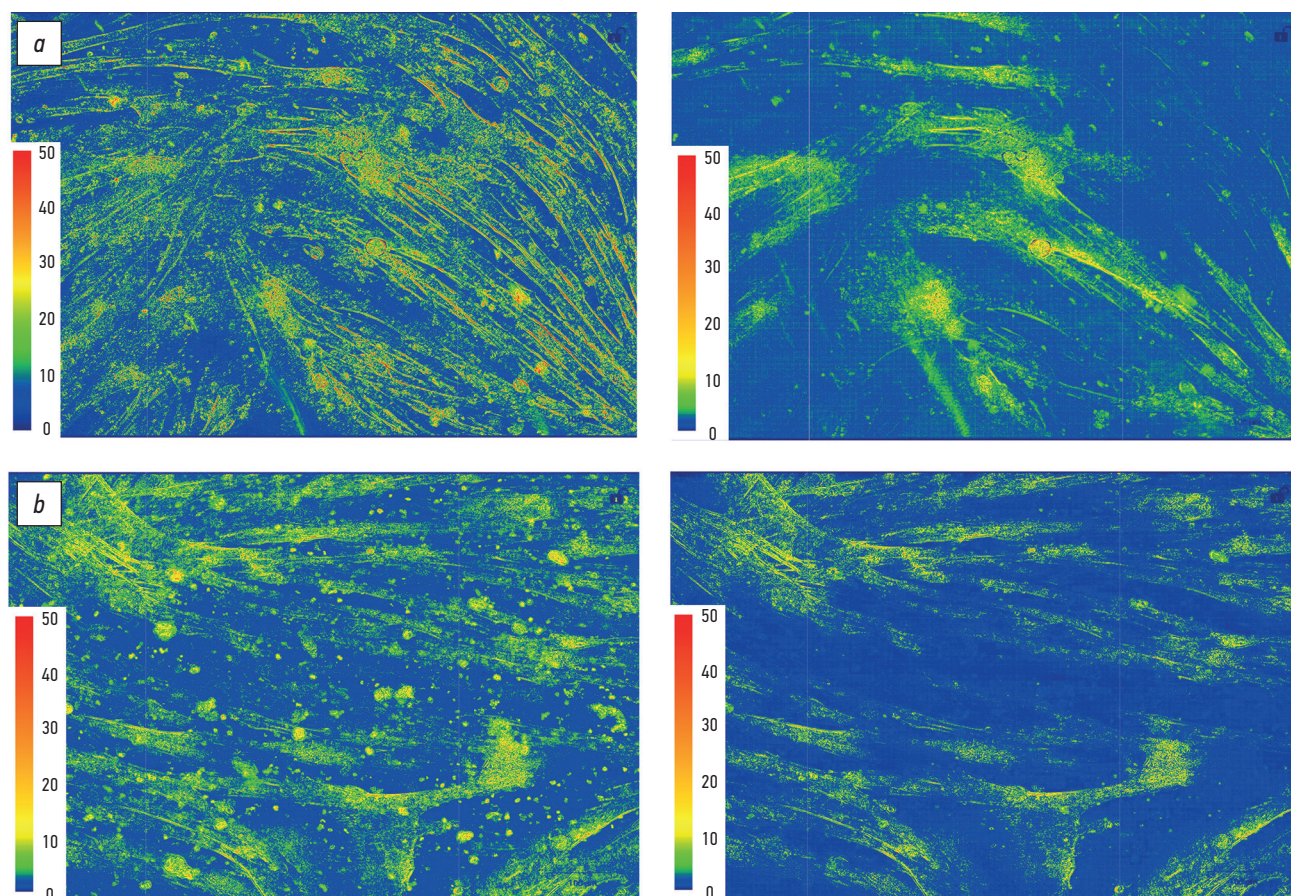


Рис. 3. Коррекция влияния артефактов при оценке изменения яркости пикселей (маркёр движения) во время 40-секундной электростимуляции миотуб C2C12. Тепловая карта показывает стандартное отклонение яркости каждого пикселя (слева) и среднее стандартное отклонение каждого пикселя в скользящих окнах (справа): *a* — до коррекции часть краёв клеток и фона демонстрируют завышенные значения изменения яркости, связанные с изменением фокуса камеры; *b* — коррекция позволила убрать большинство артефактов, связанных с движением частиц в среде.

Fig. 3. Correction of artifact influence during the evaluation of pixel intensity variation (motion marker) in 40-s electrical stimulation of C2C12 myotubes. The heat map shows the standard deviation of each pixel's intensity (left) and the mean standard deviation within moving windows (right): *a*, before correction, some cell edges and background areas displayed overestimated intensity variation due to focus shifts; *b*, correction eliminated most artifacts associated with particle movement in the medium.

Сравнение индекса сократительной активности, рассчитанного разными способами

Среднее изменение яркости пикселей в кадре широко используют для расчёта индекса сократительной активности миотуб.

Индекс сократительной активности был рассчитан четырьмя методами для полных видеозаписей продолжительностью 40 с, которые были подробно описаны выше (см. «Методы»): стандартное отклонение яркости пикселя для всех кадров, средний модуль разности яркости пикселя в первом и последующих кадрах [1], средняя разность максимального и минимального значения яркости пикселя в скользящем окне [13] и среднее стандартное отклонение в скользящем окне (предложенный нами метод). Все методы выявили рост сократительной активности (индекса сократительной активности) после 1 ч электростимуляции, что является ожидаемым результатом эксперимента и косвенно подтверждает их корректную работу (рис. 4, *a–d*). Однако наиболее высокий коэффициент

вариации индекса сократительной активности между техническими повторами был у первых двух методов, что может отражать совокупный вклад сократительной активности и артефактов (см. рис. 4, *a–b*). Напротив, методы, учитывающие вклад артефактов, демонстрировали наименьшую вариабельность и схожую динамику индекса сократительной активности (см. рис. 4, *c–d*).

Используя предложенный нами метод, учитывающий влияние артефактов, мы показали, что вариативность индекса сократительной активности различается в 1,5 раза в разных коротких 5-секундных видеозаписях; при использовании 40-секундной видеозаписи вариативность оказалась снижена в 1,4–2,3 раза относительно коротких видеозаписей (рис. 4, *e*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки сократительной активности миотуб, вызванной электростимуляцией, используют различные подходы. Традиционные методы, такие как расчёт стандартного

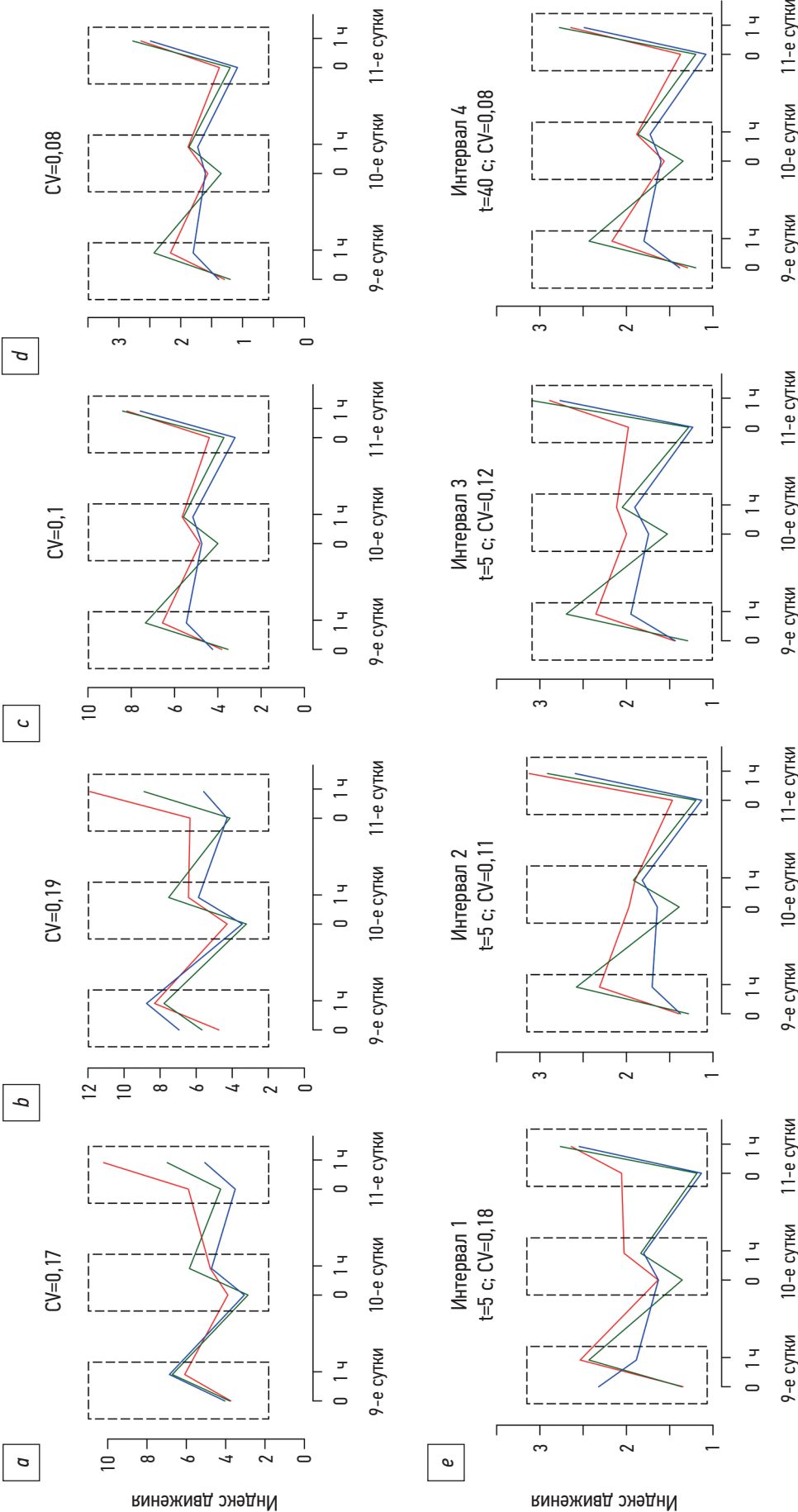


Рис. 4. Индекс сократительной активности миотуб C2C12 в начале и через 1 ч электростимуляции на 9–11-е сутки дифференцировки: *a–d* — индекс сократительной активности миотуб, рассчитанный разными методами (см. «Методы») во время 40-секундной электростимуляции; *a* — среднее стандартное отклонение яркости; *b* — средняя разность (модуль) яркости при попарном сравнении с референсным кадром [1, 12]; *c* — среднее изменение яркости между локальными экстремумами [13, 14]; *d* — метод, предложенный в нашем исследовании, среднее стандартное отклонение в скользящем окне; *e* — индекс движения миотуб, рассчитанный с помощью среднего стандартного отклонения в скользящем окне (SD); метод, предложенный авторами: 5-секундные интервалы, взятые из одной записи, дают высокую вариативность индекса сократительной активности миотуб; увеличение длительности интервала до 40 с снижает вариативность. Приведён коэффициент вариации (CV) для трёх технических повторов.

Fig. 4. Contractile activity index of C2C12 myotubes at the beginning and after 1 h of electrical stimulation on days 9–11 of differentiation: *a–d*, myotube contractile activity index calculated by different methods (see Methods) during 40-s electrical stimulation: *a*, mean absolute difference in intensity compared with a reference frame [1, 12]; *b*, mean intensity change between local extrema [13, 14]; *c*, method proposed in this study—mean standard deviation within a moving window; *d*, method proposed by the authors: 5-s intervals taken from the same recording yielded high variability of the contractile activity index, whereas extending the interval to 40 s reduced variability. The coefficient of variation (CV) is provided for three technical replicates.

отклонения яркости пикселя по всем кадрам или среднего модуля разности между первым и каждым последующим кадром [1], обладают рядом существенных недостатков. Эти подходы основаны на попарном сравнении кадров с начальным (референсным) кадром, что делает их чрезвычайно чувствительными к артефактам, таким как постепенный уход или смещение фокуса, дрейф плавающих частиц. Подходы на основе сравнения локальных экстремумов яркости [13, 14] при этом более предпочтительны, но также применяются к ограниченному количеству кадров (либо коротким фрагментам видео), что в сочетании с чувствительностью к артефактам приводит к увеличению вариативности результатов. Важно отметить, что эти методики не реализованы в виде удобного, готового к использованию свободного программного обеспечения, и это затрудняет их использование, сравнение результатов между исследованиями и широкое применение.

Альтернативным направлением являются методы, основанные на компьютерном зрении, такие как программа OpenHeartWare, которая выявляет движущиеся области и рассчитывает их скорость. Данный подход более пригоден для анализа сокращений отдельных, хорошо структурированных волокон, позволяя характеризовать скорость их сокращения и её динамику для отдельных зон в поле зрения (см. рис. 1). Однако его применение для монослоя миотуб имеет ограничения. Программа имеет множество настроек (размер анализируемых блоков, пороговые значения смещения, применение различных алгоритмов фильтрации и т. д.), что не позволяет напрямую сравнивать результаты, полученные в разных исследованиях. Наконец, ключевой недостаток заключается в том, что метод не учитывает и не отделяет вклад артефактов движения (например, дрейф частиц) от истинного сокращения миотуб, и это может приводить к значительным погрешностям. Находящееся в свободном доступе программное обеспечение в данной области ограничено практически одной этой программой.

Основной проблемой при оценке вызванной сократительной активности миотуб остаётся наличие артефактов движения. Предложенный нами подход для расчёта индекса сократительной активности, использующий среднее стандартное отклонение яркости в скользящем окне, позволил значительно подавить сигнал, исходящий от артефактов, и сохранить сигнал от сокращающихся миотуб (см. рис. 3 и рис. 4, *a–d*), что подтверждается минимальной вариативностью между повторностями по сравнению с другими методами. Результаты нашего исследования показывают, что сократительная активность стимулируемых миотуб может изменяться во времени (см. рис. 1 и 2). Поэтому оценка на основании анализа коротких фрагментов или нескольких кадров [1, 12, 13] может давать невоспроизводимые результаты. Увеличение длительности анализируемых записей (от 5 до 40 с) закономерно привело к снижению вариативности показателя в технических повторях (см. рис. 4, *e*).

Для удобного анализа с использованием предложенного метода мы разработали программу movindex (<https://github.com/maxpauel/movindex>). Это единственная на сегодняшний день программа с открытым кодом, которая включает все этапы обработки видео — от загрузки файла до оценки и визуализации сократительной активности. Программа оптимизирована для работы с большими массивами данных: поддерживает использование множества вычислительных ядер, не требует большого объёма оперативной памяти при поэтапной загрузке матриц пикселей и отличается высокой скоростью работы. Пользователь может задавать размер скользящего окна, который подбирается в соответствии с периодом сокращения клеток и частотой кадра видеозаписи, что критически важно для подавления артефактов (размер окна не должен превышать период сокращения). Реализована возможность обрезки кадра, что актуально при анализе записей, сделанных с захватом экрана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложен количественный метод оценки вызванной сократительной активности миотуб. Метод позволяет оценивать среднюю сократительную активность в кадре (поле зрения) в течение длительного времени, что необходимо для снижения вариативности, и эффективно удалять артефакты, связанные с движением частиц в культуральной среде и изменением фокуса. Программа movindex для анализа сократительной активности (<https://github.com/maxpauel/movindex>) выложена в открытом доступе.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. П.А. Махновский — обработка видеозаписей, разработка скриптов, обзор литературы, написание рукописи и её редактирование; Т.Ф. Вепхвадзе — проведение клеточных экспериментов, получение видеоданных; Д.В. Попов — организация и концепция исследования, внесение существенных правок в рукопись, интерпретация результатов. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Неприменимо.

Согласие на публикацию. Неприменимо.

Источники финансирования. Исследование проведено с использованием денежных средств программы фундаментальных научных исследований ГНЦ РФ — ИМБП РАН (тема FMFR-2024-0032).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье и в приложении к ней.



Приложение 1. Особенности электрода, использованного в работе. DOI: 10.17816/gc679035-4325796
Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали один внешний рецензент, два члена редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution: P.A. Makhnovskii: software, data curation, writing—original draft, writing—review & editing; T.F. Vepkhvadze: investigation, data curation; D.V. Popov: conceptualization, supervision, writing—review & editing. All authors approved the manuscript (version for publication) and agreed to take responsibility for all aspects of the work, ensuring the proper consideration and resolution of any issues related to the accuracy and integrity of any part of the study.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

Funding sources: The study was conducted with financial support from the Fundamental Research Program of the State Scientific Center of the Russian Federation, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences (project FMFR-2024-0032).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this article.

Data availability statement: All data obtained in this study are available in this article and its supplementary material.



Supplement 1. Features of the electrode used in this study. DOI: 10.17816/gc679035-4325796

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved one external reviewer, two members of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Fujita H, Nedachi T, Kanzaki M. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in c2c12 myotubes. *Exp Cell Res*. 2007;313(9):1853–1865. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.002 EDN: LRNWIX
2. Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(5):E1191–E204. doi: 10.1152/ajpendo.90280.2008
3. Lambernd S, Taube A, Schober A, et al. Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia*. 2012;55(4):1128–1139. doi: 10.1007/s00125-012-2454-z EDN: URSVCW
4. Ferrari MB, Podugu S, Eskew JD. Assembling the myofibril: coordinating contractile cable construction with calcium. *Cell Biochem Biophys*. 2006;45(3):317–337. doi: 10.1385/CBB:45:3:317 EDN: MFMQIV
5. Dreher SI, Grubba P, von Toerne C, et al. IGF1 promotes human myotube differentiation toward a mature metabolic and contractile phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2024;326(5):C1462–C1481. doi: 10.1152/ajpcell.00654.2023 EDN: FVPJMA
6. Murata A, Akiyama H, Honda H, Shimizu K. Electrical pulse stimulation-induced tetanic exercise simulation increases the secretion of extracellular vesicles from C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;672:177–184. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.06.054 EDN: IKJNJU
7. Manabe Y, Miyatake S, Takagi M, et al. Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. *PLoS One*. 2012;7(12):e52592. doi: 10.1371/journal.pone.0052592
8. Arifuzzaman M, Ito A, Ikeda K, et al. Fabricating muscle-neuron constructs with improved contractile force generation. *Tissue Eng Part A*. Apr 2019;25(7-8):563–574. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0165
9. Schneider O, Zeifang L, Fuchs S, et al. User-friendly and parallelized generation of human induced pluripotent stem cell-derived microtissues in a centrifugal heart-on-a-chip. *Tissue Eng Part A*. 2019;25(9-10):786–798. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0002
10. Hennig K, Hardman D, Barata DM, et al. Generating fast-twitch myotubes in vitro with an optogenetic-based, quantitative contractility assay. *Life Sci Alliance*. 2023;6(10):e202302227. doi: 10.26508/lsa.202302227 EDN: VVMVUU
11. Bajaj P, Reddy B Jr, Millet L, et al. Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(9):897–909. doi: 10.1039/c1ib00058f
12. Baryshyan AL, Woods W, Trimmer BA, Kaplan DL. Isolation and maintenance-free culture of contractile myotubes from *Manduca sexta* embryos. *PLoS One*. 2012;7(2):e31598. doi: 10.1371/journal.pone.0031598 EDN: XZAXWF
13. Chen W, Nyasha MR, Koide M, et al. In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes. *Sci Rep*. 2019;9(1):11914. doi: 10.1038/s41598-019-48316-9 EDN: VTEBSZ
14. Li Y, Chen W, Ogawa K, et al. Feeder-supported in vitro exercise model using human satellite cells from patients with sporadic inclusion body myositis. *Sci Rep*. 2022;12(1):1082. doi: 10.1038/s41598-022-05029-w EDN: ERAYSX

ОБ АВТОРАХ

* **Махновский Павел Александрович**, канд. биол. наук;
 адрес: Россия, 123007, Москва, Хорошевское ш., д. 76а;
 ORCID: 0000-0002-3934-6514;
 eLibrary SPIN: 6720-5905;
 e-mail: maxpauel@gmail.com

Вепхвдзе (Миллер) Татьяна Федоровна, канд. биол. наук;
 ORCID: 0000-0002-7352-8469;
 eLibrary SPIN: 1411-7760;
 e-mail: anegina13@gmail.com

Попов Даниил Викторович, д-р биол. наук;
 ORCID: 0000-0002-3981-244X;
 eLibrary SPIN: 3148-2905;
 e-mail: danil-popov@yandex.ru

AUTHORS' INFO

* **Pavel A. Makhnovskii**, Cand. Sci. (Biology);
 address: 76a Khoroshevskoe hwy, Moscow, Russia, 123007;
 ORCID: 0000-0002-3934-6514;
 eLibrary SPIN: 6720-5905;
 e-mail: maxpauel@gmail.com

Tatiana F. Vepkhvadze (Miller), Cand. Sci. (Biology);
 ORCID: 0000-0002-7352-8469;
 eLibrary SPIN: 1411-7760;
 e-mail: anegina13@gmail.com

Daniil V. Popov, Dr. Sci. (Biology);
 ORCID: 0000-0002-3981-244X;
 eLibrary SPIN: 3148-2905;
 e-mail: danil-popov@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author