

3. Tariq Rashid Make Your Own Neural Network / Северный Чарльстон, Южная Каролина (США): CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016. – 173с.
4. edurobots.ru [Электронный ресурс]. URL: <http://edurobots.ru/raspberry-pi-dlya-nachinayushhix/>. (дата обращения: 17.12.2018).
5. edurobots.ru [Электронный ресурс]. URL: <http://amperka.ru/page/what-is-arduino>. (дата обращения: 17.12.2018).
6. David Kriesel A Brief Introduction to Neural Networks / Северный Чарльстон, Южная Каролина (США): CreateSpace Independent Publishing Platform, 2016. – 244 с.

КОМПЬЮТЕРНАЯ ВИДЕОМИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ЭКОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ COMPUTER VIDEO MICROSCOPY FOR ECOLOGY AND MEDICINE

С. Е. Дромашко^{1,2}, О. В. Квитко², Я. И. Шейко³
S. Dromashko^{1,2}, O. Kvitko², Ya. Sheiko³

¹*Институт подготовки научных кадров Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь*

²*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь*

³*Институт рыбного хозяйства НПЦ Национальной академии наук Беларуси по животноводству,
г. Минск, Республика Беларусь
S.Dromashko@igc.by*

¹*Graduate School of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

³*Fish Industry Institute of the Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus
on Animal Husbandry, Minsk, Republic of Belarus*

Надежное тестирование воздействия различных природных и синтетических веществ на клетки имеет решающее значение для поиска эффективных ингибирующих или стимулирующих агентов. Такая работа необходима для открытия противоопухолевых препаратов и проверки токсичности вновь синтезированных соединений. Мы используем компьютерный видеокomплекс «Цитомир», предназначенный для покадровой видеомикроскопии живых клеток. Метод позволяет подсчитывать количество клеток в динамике и получать статистически достоверные количественные данные, используя минимальное количество культуральных флаконов для культивирования. Разработана неинвазивная технология получения и анализа клеток волосяного фолликула и мочи, пригодная для использования в области регенеративной медицины. Создана также математическая модель для описания поведения линии immortalized mouse fibroblastов мыши, сходного с метастазированием раковых опухолей.

Reliable testing of effects of various natural and synthetic substances on cells is critical in searching for effective inhibitory or stimulating agents. Such work is essential in the discovery of anticancer drugs and testing toxicity of newly synthesized compounds. We use the TSITOMIR computer video complex, which is intended for time-lapse video microscopy of living cells. We developed a non-invasive technology for receiving and analysing cells from human hair follicle and urine, suitable for use in research for regenerative medicine. The method allows to obtain cell numbers in dynamics and makes it possible to get statistically valid quantitative data by using a minimal number of culture flasks. We also developed a mathematical model to describe the behavior of the immortalized mouse fibroblast line, similar to the metastasis of cancer tumors.

Ключевые слова: долговременная видеомикроскопия, тестирование природных и химических субстанций, старение, онкотрансформация, регенеративная медицина, математическое моделирование.

Keywords: time-laps videomicroscopy, testing of natural and chemical substances, ageing, oncotransformation, regenerative medicine, mathematical modelling.

Компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур является перспективным методом исследования ряда фундаментальных процессов и разработки клеточных технологий в медицине, сельском хозяйстве и охране окружающей среды. Как правило, большинство работ с использованием видеомикроскопии живых клеток базируется на методе конфокальной микроскопии. Впервые концепция этого подхода была разработана в середине 1950-х гг. аспирантом Гарвардского университета Марвином Мински [1]. Однако широкий интерес к этой технологии проявился только в последние десятилетия в связи с развитием компьютерных и цифровых технологий, которые позволяют фотографировать или делать видеозаписи изучаемых объектов. Минусом этого подхода яв-

ляется то, что используемые в конфокальной микроскопии люминесцентные красители не позволяют проводить длительное (многодневное) исследование клеточных культур. В лаборатории моделирования генетических процессов Института генетики и цитологии НАН Беларуси разработаны оборудование и технология долговременной компьютерной видеомикроскопии живых клеток. В рамках государственной научно-технической программы «Эталонные и научные приборы» в содружестве с ОАО «ОптоЭлектронные Системы» ГНПО «Планар» и Институтом тепло- и массообмена НАН Беларуси создан автоматизированный видеокomплекс «Цитомир», с помощью которого проведен ряд перспективных исследований фундаментального и прикладного характера [2].

Этот видеокomплекс состоит из инвертированного микроскопа МИ-1 с термостатируемой камерой (производства «Планар»), системы терморегуляции и видеосистемы [3]. Микроскоп оснащен моторизированным предметным столиком, что позволяет просматривать с помощью джойстика ростовую поверхность и выбирать интересующие исследователя участки. Координаты выбранных участков заносятся в память компьютера, что дает возможность автоматически фотографировать их через определенные промежутки времени. Существуют также режимы автоматического сканирования стандартных 48 и 96 луночных планшетов без предварительного ручного выбора участков. Это позволяет быстро получать снимки всех лунок планшета или, в случае длительных экспериментов, автоматически фотографировать все лунки планшета через определенные промежутки времени. Длительное культивирование клеток обеспечивается термостатируемой камерой видеокomплекса. Определенный газовый состав в атмосфере культурального сосуда создается по оригинальной методике, разработанной в нашей лаборатории. Таким образом, с помощью видеокomплекса «Цитомир» возможно наблюдать изменения в нескольких десятках ячеек ростовой поверхности (в каждой ячейке могут быть разные средовые условия, например, различная концентрация какого-либо тестируемого вещества), что позволяет использовать его для оценки действий на клетки токсических веществ, негативно влияющих на человека или окружающую среду. В настоящее время максимально можно одновременно исследовать или действие одной субстанции на 96 различных культур, или эффекты 96 веществ на одной культуре.

С использованием долговременной компьютерной видеомикроскопии на модели фибробластов мыши и человека мы исследовали процессы старения и связанной с этим онкотрансформации. Было показано, что вопреки ранним исследованиям на фиксированных культурах, два различных типа клеток – парусовидные и веретенообразные – являются разными стадиями эволюции одной и той же клетки. В целом анализ видеозаписей, полученных с помощью видеокomплекса, показал, что клетки культуры фибробластов из обоих источников двигались довольно активно и неоднократно меняли свою форму. Наблюдалась также значительная неоднородность клеток по размеру и форме. Как правило, форма может меняться несколько раз в течение всего срока жизни клетки (округлая, парусовидная, веретенообразная и различные промежуточные формы). При этом фибробласты мыши до 80 % жизненного цикла клетки пребывали в парусовидной стадии, которая склонна раковой трансформации, тогда как фибробласты человека в основном находятся в веретенообразной форме. Поскольку длительность пребывания в каждой из этих стадий у клеток фибробластов человека и мыши различны, это может объяснить существенное (до 1 млн раз в пересчете на клеточную генерацию) превышение вероятности раковой трансформации у мыши по сравнению с человеком.

Мы также неоднократно выделяли иммортализованные (бессмертные) линии фибробластов мыши и человека. При исследовании свойств такой линии фибробластов мыши были получены результаты, которые сложно трактовать однозначно с практической точки зрения. Если к культуре обычных фибробластов человека добавить культуральную среду с выделениями фибробластов мыши, можно наблюдать ее ускоренное размножение. Этот эффект демонстрирует табл. 1, где звездочкой * отмечен момент добавление культуральной среды. С одной стороны, это явление может быть использовано в регенеративной медицине для ускорения заживления ран. С другой стороны, однако, существует опасность стимулирования раковой трансформации клеток.

Таблица 1 – Стимуляция пролиферации фибробластов человека иммортализованными клетками мыши

Время (сутки)	2	6	9	13*	20	24	30	38	45	52	59	64
Количество клеток в контроле	857	831	658	565	602	470	465	410	314	167	191	203
Количество клеток в опыте	780	836	644	654	702	854	1453	1800	2864	5666	9400	12 145

Еще одно из направлений работы – использование видеокomплекса «Цитомир» для разработки технологии неинвазивного (нетравматичного) получения и анализа мезенхимальных клеток для обеспечения задач регенеративной медицины.

Методология исследования включала: (а) получения мезенхимальных клеточных культур из волосных фолликулов и урины человека; (б) анализ клеточных культур методами компьютерной видеомикроскопии, включая учет событий пролиферации, апоптоза, эпигенетической пластичности (дифференцировки) и необратимой (раковой) трансформации; (в) оценку экспрессии гена белковой субъединицы теломеразы *hTERT* для оптимизации условий культивирования клеточных культур, обеспечивающих наработку клеточной массы и недопущение событий, ведущих к раковому перерождению клеток.

Нами изучена возможность неинвазивного получения клеток человека из волосяных фолликулов и урины, их размножения методом культивирования клеток, выполнен анализ их пролиферации с помощью компьютерной видеомикроскопии. В ходе экспериментальных исследований установлено, что первичная культура клеток из фолликулов волос нуждается в добавлении митогена FGF для стимуляции пролиферации. Показано, что использование для модифицирования дна сосуда для культивирования клеток матригеля обеспечивает прикрепление фолликулов и частично освобожденных клеток к поверхности культурального сосуда. Выявлена обратная зависимость выхода жизнеспособных клеток от времени экспозиции фолликулов волос в растворе трипсина после 1 мин. обработки. При исследовании полученных клеточных культур мы наблюдали следующий эффект: если линия клеток из фолликулов волос человека предварительно выдерживалась при более низкой температуре (обычно 30 °С по сравнению со стандартными 37 °С), после инициации индуцированной дифференцировки такие клетки начинают развиваться по нейрональному пути, формируя структуры типа аксонов.

Нами установлено также, что наиболее подходящим материалом для получения жизнеспособных клеток из урины человека является урина беременных женщин. Выявлено, что наиболее эффективным способом предотвращения бактериального заражения полученных из урины клеток является метод многократной промывки биоматериала средой RPMI без антибиотиков, поскольку антибиотики сильно влияли на жизнеспособность выделенных клеток. Установлена эффективность использования жидкости из фолликулов яичников коров при получении первичных культур клеток и пролонгирования их роста. Показана перспективность интенсификации исследования за счет параллельной (одновременной) видеозаписи многих участков клеточной культуры с помощью компьютерного видеокomплекса «Цитомир». Кроме того, его использование позволяет отбраковывать опыты, в которых были получены живые, но не способные к размножению клетки. С другой стороны именно применение видеокomплекса «Цитомир» доказало, что размножающиеся клетки из урины не являются бессмертными, склонными к неконтролируемому размножению и, следовательно, пригодны для целей регенеративной медицины (табл. 2).

Таблица 2 – Динамика роста популяции клеток, полученных из урины человека

	1 участок, клетки	2 участок, клетки	3 участок, клетки	4 участок, клетки	5 участок, клетки
1-е сутки	2	18	1	3	6
2-е сутки	5	28	3	8	14
3-е сутки	8	48	4	22	23
4-е сутки	15	101	5	43	43
5-е сутки	30	211	9	70	70
6-е сутки	56	466	17	156	103
7-е сутки	75	877	35	230	166

В других исследованиях, как уже говорилось выше, нами была получена иммортализованная (бессмертная) клеточная линия, выделенная из первичной культуры фибробластов из 12–14-суточных эмбрионов мышей линии Af. При росте клеток этой линии иногда возникали фокусы аномального многослойного роста клеток, подобные тем, которые ранее наблюдались зарубежными исследователями на других клеточных линиях мышей [4]. Анализ компьютерных видеозаписей показал, что трансформированные фокусы образуются не путем локального размножения единичных клеток с постепенным увеличением участка аномального роста, а в результате агрегации многих клеток уже растущей монослойной культуры. Клеточный монослой концентрируется с образованием нескольких агрегатов. Затем участок монослоя отслаивается от субстрата и формирует крупный шаровидный агрегат из живых клеток. Если собрать такие открепившиеся в среду агрегаты и поместить их в новый культуральный сосуд со свежей питательной средой, агрегаты прикрепляются к субстрату, после чего находящиеся в них клетки быстро распространяются по ростовой поверхности. Фактически, нам удалось экспериментально смоделировать процесс метастазирования.

Для математического описания наблюдаемых закономерностей на втором этапе – этапе распространения агрегатов мы решили использовать уравнение теплопроводности, которое может также описывать и массоперенос. Сложнее обстоит дело с описанием первого этапа – образования агрегата. В простейшем случае формально можно решать уравнение теплопроводности, делая замену переменной времени t на $-t$. Однако тогда становится непонятен физический смысл входящих в уравнение коэффициентов. При обычном росте культуры плотность клеток и, соответственно, их способность к сближению, ограничены добавочными членами, пропорциональными квадрату числа клеток $-n^2$. В случае формирования агрегатов тогда приходится предполагать выделение клетками каких-то веществ-аттрактантов, позволяющих клеткам преодолевать это ограничение по плотности.

Однако в содружестве с коллегами из Института тепло- и массообмена НАН Беларуси мы пришли к довольно простой модели, которая позволяет описать этот этап в терминах броуновского движения. Правда, в норме клетки распластаются по поверхности культурального сосуда и перемещаются с помощью так называемых ложноножек, образующихся за счет адгезивных пятен. Однако можно предположить, что в тех случаях, когда в иммортализованной культуре наблюдалось образование агрегатов, связь с поверхностью сосуда за счет адгезии существенно уменьшалась и в силу могли вступать броуновские эффекты [5]. А раз образовавшийся под удара-

ми броуновских частиц агрегат согласно законам гидродинамики стремится к своему росту, втягивая все новые свободные клетки. Полученные при таком моделировании значения по порядку величины близки к наблюдаемым в эксперименте. В дальнейшем можно сделать модель еще более реалистичной, учитывая вязкость реальной питательной среды, адгезивные свойства клеток на разных ростовых поверхностях, упругость клеток и т. п.

Результаты исследований, полученные с помощью компьютерного видеоконкомплекса «Цитомир», используются в учебном процессе при чтении лекций в магистратуре Института подготовки научных кадров НАН Беларуси. На их основе разработаны учебно-методические пособия и методические рекомендации; они использованы в соответствующих электронных учебно-методических комплексах, зарегистрированных в Государственном регистре информационных ресурсов.

Экспериментальные результаты, представленные в статье, были получены при участии кандидатов биологических наук И. И. Конево́й, С. Н. Шевцовой, аспиранток А. С. Сапун, Н. А. Балашенко. Авторы выражают им искреннюю благодарность.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pawley, J. B.* Handbook of Biological Confocal Microscopy. – 3rd ed. / J. B. Pawley. – Berlin : Springer, 2006. – 985 p.
2. *Dromashko, S. E.* Time-laps microscopy of living cells with video complex «Tsitomir»: scientific, medical, and ecological possibilities / S. E. Dromashko, et al. // *Biologija (Lithuania)*. 2018. – Vol. 64. – No. 3. – P. 208–216.
3. *Шейко, Я. И.* Видеомикроскопия живых клеток *in vitro* с помощью видеоконкомплекса «Цитомир»: метод. рек. / Я. И. Шейко и др. – Минск: ООО «Поликraft», 2014. – 46 с.
4. *Rubin, H.* The role of selection in progressive neoplastic transformation / H. Rubin // *Adv. Cancer Res.* – 2001. – Vol. 83. – P. 159–207.
5. *Дромашко, С. Е.* Долговременная компьютерная видеомикроскопия живых клеток: моделирование «метастазирования» / С. Е. Дромашко, С. П. Фисенко // Математические методы в технике и технологиях: сб. тр. междунар. науч. конф.: в 12 т. Т. 2 / под общ. ред. А. А. Большакова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2018. – С. 93–96.

ТЕХНОЛОГИЯ УСВОЕНИЯ ДАННЫХ ДОПЛЕРОВСКОГО МЕТЕОРОЛОГИЧЕСКОГО ЛОКАТОРА В МЕЗОМАСШТАБНУЮ ЧИСЛЕННУЮ МОДЕЛЬ WRF-ARW В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

ASSIMILATION TECHNOLOGY OF DOOPLER WEATHER RADAR DATA INTO MESOSCALE NUMERICAL WRF-ARW MODEL IN THE REPUBLIC OF BELARUS

П. О. Зайко

P. A. Zaiko

*Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения
и мониторингу окружающей среды, г. Минск, Республика Беларусь*

Polly_LO@tut.by

*Center of hydrometeorology, control of radioactive contamination and environmental monitoring
of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

Представлено описание основных методов, применяемых для усвоения данных дистанционного зондирования, в том числе данных метеорологических локаторов, в численные модели прогноза погоды в мировой практике. Представлены результаты создания первого компонента системы усвоения данных наземных и аэрологических наблюдений в мезомасштабную модель WRF в Белгидромете. Дается более детальное описание этапов технологического процесса усвоения данных доплеровского метеорологического локатора на примере метеорологического локатора Минск-2. Особое место в работе занимает описание технологии усвоения радиолокационной отражаемости и радиального ветра в мезомасштабную численную модель WRF (WRF-ARW) на основе метода трехмерного вариационного усвоения (3D-Var). Приводятся результаты статистической оценок прогнозов погоды модели WRF с усвоенными радиолокационными данными за 2017 г.

The abstract presents the description of the basic methods of assimilation of remote sensing data, including Doppler weather radar data, into numerical weather prediction models in world practice. The abstract presents the first component of data assimilation system of surface meteorological and aerological observations, which is developed in the Belhydromet of the Republic of Belarus, into the mesoscale numerical model WRF (WRF-ARW). Additionally, there is a more detailed description of the stages of the technological process of the assimilation of Doppler meteorological radar, on the example of Minsk-2 weather radar. The description of the assimilation technology of horizontal radar reflectivity and radial velocity into mesoscale weather prediction model WRF (WRF-