



## МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ И РЕКОМЕНДАЦИИ

В разделе публикуются методики и рекомендации, имеющие как общеметодологический, так и узкопредметный характер. Материалы этого раздела призваны помочь в практической организации учебного исследования самому широкому кругу воспитателей: профессиональным педагогам школ и учреждений дополнительного образования и родителям

### Метод сравнительной цифровой биометрии

#### Разработка и опыт применения технологии в школьных исследованиях по палинологической биоиндикации и цитогенетической диагностике

Возможность количественной оценки метрических параметров биологических объектов с помощью доступных технологий открывает дополнительные перспективы в изучении окружающей среды и человека. В работе представлен простой, проверенный на практике метод компьютерного анализа цифровых изображений различных микроскопических объектов, получаемых с помощью светового микроскопа и любительской цифровой фотокамеры.

Шаронина Юлия Александровна, заместитель директора по естественно-научному направлению, учитель биологии.  
Асанов Жантемир Ахиллович, учитель информатики.  
Коненкова Любовь Андреевна, учитель биологии, английского языка.  
Захаров Евгений Владимирович, учащийся 10 класса.  
Холина Елизавета Андреевна, учащаяся 10 класса.  
Гуленков Александр Сергеевич, учащийся 9 класса.  
Шаронин Василий Олегович, учитель биологии, кандидат биологических наук.

На основе опыта применения доступных биологических, оптических и компьютерных технологий мы задались целью — разработать метод сравнительной компьютерной биометрии микроскопических объектов для полевых биоэкологических исследований и цитогенетической диагностики. Для её достижения были поставлены следующие задачи:

1. Выработать критерии и выбрать соответствующие им объекты исследования.
2. Установить оптические, цифровые и компьютерные параметры системы определения размеров микроскопических



**Рассмотрены варианты использования биометрической технологии в двух, весьма отдалённых областях биологических наук: экологии и генетике человека. Точнее, в их прикладных разделах: палинологической биоиндикации и клинической цитогенетике. Их объединяет как экспериментально-диагностическая, так и фундаментальная научная важность оценки метрических характеристик биологических структур микроскопического размера. Разработанная технология предусматривает возможность модификации и создания версий для решения иных биометрических задач.**

объектов и определить минимальные требования, предъявляемые к программе.

3. Создать и протестировать программу биометрического анализа цифровых изображений пыльцы/спор растений-биоиндикаторов и дать оценку состояния окружающей среды в пяти информативных пунктах.

4. Модифицировать программу для сравнительного определения протяжённости гетерохроматиновых участков хромосом человека (на примере экстремального варианта  $Yqh^{+++}$ ) и определить размер экстремального хромосомного варианта у пациента с кариотипом  $46,XYqh^{+++}$  в миллионах пар оснований (Mb).

5. Подтвердить достоверность результатов с помощью методов статистического анализа.

6. Оценить возможности и перспективы применения разработанного метода цифровой биометрии в прикладных биоэкологических, медицинских и иных естественно-научных исследованиях.

## Краткий обзор литературы и электронных источников

В настоящее время под термином «биометрия» принято понимать главным образом регистрацию и распознавание индивидуальных генотипических, фенотипических, интеллектуально-психологических и некоторых других особенностей человека [1, 2]. Сайт [biometrics.ru](http://biometrics.ru), например, подробно рассматривает исключительно антропологические аспекты одного из старейших разделов биологии и статистики [3]. Однако задачи этой прикладной области знаний намного обширнее.

Основоположниками биометрии, как самостоятельной комплексной дисциплины, являются Ф. Гальтон и К. Пирсон, которые в конце XIX века разработали методы исчисления корреляций в антропометрии и плотности распределения для некоторых биологических объектов [4]. Биометрические показатели и расчёты находят широкое применение как в эмпирической биологии вообще, так и при оценке и контроле состояния окружающей среды методами биоиндикации (биотестирования), в частности [5–7]. Морфометрический спорово-пыльцевой анализ, например, позволяет объективно определять динамическую ситуацию в экосистемах [8].

Количественное измерение и качественная оценка параметров биологических объектов играют важную роль и в диагностической практике, например в микробиологии, репродуктологии, клинической и молекулярной цитогенетике [9–12]. Так, изучение гетерохроматиновых районов хромосом — участков генома, строение и состав ДНК которых до сих пор точно не определён, анализ их структурной и функциональной роли являются одной

из актуальных проблем современной генетики и молекулярной биологии [13–15]. Хромосомные варианты конституционного гетерохроматина, в том числе хромосомы Y, часто встречаются в практике клинической генетики [13].

Возможность количественной оценки полиморфных гетерохроматиновых районов хромосом человека в норме, а также при врождённой и (или) наследственной генетической патологии с применением новых технологий представляет интерес как с медико-диагностической, так и с научной точки зрения [15].

## Объекты исследования

Объектами исследования служили:

I. Образцы пыльцы/спор определённых растений, взятые в местах проведения летних экологических практик: в совокупности — 5 точек (палинологические исследования):

А. Экологический лагерь Кенозерья, Каргопольский сектор Кенозерского Национального парка; Архангельская область.

В. Автономный палаточный лагерь на левом берегу р. Поча, Плесецкий сектор Кенозерского Национального парка; Архангельская область.

С. Автономный палаточный лагерь Старая Пустынь, берег оз. Святое, окрестности биостанции Нижегородского университета; Арзамасский район, Нижегородская область.

Д. Фермерское хозяйство «София»; Александровский район, Владимирская область.

Е. Участки ул. Фотиевой и окрестности Ленинского проспекта; Гагаринский район г. Москвы.

II. Метафазы и интерфазы культивированных лимфоцитов человека, кариотип — 46,XYqh+++ (цитогенетические исследования).

I. Основными критериями выбора модельных видов растений для последующего анализа препаратов пыльцы и спор являлись следующие:

- принадлежность к группе видов-космополитов — для обеспечения возможности дальнейшего сравнения результатов и максимального расширения географической области исследования;

- принадлежность к группе распространённых, фоновых видов — во избежание минимальной вероятности нанесения ущерба репродуктивному потенциалу популяции;

- незначительный диапазон разброса размеров и форм пыльцевых зерен или спор;

- длительный период цветения (спороношения) и обилие пыльцы (спор);

- возможность транспортировки и длительного хранения материала.



Среди споровых растений одним из наиболее отвечающих требуемым характеристикам видом является голокучник обыкновенный (*Gymnocarpium dryopteris*). Он же, согласно различным определителям [16–18], голокучник трёхраздельный, или Линнея, семейство Щитовниковые. Известно также, что этот папоротник культивируется как декоративное растение, что расширяет перспективы экспериментальной деятельности и биотестирования. Из многочисленных видов цветковых растений, соответствующих указанным критериям, модельными видами были признаны нивяник обыкновенный, или поповник (*Leucanthemum vulgare*), семейство Сложноцветные и клевер ползучий (*Trifolium repens*), семейство Бобовые (Мотыльковые). Описание собственно объекта исследования — пыльцы и спор и их характеристика приводятся в разделе «Результаты и обсуждение».

II. Гетерохроматиновые районы хромосом наиболее отчётливо различимы на С-окрашенных препаратах [14]. Экстремальный вариант полиморфного гетерохроматинового участка хромосомы Y ( $Yqh^{+++}$ ) представляет собой контрастную структуру, отвечающую задачам тестирования и модификации программы для определения её протяжённости в геноме. Этот участок к тому же легко идентифицировать в интерфазах. В 70-х годах прошлого века были изучены варианты длины окрашенного С-фрагмента хромосомы Y. Тогда цитогенетиками было отмечено, что даже при значительных колебаниях длины гетерохроматинового блока хромосомы Y обычно не наблюдается выраженных фенотипических отклонений. Предполагается, что С-окрашиваемый сегмент хромосомы Y генетически нейтрален. В норме дистальный гетерохроматин  $Yqh$  занимает около 30 Mb, до  $\frac{2}{3}$  длинного плеча хромосомы Y человека, состоящей, в свою очередь из, примерно, 50 млн. нуклеотидных пар (Mb) [10]. Хромосома Y, кроме того, представляет определённый научный интерес с точки зрения генеалогических, популяционно-демографических и этнографических исследований, поскольку, как известно, она наследуется исключительно по мужской линии, и её варианты могут быть прослежены в ряду поколений.

## Методы исследования

Для морфометрического анализа пыльцы/спор сначала использовался метод визуального сравнения. Собранная пыльца одного из растений, имеющая относительно небольшой разброс значений диаметров пыльцевых зёрен, может служить условным метрическим эталоном для определения приблизительных размеров всех микроскопических объектов. После установления среднего диаметра пыльцевого зерна, добавляя немного пыльцы из эталонного образца в каждый временный препарат можно оценивать масштаб любого объекта в поле зрения микроскопа [7]. Для сопоставления

размеров удобно использовать «коктейль-пробы», смесь пыльцы-спор нескольких изучаемых видов. Однако для точных замеров требовался более эффективный метод.

Первоначально программа, написанная на языке Microsoft visual basic v. 6.0., была разработана для измерения диаметров пыльцевых зерен и спор, точнее, их цифровых изображений, с автоматическим переводом пикселей в микрометры ( $\mu\text{м}$ ). В ней предусмотрены такие функции, как загрузка графического файла (микрофотографии) с изображением микроскопического объекта, автоматическое определение его размера, оценка и сохранение результатов. Соответственно, с учётом оптических характеристик объектива, окуляра микроскопа и свойств модели фотоаппарата. Потом возникла идея применения метода в цитогенетике: можно ли оценивать длину участков хромосом? Если взять за эталон какой-нибудь неизменный (эухроматиновый) участок хромосомы известной протяжённости, то можно измерять относительно него любой район. Без учёта оптических параметров. Для С-окраски удобно, например, брать в качестве эталона короткое плечо хромосомы 9 (9p). Метод заключается в маркировке и измерении более интенсивно и контрастно дифференциально-окрашенного участка длинного плеча хромосомы Y и сопоставлении результата с размером выбранного эталона ( $L_{9p} = 45 \text{ Mb}$ , в данном случае). Если промерить таким способом гетерохроматиновые блоки в десятках метафаз, получается статистически значимое среднее. Размер микроскопического объекта определяется в пикселях, что позволяет получать данные и в микрометрах (для пыльцы), и в миллионах пар оснований (для хромосом). Точность метода составляет, с учётом статистической погрешности,  $\pm 0,5 \mu\text{м}$  (для пыльцы) или  $1 \text{ Mb}$  (для хромосом). При такой точности, гипотетически, можно количественно оценивать и крупные структурные перестройки по G-полосам, а также использовать программу для измерения величины сигналов в молекулярно-цитогенетических исследованиях.

Таким образом, современные цифровые и компьютерные технологии, в сочетании с традиционной оптической микроскопией, предоставляют широкие возможности для количественной оценки размеров микроскопических объектов, в том числе пыльцевых зерен/спор или сегментов хромосом человека. Основными методами исследования в настоящей работе служили: световая микроскопия, визуальная сравнительная морфометрия (по аналогии с метрическим эталоном), цифровая микрофотография, компьютерный анализ изображений, статистическая обработка результатов, логическая конструкция и синтез информации. На основе комбинации перечисленных методов и была разработана программа сравнительной цифровой биометрии.

#### МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ И РЕКОМЕНДАЦИИ

*Первоначально программа, написанная на языке Microsoft visual basic v. 6.0., была разработана для измерения диаметров пыльцевых зерен и спор, точнее, их цифровых изображений, с автоматическим переводом пикселей в микрометры ( $\mu\text{м}$ ).*

*Дозникла идея применения метода в цитогенетике: можно ли оценивать длину участков хромосом?*

*Метод заключается в маркировке и измерении более интенсивно и контрастно дифференциально-окрашенного участка длинного плеча хромосомы Y и сопоставлении результата с размером выбранного эталона ( $L_{9p} = 45 \text{ Mb}$ , в данном случае).*

*Основными методами исследования в настоящей работе служили: световая микроскопия, визуальная сравнительная морфометрия (по аналогии с метрическим эталоном), цифровая микрофотография, компьютерный анализ изображений, статистическая обработка результатов, логическая конструкция и синтез информации.*



## Результаты и обсуждение

### I. Палинологическая биоиндикация

#### Исследование спор *Gymnocarpium dryopteris*

Споры *Gymnocarpium dryopteris* представляли собой бобовидные образования золотисто-бурого цвета с выражено шероховатой поверхностью, длиной 60–65  $\mu\text{m}$ , диаметром 30–40  $\mu\text{m}$ .

Всего было проанализировано 5995 спор из образцов, взятых в трёх опорных точках (А, В, С). Во всех изученных образцах более 80% спор имели относительно стабильную форму и размер. Поскольку такая пропорция наблюдалась в трёх точках, экологическая обстановка в которых заведомо благополучная, это соотношение (4:1) может гипотетически быть принято в качестве эталонного и (или) условно-контрольного.

#### Исследование пыльцы

#### *Leucanthemum vulgare* и *Trifolium repens*

Пыльцевые зёрна нивяника представляли собой, в основном, сферические образования с заметными выростами экзины (наружного слоя), золотисто-жёлтого цвета, диаметром 35–40  $\mu\text{m}$ . Пыльцевые зёрна клевера имели преимущественно овально-эллипсовидную или, реже, сферическую форму, были светло-коричневого цвета либо прозрачными. Их длина составляла 30–35, диаметр 25–30  $\mu\text{m}$ . Наблюдаемая форма зёрен зависела, как и в случае нивяника, от их полярно-экваториальной экспозиции. В зависимости от размера/формы пыльцевые зёрна подразделялись на 4 условные категории. В каждом случае учитывалось максимальное число зёрен. Всего было проанализировано 12 254 пыльцевых зерна (5199 – нивяника и 7055 – клевера).

Результаты исследования свидетельствуют об относительно постоянном значении морфологических характеристик пыльцевых зёрен в четырёх информативных точках. Поэтому соотношение норма/аномалия 9:1 для нивяника, например, может служить условным показателем относительного экологического благополучия территории. Морфометрические характеристики пыльцы клевера ползучего представляются более «чутким» индикатором состояния среды. За условный показатель относительного благополучия, для данного вида, может быть принято усреднённое соотношение норма/аномалия 4:1.

### II. Цитогенетическая диагностика

Тестирование программы цифровой биометрии проводилось на снимках окрашенных С-методом хромосом человека (кариотип: 46,XYqh), полученных с помощью любительской фотокаме-

ры. Разработанная программа полуавтоматического определения размеров гетерохроматиновых блоков хромосом человека позволила количественно оценивать величину протяжённых (около 1 Mb) последовательностей ДНК. Для С-окрашенных хромосом<sup>1</sup> в качестве метрического эталона было выбрано короткое плечо хромосомы 9, поскольку эта хромосома хорошо дифференцируется в кариотипе по своему интенсивно окрашенному гетерохроматиновому блоку 9qh. При любой степени конденсации хроматина в метафазе протяжённость 9p всегда равна 45 Mb [19]. С использованием имеющегося оборудования, как показывают статистические расчёты, точность составляет  $\pm 1$  Mb. По набору цифровых фотоснимков кариотипов одного пациента были измерены и сравнены с гетерохроматиновым блоком Y длины коротких плеч пар гомологов хромосом 9, общим числом  $N = 122$ . Полученное распределение значений относительного размера Yqh+++ показывает соответствие экспериментального распределения нормальному (распределению Гаусса). Полученные результаты и проведённые расчёты позволили оценить размер экстремального варианта Yqh+++ в 70,59 ( $\pm 0,88$ ) Mb, при нормальном размере ~30 Mb. (Относительная статистическая ошибка  $\delta = 1,3\%$ .) Продолжительность процесса, от микроскопического анализа до статистической обработки составляет 1–3 часа и зависит только от качества препарата.

Сравнение величин варибельного участка в стадии интерфазы и метафазы митоза с помощью разработанного метода позволило также установить качественные различия степеней конденсации гетерохроматина Y в интерфазных и метафазных клетках. Данный факт предположительно может свидетельствовать о некоторой биологической активности этого генетически инертного региона в интерфазе.

Таким образом, разработка метода цифровой биометрии открывает возможность количественной цитогенетической оценки варибельных участков генома человека. С медико-генетической точки зрения представляется перспективным применение разработанного метода для более точной и эффективной диагностики масштабов хромосомных перестроек в клинической цитогенетической практике.

## Выводы

1. Эффективность метода цифровой биометрии экспериментально и статистически подтверждена для различных типов биологических структур: пыльцы/спор растений и участков хромосом человека.

<sup>1</sup> Окрашенные хромосомные препараты были любезно предоставлены для анализа объединённой цитогенетической лабораторией Научного центра психического здоровья РАМН и МНИИ педиатрии и детской хирургии Росздрава (руководители: проф., д.б.н. Юров Ю.Б. и проф., д.б.н. Ворсанова С.Г.).

*Таким образом, разработка метода цифровой биометрии открывает возможность количественной цитогенетической оценки варибельных участков генома человека. С медико-генетической точки зрения представляется перспективным применение разработанного метода для более точной и эффективной диагностики масштабов хромосомных перестроек в клинической цитогенетической практике.*



2. Программа цифровой биометрии может быть использована в биоэкологических и цитогенетических исследованиях для оценки размеров микроскопических объектов с точностью  $\pm 0,5 \mu\text{м}$  или 1 Мб.

3. Палинологический морфометрический анализ спор/пыльцы трёх модельных видов установил, что наиболее благоприятной с экологической точки зрения является территория Плесецкого сектора Кенозерского Национального парка; Архангельская область

4. Модификация программы цифровой биометрии и статистическая обработка информации позволили определить протяжённость экстремального гетерохроматинового участка хромосом Y ( $Yqh^{+++}$ ), которая составила в метафазе  $\sim 70,6 \text{ Мб}$ , что более чем в 2 раза превышает норму ( $\sim 30 \text{ Мб}$ ).

5. Сравнение размеров гетерохроматинового участка длинного плеча хромосомы Y ( $Yqh$ ) в стадиях интерфазы и метафазы говорит о его более низкой степени конденсации в интерфазном ядре

6. Усовершенствование методов, технической базы микроскопии, микрофотографии и компьютерного обеспечения анализа цифрового изображения позволит получать более точные, корректные результаты.

7. Представляется перспективным применение разработанного метода цифровой биометрии как в биоэкологических целях, так и для более точной диагностики масштабов хромосомных перестроек в клинической цитогенетической практике.

## Литература и электронные источники

1. Федеральный закон «О персональных данных» № 152-ФЗ от 27 июля 2006 г.
2. *Иванов А.И.* Биометрическая идентификация личности по динамике подсознательных движений. Пенза: Изд-во Пенз. гос. ун-та, 2000.
3. *BIOMETRICS.RU* Российский биометрический портал. Ежедневные новости биометрии.
4. Биологический энциклопедический словарь / Под. ред. Гилярова М.С. и др. М.: Сов. энциклопедия, 1986.
5. *Урбах В.Ю.* Биометрические методы. Статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине. М.: Наука, 1964.
6. *Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И. и др.* Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: Учебное пособие для студентов вузов. М.: Академия, 2007.
7. *Шаронина Ю.А., Никулина Е.А., Хрущёва А.С., Коштырева Е.В., Путилова Т.В., Усатова Л.А., Шаронин В.О.* Полевая микрофотография и палинологическая биоиндикация в школьных биоэкологических исследованиях / Инновационные процессы в биологическом и экологическом образовании в школе и ВУЗе. Сборник материалов I Международной научно-практической конференции 10–12 ноября 2008 г., М.: МПГУ, 2008.

8. *Дзюба О.Ф.* Тератоморфные пыльцевые зерна в современных палео-палинологических спектрах и некоторые проблемы палиностратиграфии / Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2007. 2: 1–22; <http://www.ngtp.ru/rub/authors/OFDzuba.html> (06.01.09).
9. *Теттер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов. Изд. 5-е, перераб. и доп. М.: Дрофа, 2004.
10. *Ворсанова С.Г., Шаронин В.О., Курило Л.Ф.* Аномалии половых хромосом при нарушении репродуктивной функции у мужчин / Проблемы репродукции. 1998. С. 12–21.
11. *Yurov Y.B., Saias M.J., Vorsanova S.G., Erny R., Soloviev I.V., Sharonin V.O., Guichaoua M.R., Luciani J.M.* Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa / Mol. Hum. Reprod. 1996. 2- p. 665–668.
12. *Vorsanova S.G., Yurov Y.u.B., Iouron I.Y., Monachov V.V., Sharonin V.O., Demidova I.A.* Alphoid DNA variants and non-disjunction in Down's syndrome: fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies / Balk.J.Med.Genet., 2003. 6.-3–4- p. 81–87.
13. *Демидова И.А.* Молекулярно-цитогенетический полиморфизм гетерохроматиновых районов хромосом у детей с недифференцированными формами умственной отсталости / Автореф. канд. дисс... Киев, 1992.
14. *Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Соловьёв И.В., Юров Ю.Б.* Гетерохроматиновые районы хромосом человека: клинико-биологические аспекты. М.: Медпрактика, 2008.
15. *Cram D.S., Osborne E., McLachlan R.I.* Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception / MJA 2006. 185 (8): p. 433–434 / [http://www.mja.com.au/public/issues/185\\_08\\_161006/cra10835\\_fm.html](http://www.mja.com.au/public/issues/185_08_161006/cra10835_fm.html) (06.01.09).
16. *Маевский П.Ф.* Флора средней полосы европейской части России. Изд. 10-е. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006.
17. *Новиков В.С.* Популярный атлас-определитель. Дикорастущие растения. Изд. 3-е. М.: Дрофа, 2002.
18. *Шанцер И.А.* Растения средней полосы Европейской России. Полевой атлас. Изд. 2-е. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007.
19. International Human Genome Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome / Nature, 2001.-vol.409.-15.02-p. 860–921. 