

КЛАССИФИКАТОР АВТОМАТИЧЕСКОГО РАСПОЗНАВАНИЯ ХРОМОСОМ СВИНЬИ ДОМАШНЕЙ (*SUS SCROFA DOMESTICUS*)

© В. Н. Стефанова,¹ * М. Н. Зенина,² *

¹ Институт цитологии РАН и ² Институт гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург;
* электронный адрес: vestefan@mail.ru

Необходимость проведения цитогенетического мониторинга в свиноводстве и выбраковки животных с хромосомными aberrациями из селекционного процесса ставит задачу автоматизации кариотипирования с помощью специального программного обеспечения, аналогичного существующему для хромосом человека. В настоящей работе разработан автоматический классификатор хромосом свиньи на базе программного обеспечения «Карио-3.1». Первоначально в состав классификатора были включены 1578 хромосом из 47 метафазных пластинок. Проверка работы классификатора показала, что частота ошибочного распознавания хромосом составляет 8.2 %, или 3.12 ± 0.26 ошибки на метафазу. Дополнение классификатора до 1807 хромосом позволило снизить частоту ошибки до 6.1 %, или 2.78 ± 0.18 ошибки на метафазу. Апробация классификатора на хряке с реципрокной транслокацией *gcr(1p-;11p+)* продемонстрировала корректную классификацию всех хромосом в наборе. Сфера применения классификатора хромосом свиньи обсуждается.

Ключевые слова: хромосомы свиньи, кариотипирование, автоматическая классификация, программное обеспечение «Карио-3.1».

Принятые сокращения: GTG-метод — G-окрашивание хромосом с помощью трипсина и красителя Гимза, *gcr* — реципрокная транслокация.

К настоящему времени в свиноводстве весьма актуальна проблема выявления и выбраковки из селекционной работы животных со структурными aberrациями хромосом. Доказано, что использование фенотипически нормальных хряков-носителей реципрокных транслокаций в племенной работе приводит к быстрому распространению этих наследственных аномалий в популяциях и в конечном итоге к значительным экономическим потерям в свиноводстве (Gustavsson, 1980; Стефанова, 1987; Popescu et al., 1988; Ducos et al., 2007; Basrur, Stranzinger, 2008). В ряде стран Европы уже приняты специальные государственные программы цитогенетического мониторинга хряков (Ducos et al., 2007; Danielak-Czech, Slota, 2008).

Обнаружение реципрокных транслокаций возможно только на дифференциально исчерченных хромосомах свиньи, полученных с помощью GTG-метода. Стандартный цитогенетический анализ представляет собой достаточно трудоемкую методику, требующую значительных затрат времени на анализ одного животного и высокой квалификации специалиста, что затрудняет организацию и проведение цитогенетического мониторинга во многих странах.

Используемые в лабораториях для кариотипирования животных и растительных объектов программы Photoshop (Adobe Systems, США) и ImageJ (imagej.en.softonic.com) упрощают и облегчают процедуру классификации хромосом недостаточно. Оператору приходится вручную идентифицировать хромосомы, вырезать их и переносить в новое окно для распределения по группам согласно номенклатуре.

Ряд компаний производит программное обеспечение для автоматизации цитогенетических исследований: MetaSystems (<http://www/metasystems-international.com>), Lucia (<http://www.lucia.cz/en/front-page/lucia-karyo>), Leica (<http://www.leicabiosystems.com/pathology-imaging/cytogenetics/details/product/cytovision>). Однако предлагаемые программы разработаны для кариотипирования хромосом человека и находят широкое применение в клинической и медицинской практике. Для остальных животных и растительных объектов эти производители предлагают незначительно упрощенный вариант ручного кариотипирования, аналогичного при использовании программы Photoshop.

Таким образом, необходимость разработки и внедрения в цитогенетическую практику программного обеспечения для автоматического распознавания хромосом свиньи, позволяющего во много раз ускорить и облегчить процесс кариотипирования, совершенно очевидна.

В задачи настоящей работы входили разработка и апробация автоматического классификатора на базе компьютерного программного обеспечения «Карио-3.1» (ООО «ВидеоТест», Санкт-Петербург).

Материал и методика

Материалом для исследования служили лимфоциты периферической крови хряков породы бельгийский ландрас и хряка с реципрокной транслокацией *gcr(1p-;11p+)*.

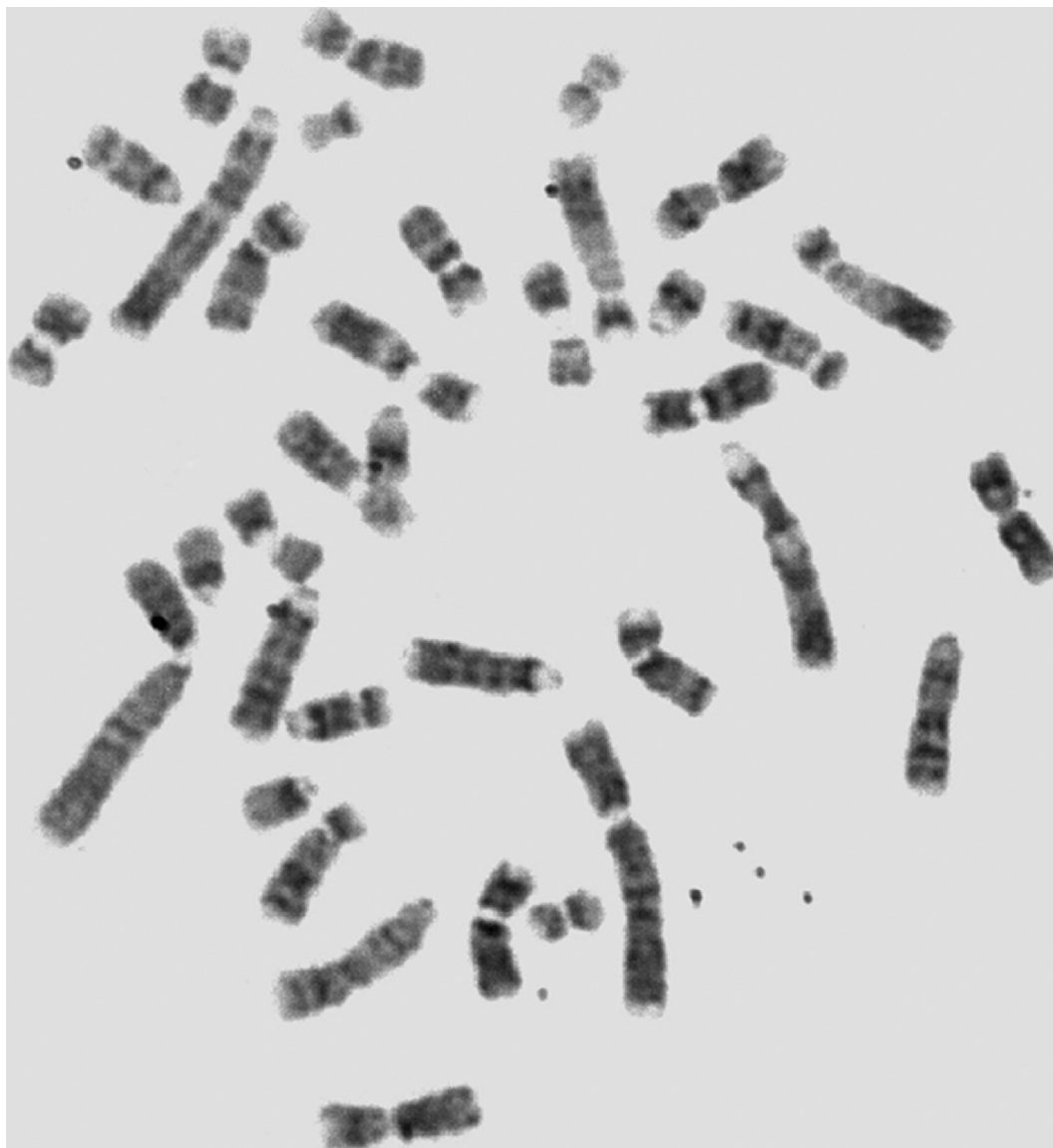


Рис. 1. Метафазная пластинка GTG-окрашенных хромосом свиной домашней на этапе «Метафаза» программного обеспечения «Карио-3.1».

Культивирование лимфоцитов крови и приготовление препаратов метафазных хромосом осуществляли по стандартному протоколу (Moorhead et al., 1960). Для дифференциального окрашивания хромосом свиной использовали популярный вариант GTG-метода (Ozkinay, Mitelman, 1979).

Полученные препараты анализировали на аппаратно-программном комплексе. В состав комплекса входят микроскоп Axio Skop 2 (Carl Zeiss Microscopy, Германия), черно-белая CCD-камера высокого разрешения (VT-13X, 1300×1030 пикселей) и компьютер с установленным программным обеспечением «ВидеоТест-Карио 3.1» (<http://www.videotest.ru/ru/products/9>).

Программное обеспечение разработано для ввода, сохранения, обработки и анализа изображений хромосом и автоматической идентификации на заключительном этапе. Автоматическое распознавание хромосом классификатором осуществляется на основе набора специфических для каждой хромосомы параметров, таких как центромерный индекс, длина центральной линии,

число и взаимное расположение на хромосоме разных по интенсивности окрашивания полос. Точность работы классификатора зависит от объема внесенной в него информации, причем программа позволяет дополнять классификатор хромосом изучаемого объекта в случае необходимости.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе для создания базы данных классификатора хромосом свиной вручную оцифровали 1578 GTG-окрашенных хромосом разной степени конденсации из 47 метафазных пластинок. В базу классификатора добавляли хромосомы из метафаз с хорошим разбросом и без наложений хромосом и строили их кариограммы согласно общепринятой номенклатуре хромосом свиной (Ford et al., 1980).

В процессе распознавания (классификации) программным обеспечением «ВидеоТест-Карио 3.1» хромосомы

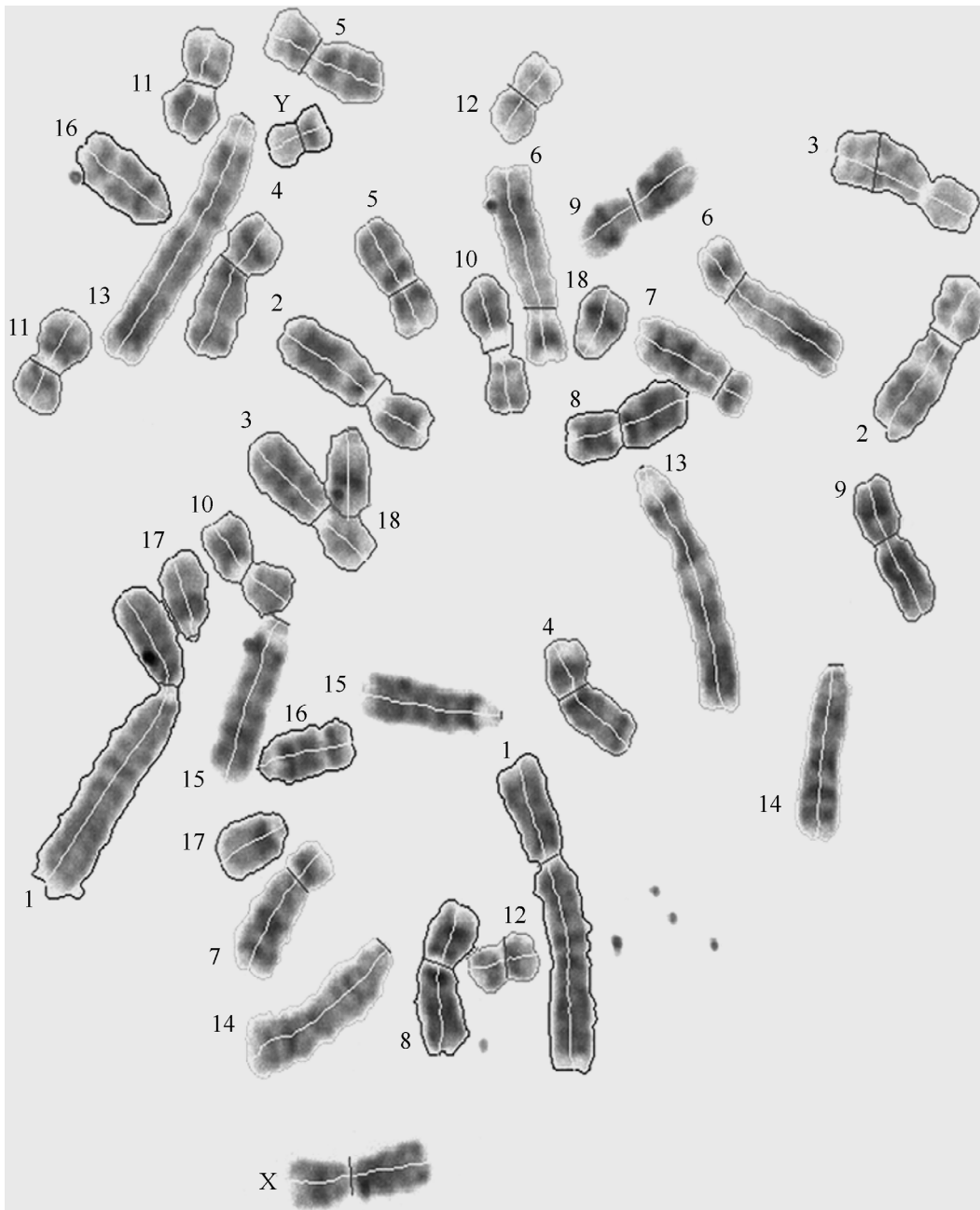


Рис. 2. Метафазная пластинка GTG-окрашенных хромосом свиньи домашней на этапе «Анализ» программного обеспечения «Карио-3.1».

На хромосомах отмечены центромеры и центральные линии.

метафазной пластинки проходят три последовательных этапа анализа, представленных на рис. 1—3.

На первом этапе — «Метафаза» (рис. 1) — предусмотрены функции изменения яркости и контраста, усиления резкости изображения, удаления чужеродных элементов, попавших в метафазную пластинку (интерфазные ядра, хромосомы близлежащих метафаз и т. д.), и дополнение метафазной пластинки, если хромосомы попали в разные поля зрения.

На следующем этапе — «Анализ» — подбирается режим выделения хромосом, который обычно сохраняется при анализе последующих метафазных пластинок с этого же препарата (рис. 2). Затем производятся следующие операции: нанесение контуров хромосом, разделение и

корректировка разделения хромосом в случае их соприкосновения или наложения, нанесение и корректировка центральных линий хромосом и центромер. На этом же этапе происходит автоматический подсчет числа хромосом на метафазной пластинке.

На заключительном этапе анализа — «Кариограмма» — происходят автоматическое распознавание и установка хромосом в кариограмму согласно принятой для изучаемого объекта номенклатуре хромосом (рис. 3). Здесь же можно осуществлять перенос, поворот, зеркальное отображение и выпрямление хромосом, а также отображать рядом с хромосомой ее идиограмму соответствующего уровня разрешения. Для свиньи общепринятыми являются идиограммы на уровне разреше-

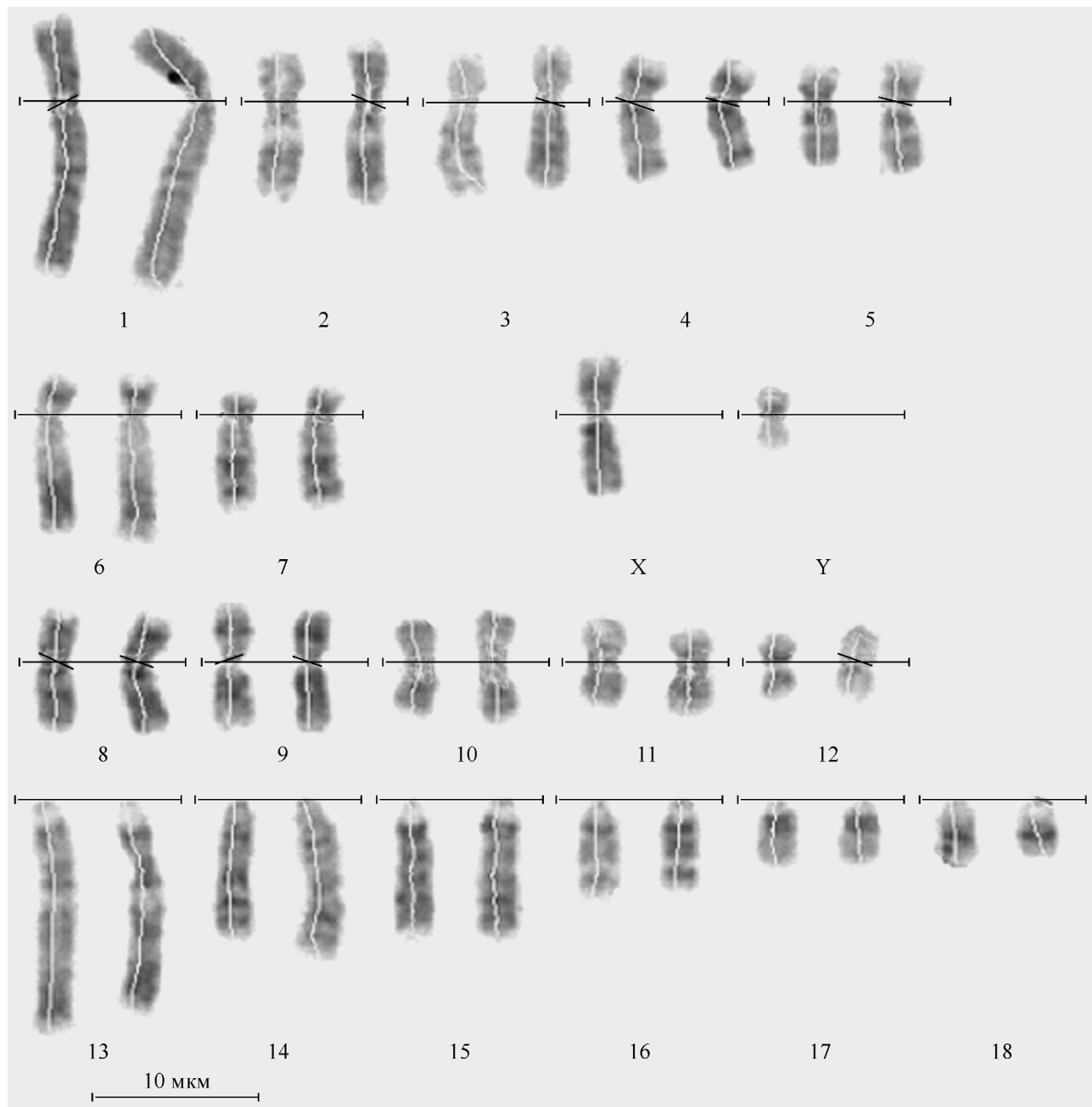


Рис. 3. Метафазная пластинка GTG-окрашенных хромосом свињи домашней на этапе «Кариограмма» программного обеспечения «Карио-3.1».

Кариограмма хромосом построена согласно общепринятой для хромосом свињи номенклатуре.

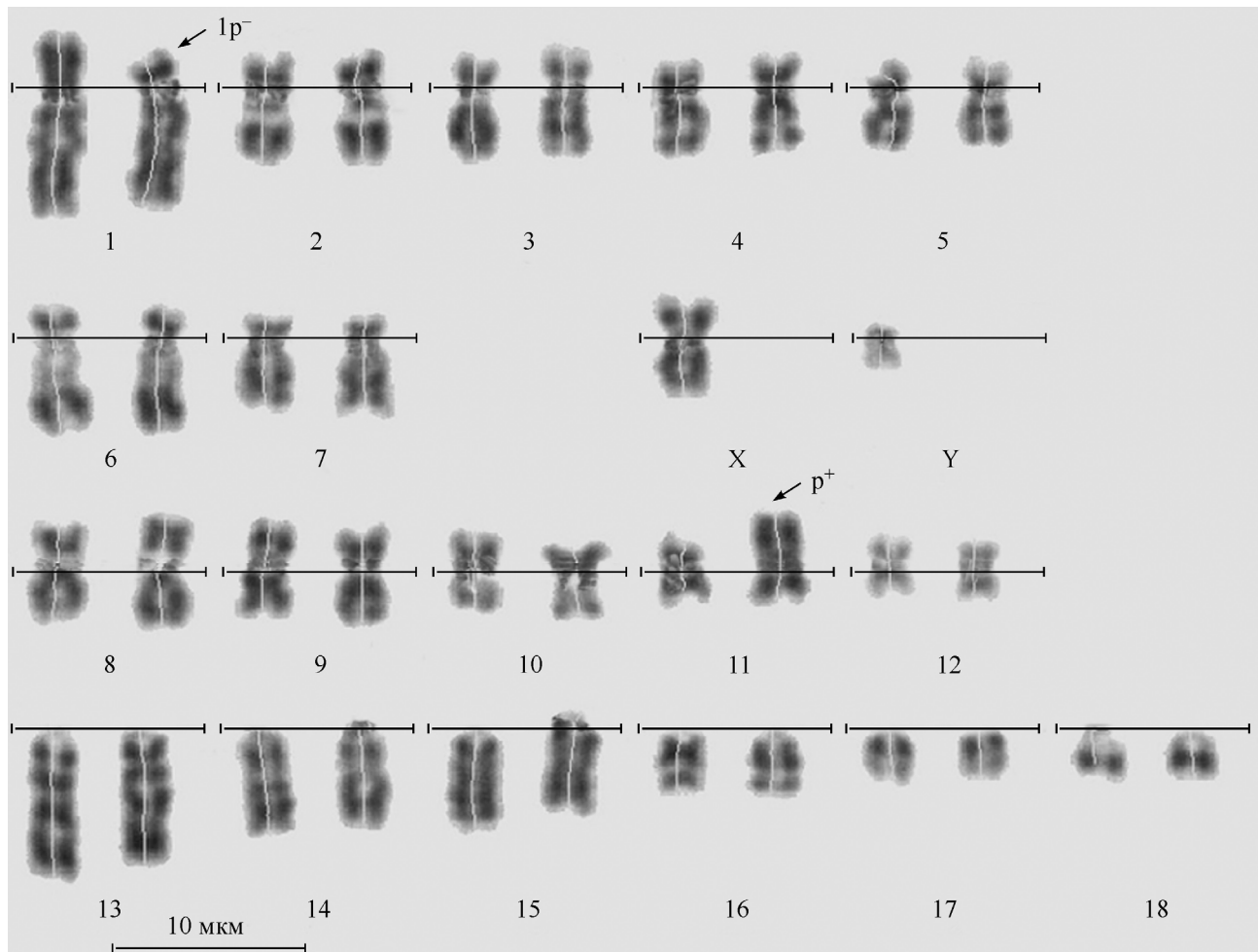
ния 287 (Gustavsson, 1988) или 539 (Yerle et al., 1991) дисков.

Для того чтобы проверить правильность автоматического распознавания классификатором хромосом свињи в автоматическом режиме, дополнительно проанализировали 16 метафазных пластинок, набранных случайным образом из другой выборки метафаз. В среднем число ошибочно распознанных хромосом равнялось 3.12 ± 0.26 на метафазную пластинку, а частота ошибки при этом составляла 8.2 %.

Обнаружено, что основные ошибки при автоматическом распознавании хромосом свињи возникают за счет неверного построения центральных линий на изогнутых

и соприкасающихся хромосомах, неправильного распознавания центромер акроцентрических хромосом из-за слабой интенсивности их прокрашивания красителем Гимза, а также сходства рисунка G-дисков на хромосомах 9 и X (Hansen, 1980).

Полученные значения ошибок при автоматическом распознавании хромосом свињи находятся в допустимых пределах для исследований такого рода. Для сравнения аналогичные данные при автоматическом распознавании хромосом человека составляют 4—5 ошибок на метафазу при уровне ошибки 8—9 % (Lundsteen et al., 1986). Частота ошибочного распознавания хромосом напрямую зависит от базы данных классификатора и может изменяться

Рис. 4. Кариограмма хромосом хряка с $rcp(1p-;11p+)$.

Программное обеспечение «Карио-3.1».

от 9.2 (в классификатор входили хромосомы без наложений) до 47.4 % (в классификатор входили хромосомы с наложениями) (Graham, Graham, 1999).

Для разных хромосом свиньи частота ошибочного распознавания хромосом варьировала: хромосомы 1, 6, 11, 13, 15 и Y-хромосома распознавались безошибочно, а для хромосомы 8 ошибка распознавания составляла 20 %. Аналогичные значения ошибок распознавания для разных хромосом человека варьируют от 1.4 до 17.2 % (Lundsteen et al., 1986). До настоящего времени исследователи продолжают поиск новых маркеров хромосом для создания классификаторов, которые позволят уменьшить частоту ошибочного распознавания хромосом (Moradi, Setarehdan, 2006; Kao et al., 2008).

Необходимо иметь в виду, что программное обеспечение «Карио-3.1» позволяет оператору вручную корректировать ошибки на каждом этапе работы и, следовательно, избежать ошибок на заключительном этапе построения кариограммы.

Для апробации работы полученного классификатора в автоматическом режиме использовали цитогенетические препараты хряка с транспозицией $rcp(1p-;11p+)$, описанной ранее (Stefanova, Tsocheva, 1999). Традиционный цитогенетический анализ дифференциально окрашенных хромосом этого хряка показал, что разрывы произошли в центральной части короткого плеча хромо-

сомы 1 и в теломерном районе короткого плеча хромосомы 11.

На рис. 4 представлена кариограмма после автоматического распознавания хромосом этого хряка: все хромосомы в наборе, в том числе и вовлеченные в реципрокную транслокацию, классифицированы правильно.

В дальнейшей работе при апробации классификатора на метафазных пластинках невысокого качества обнаружены случаи ошибочного распознавания акроцентрических хромосом свиньи в полностью автоматическом режиме из-за неправильного выделения контура хромосом и нанесения центромеры и центральной линии. Эти ошибки могут быть вызваны избыточной трипсинизацией хромосом в процессе G-окрашивания.

Для улучшения работы были дополнительно оцифрованы и вручную введены в базу классификатора акроцентрические GTG-окрашенные хромосомы свиньи. После дополнения база классификатора составила 1807 хромосом, что позволило снизить среднее число ошибочно распознанных хромосом на 1 метафазную пластинку с 3.12 ± 0.26 до 2.78 ± 0.18 и уменьшить частоту ошибки с 8.2 до 6.1 %.

Таким образом, представленный автоматический классификатор хромосом свиньи может быть успешно использован как в цитогенетическом мониторинге в свиноводстве, так и в исследованиях перестроек хромосом в

процессе эволюции семейства Suidae (Kozubka-Sobocinska et al., 2008), а также для кариотипирования многочисленных перевиваемых клеточных линий свиньи, широко применяемых в ветеринарной и медицинской практике.

Авторы выражают благодарность Е. И. Клыковой (ООО «ВидеоТест») за методическую помощь в процессе создания классификатора.

Список литературы

- Стефанова В. Н. 1987. Спонтанные транслокации у свиней на современном этапе исследований. В кн.: Цитогенетика и молекулярная генетика сельскохозяйственных животных. Л.: ВНИИГРЖ. 36—50.
- Basrur P. K., Stranzinger G. 2008. Veterinary cytogenetics: past and perspective. *Cytogenet. Genome Res.* 120 : 11—25.
- Danielak-Czech B., Slota E. 2008. Karyotype control system of AI boars in Poland: the current survey. *Ann. Anim. Sci.* 8 : 255—262.
- Ducos A., Berland H. M., Bonnet N., Calgareo A., Billoux S., Mary N., Garnier-Bonnet A., Darre R., Pinton A. 2007. Chromosomal control of pig populations in France: 2002—2006 survey. *Genet. Sel. Evol.* 39 : 583—597.
- Ford C. T., Pollock D. L., Gustavsson I. 1980. Proceeding of the first international conference for the standardization of banded karyotypes of domestic animals. *Hereditas.* 92 : 145—162.
- Graham C., Graham J. 1999. Trainable grey-level models for disentangling overlapping chromosomes. *Pattern Recognition.* 32 : 1335—1349.
- Gustavsson I. 1980. Chromosome aberration and their influence on the reproduction performance of domestic animals. *Z. Tierzuchtg. Zuchtsbiol.* 97 : 176—195.
- Gustavsson I. 1988. Standard karyotype of the domestic pig. *Hereditas.* 109 : 151—157.
- Hansen K. M. 1980. Identification of the X-chromosome of the domestic pig. *Hereditas.* 12 : 225—232.
- Kao J.-h., Chuang J.-h., Wang T. 2008. Chromosome classification based on the band profile similarity along approximate medial axis. *Pattern Recognition.* 41 : 77—89.
- Kozubka-Sobocinska A., Babicz M., Rejuch B. 2008. Genetic conservation of chromosome G-bands in Suidae. *Ann. Anim. Sci.* 8 : 340—355.
- Lundsteen C., Gerdes T., Maahr J. 1986. Automatic classification of chromosomes as part of routine system for clinical analysis. *Cytometry.* 7 : 1—7.
- Moorhead P., Nowell P., Mellman W. J. 1960. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20 : 613—616.
- Moradi M., Setarehdan S. K. 2006. New features for automatic classification of human chromosomes: a feasible study. *Pattern Recognition Lett.* 27 : 19—28.
- Ozkinay C., Mitelman F. 1979. A simple trypsin-Giemsa technique producing simultaneous G- and C-banding in human chromosomes. *Hereditas.* 90 : 1—4.
- Piper J., Granum E. 1989. On fully automatic feature measurement for banded chromosome classification. *Cytometry.* 10 : 242—256.
- Popescu C. P., Boscher J., Zhang S. 1988. Cytogenetic evaluation of boar with a low prolificacy: two new types of chromosome translocation. *Ann. Genet.* 31 : 75—80.
- Stefanova V. N., Tsocheva K. T. 1999. A reciprocal translocation rcp(1p-; 11p+) in a boar produced a decreased litter size. *Abstr. 9th European colloquium on cytogenetics of domestic animals. Toulouse-Auzeville.* 42.
- Yerle M., Galman O., Echard G. 1991. The high-resolution GTG-banding pattern of pig chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 56 : 45—47.

Поступила 28 III 2014

CLASSIFIER OF DOMESTIC PIG (*SUS SCROFA DOMESTICUS*) AUTOMATIC CHROMOSOME IDENTIFICATION

V. N. Stefanova,¹ * M. N. Zenina²

¹ Institute of Cytology RAS and ² Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg;
* e-mail: vestefan@mail.ru

Automated chromosome classification is an essential task in cytogenetics of animals and plants. Until now the automatic karyotyping systems were obtained only for human chromosomes. The main aim of this study was to develop the automatic pig chromosome classifier using image processing software «VideoTest-Karyo 3.1». To solve this problem 1578 chromosomes from 47 metaphases were used. The constructed classifier was checked with the use of additional sample of metaphases classified in fully automatic regime: error rate was 8.2 %, this corresponds to 3.12 ± 0.26 errors per metaphase plate (these values are within acceptable limits for such kind of studies). In further studies the extra sample of pig acrocentric chromosomes was added to classifier up to 1807 chromosomes. This addition reduced the error rate up to 6.1 %, which corresponds to 2.78 ± 0.18 errors per metaphase plate. It should be underlined that the revealed errors can immediately be corrected by an operator on every stage of analysis. The classifier was also verified using the chromosomes of boar with rcp(1p-; 11p+) in fully automatic regime and routine stained metaphases of Siberian minipigs with rob(16;17) in semi automatic regime. In both cases the chromosomes were identified correctly. The area of application of obtained pig automatic chromosome classifier is discussed.

Key words: pig chromosome, karyotyping, automatic classification, «VideoTest-Karyo 3.1» image processing software.