

УДК 57.084.1

ПРОГРАММНАЯ СИСТЕМА АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА ПОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В БИМЕДИЦИНСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

Суконкин И. Н.

Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия (115409, Москва, Каширское ш., 31), e-mail: chaosstruct@gmail.com

Рассмотрен актуальный вопрос автоматизации анализа результатов биологических экспериментов. Предложена методика структурирования процесса исследования экспериментальных данных и его декомпозиции на последовательно выполняемые этапы: видеотрекинг, вычисление характеристик поведения, предобработка данных, выделение актов поведения, построение графических схем результатов. Для каждого этапа анализа приведено описание алгоритмов и разработанных программных инструментов, позволяющих автоматизировать их проведение. Программные средства выделения актов поведения лабораторных животных основаны на оригинальных алгоритмах авторов. Все программные инструменты собраны в единую систему EthoPlayer. Рассмотрен специальный графический язык описания протокола исследования экспериментальных данных. Разработанные средства позволили существенно снизить стоимость проводимых биологических исследований, повысить достоверность результатов и получить новые обобщенные описания поведения.

Ключевые слова: биологический эксперимент, акт поведения, лабораторное животное, автоматизированный анализ, программная система.

SOFTWARE SYSTEM FOR AUTOMATED ANALYSIS OF LABORATORY ANIMALS BEHAVIOUR IN BIOMEDICAL EXPERIMENTS

Sukonkin I. N.

National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia (115409, Moscow, Kashirskoe shosse, 31), e-mail: chaosstruct@gmail.com

The problem of automated analysis of biological experiments results is under consideration. Method of structuring the research process and the experimental data decomposition is proposed. Analysis of experimental data is divided into some stages: video tracking, calculation of the characteristics of behavior, data preprocessing, selection of behavioral acts, construction of graphical charts of the results. The paper presents the detailed description of the algorithms and software tools that automate their performance for each step of the analysis. Software tools for finding behavior acts of laboratory animals based on the original authors' algorithms. All software tools are integrated into a system «EthoPlayer». The graphic description language that can describe the protocols of biological experiments analysis is considered. The developed tools will significantly reduce the cost of biological researches, enhance the reliability of the results and get a new generic description of the behavior.

Key words: biological experiment, the act of behavior, laboratory animal automated analysis, software system.

Введение

Биологические эксперименты с лабораторными животными (ЛЖ) являются неотъемлемой частью научных исследований в областях создания лекарственных препаратов, разработки новых когнитивных технологий, распознавания средств психологического воздействия на живые организмы. На передний план выходят задачи создания эффективных технологических и программных инструментов анализа экспериментальных данных.

Методические разработки отечественных и зарубежных коллективов [1, 5] в рассматриваемой области основаны на математических технологиях 3 – 5 летней давности и

не дают необходимого инструментария для динамично развивающейся области когнитивных и нейробиологических исследований. Существующие программные продукты являются разрозненными по типу графического интерфейса пользователя, функционируют по различным протоколам и имеют плохо совместимые интерфейсы передачи данных. Это ведет к значительным затратам времени и финансов на покупку лицензий на каждое ПО, обучение персонала работе с широким кругом программных пакетов и постоянной конвертации данных из представления одной системы в представление другой, причем часто с потерей точности.

Исходными данными для анализа поведения являются траектории передвижения ЛЖ [1]. Анализ поведения предполагает решение ряда задач: расчет характеристик подвижности животного; выделение актов поведения животного; вычисление интегральных информативных показателей поведенческой последовательности и распознавание типа поведения; построение статистического анализатора для проверки наличия устойчивой связи типа поведения и воздействия на животное внешних факторов; подготовка отчетов о полученных результатах анализа экспериментальных данных. Ряд зарубежных компаний (Noldus (Голландия), TSE (Германия), Clever Sys (США)) активно работают над созданием систем автоматического анализа поведения и создают коммерческие продукты, имеющие распространение в различных лабораториях мира. В России наиболее успешные попытки создания подобных систем были предприняты в НИИ НФ им. П. К. Анохина РАМН (программные системы EasyTrack и SegmentAnalyzer). Однако функциональность как отечественных, так и зарубежных разработок пока не соответствует современным требованиям биологических и медицинских исследований.

Схема анализа биологического эксперимента

Процесс анализа данных эксперимента имеет ряд промежуточных результатов, доступных для биологической интерпретации [3]. На рис. 1 приведена схема возможных направлений анализа. Отмечены этапы анализа, которые в системе EthoPlayer проводятся в автоматическом режиме или выполняются исследователем в диалоговом режиме при помощи автоматизированных средств. Выполнение анализа экспериментальных данных согласно приведенной схеме позволяет максимально полно задействовать программные средства автоматизации, предоставляемые системой EthoPlayer и свести работу экспертов к построению биологических интерпретаций для полученных численных результатов. Последовательно рассмотрим особенности автоматизации всех этапов обработки экспериментальных данных.

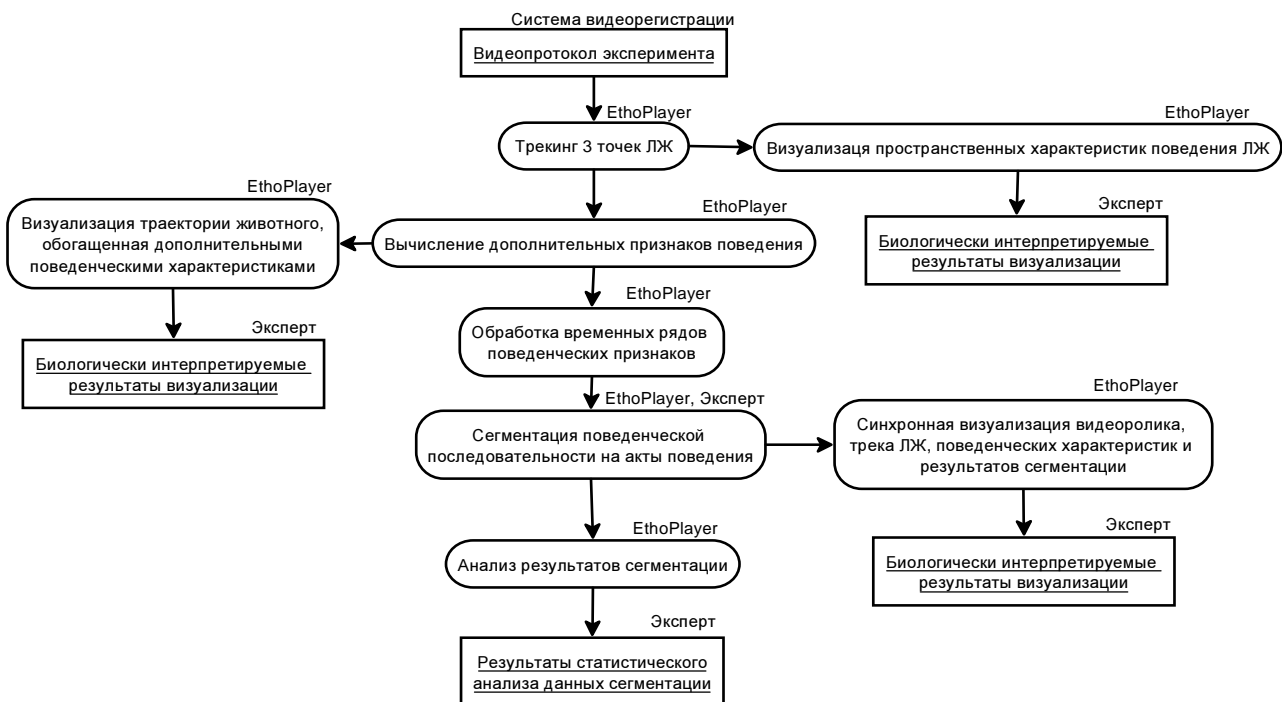


Рис. 1. Схема анализа результатов экспериментов с лабораторными животными

Трекинг трех ключевых точек лабораторного животного

Процедура предназначена для определения положения и позы ЛЖ в каждый момент времени на основе видеопотока. Она основана на методах анализа изображений, таких как вычитание фона, поиск движения и скелетизация бинарной маски [6].

В связи с интенсивными передвижениями лабораторного животного по арене в поведенческих экспериментах состояние покрытия арены может изменяться, предметы могут изменять свое положение. Эксперименты в водных лабиринтах также характеризуются изменяющимся задним планом. В работе использована модель заднего плана, основанная на смеси нормальных распределений яркости. За счет постоянной адаптации такая модель позволяет определять положение животного даже в условиях изменяющегося фона и зашумленности видеозаписи.

Настраиваемыми параметрами алгоритма трекинга являются: минимальные и максимальные размеры ЛЖ, максимальная скорость перемещения ЛЖ, окрас животного (темное ЛЖ на светлом фоне или наоборот), пороги бинаризации для вычитания фона и т.д. Эти параметры предназначены для проведения дополнительных проверок и оптимизации работы алгоритмов.

Вычисление поведенческих характеристик лабораторного животного

Для численного описания поведения в системе реализованы алгоритмы вычисления поведенческих характеристик животного. Поведенческие характеристики описывают состояние лабораторного животного в каждый момент времени, но вычисление их мгновенных значений затруднено из-за зашумления координатных данных. Предлагается

рассчитывать поведенческие характеристики в некотором временном окне. Для траекторных данных это допустимо ввиду того, что они регистрируются с частотой 25-30 Гц, а все значимые акты поведения имеют длину не менее половины секунды.

Система позволяет в любой момент времени вычислять следующие характеристики.

Расстояние до объектов интереса: $R_{\text{int}}^{(j)} = \sqrt{(x_c - x_{\text{int}}^{(j)})^2 + (y_c - y_{\text{int}}^{(j)})^2}$, где j – номер объекта интереса, $(x_{\text{int}}^{(j)}, y_{\text{int}}^{(j)})$ – его координаты, (x_c, y_c) – координаты геометрического центра масс животного.

Модуль линейной скорости. Рассчитывается усреднением по временному окну шириной w , равной 5 – 7 временных отсчетов. Перемещение ЛЖ оценивается по перемещению его центра масс:

$$|V(t)| = \frac{\sqrt{(x_c(t - w/2) - x_c(t + w/2))^2 + (y_c(t - w/2) - y_c(t + w/2))^2}}{w}.$$

Локальная кривизна траектории. Используется для оценки интенсивности криволинейного типа движения ЛЖ, вычисляется во временном окне согласно формуле:

$$|\omega(t)| = \frac{\sum_{i=(-w/2)+1}^{w/2} \sqrt{(x(t-i) - x(t))^2 + (y(t-i) - y(t))^2}}{\sqrt{(x(t-w/2) - x(t+w/2))^2 + (y(t-w/2) - y(t+w/2))^2}}.$$

Скорость вращения животного вокруг геометрического центра масс. Позволяет оценить интенсивность вращательных движений, когда ЛЖ находится практически на одном месте и показатели кривизны траектории неустойчивы. Для вычисления используется скалярное произведение векторов, соединяющих геометрический центр масс ЛЖ и кончик носа в разные моменты времени.

Ускорение центра масс ЛЖ. Используется для описания динамичности передвижения лабораторного животного.

Длина и угол изгиба тела животного позволяют описать позу животного. Важны при исследовании деятельности ЛЖ на одном месте. Длина животного определяется как сумма расстояний от основания хвоста до геометрического центра масс и от центра масс до кончика носа.

Средства предобработки экспериментальных данных

Данные, поступающие от системы видеотрекинга, нуждаются в предварительной обработке, без которой нельзя эффективно проводить анализ поведения.

Нормировка данных. Нормировка заключается в отображении диапазона значений временного ряда на диапазон $[0, 1]$.

Система EthoPlayer предлагает несколько подходов к нормировке данных.

а). Если при обработке поведенческих данных нескольких животных требуется учитывать индивидуальные особенности каждого ЛЖ, то нормировочные коэффициенты вычисляются по совокупности проб всех животных.

б). Если требуется привести ряды поведенческих признаков всех животных к некоторому стандартному типу и устранить индивидуальные особенности каждого животного, то нормировочные коэффициенты вычисляются для каждого ЛЖ в отдельности.

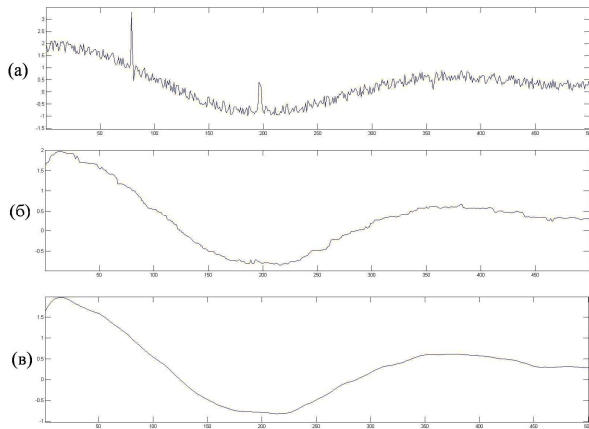


Рис. 4. Пример применения фильтров для «улучшения» данных: (а) – исходный временной ряд, (б) – временной ряд после применения медианного фильтра, (в) – временной ряд после применения фильтра с ядром Гаусса

скачкообразных искажений (выбросов) в результатах трекинга, гауссовы фильтры используются для устранения аддитивного шума (рис. 4).

Визуализация пространственных характеристик поведения ЛЖ

В системе EthoPlayer реализована возможность составления серии графических документов, отражающих особенности поведения.

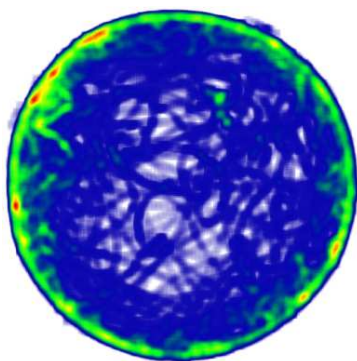


Рис. 3. Карта посещения

Фильтрация данных. Для обработки временных рядов поведенческих признаков в системе EthoPlayer используются два фильтра: медианный и сглаживающий с гауссовым ядром. Размер ядра фильтра выбирается из соображений минимизации потерь полезной информации. Поскольку частота дискретизации поведенческих признаков составляет 25–30 Гц, а наименьшая длительность значимого акта поведения – 0,5 секунды, то типовым размером ядра является 5 – 7 временных отсчетов. Медианные фильтры применяются для устранения

1) *Карта посещения* позволяет описать неоднородность покрытия траекторией движения ЛЖ площади экспериментальной арены. Яркость каждой точки карты характеризует относительную частоту её посещения животным (вместо яркости может использоваться цветовая шкала). Пример карты посещения приведен на рисунке 3.

2) *Окраска траектории актами поведения.* В этой визуализации цвет фрагментов траектории определяется номером акта поведения, который совершает ЛЖ.

Подобная визуализация используется для определения пространственной специализации разных типов поведенческой активности.

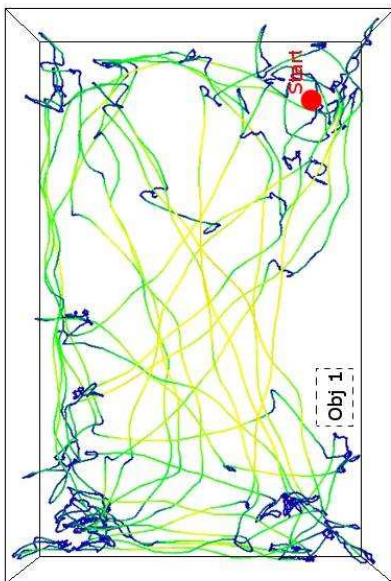


Рис. 2. Визуализация трека ЛЖ с "окраской" значениями скорости, разметкой арены и объектов интереса

скорости соответствуют теплые цвета, а маленьким – холодные.

3) *Простая визуализация трека* позволяет оценить особенности поведения ЛЖ по отношению к различным объектам на экспериментальной арене. Позволяет определить наличие таксисов и стереотипий в поведении. Кроме траектории движения ЛЖ, в такой схеме отображаются ключевые точки экспериментальной установки, объекты интереса.

4) *Визуализация трека, "окрашенного" значением скорости.* Подобная визуализация позволяет экспертам определить, как быстро ЛЖ преодолеvalo те или иные участки экспериментальной арены (рис. 2). Окраска трека производится согласно цветовой шкале, на которой большим значениям

Выделение актов поведения лабораторного животного

Большинство задач обобщенного описания и анализа поведения требуют разбиения поведенческого трека (многомерного временного ряда характеристик поведения) на акты поведения. Под актом поведения понимают некоторую единицу деятельности, которая описывает сложное действие, совершаемое как ответ на внешний или внутренний раздражитель, направленное на достижение желаемого результата. Примерами актов поведения служат: побегка, груминг, стойка с опорой и т.д. В разработанной системе реализовано три оригинальных метода для выделения актов поведения. Для случая, когда акты поведения могут быть описаны квазипостоянными значениями характеристик поведения, используется *метод оптимальной сегментации при помощи эволюционных алгоритмов* [4]. Если акт поведения характеризуется сложной динамикой поведенческих признаков, то применяется *метод сегментации на основе нейросетевого комитета прогностических перцептронов*. В случае, когда признаки поведения слабо коррелированы и могут быть описаны квазипостоянными значениями признаков, применяется *метод, основанный на анализе распределений длин одномерных сегментов*.

Обобщенное описание поведения

В системе EthoPlayer реализована процедура построения поведенческого портрета ЛЖ на основе относительных частот реализации разных актов поведения. Используя такой поведенческий портрет, система позволяет оценить интенсивность использования заданной стратегии при решении тестовой задачи. Для верхней оценки этого показателя используется

соотношение: $\alpha_{\lambda}^{(crit)} = \min_{i=1, K} \frac{\tilde{p}_i}{p_i^{(\lambda)}}$, где \tilde{p}_i – элемент поведенческого портрета исследуемого ЛЖ (относительная частота реализации акта с номером i); $p_i^{(\lambda)}$ – аналогичная частота, вычисленная для выборки проб при использовании лабораторными животными стратегии поведения λ ; K – количество разных актов поведения.

Графический язык для описания процесса анализа экспериментальных данных

Для проведения автоматической обработки экспериментальных данных в системе EthoPlayer схема анализа описывается на специальном графическом языке GEPS (Graphical EthoPlayer Script). Этот язык объединяет в себе язык запросов на отбор и группировку экспериментальных данных и язык описания процесса обработки. Запросы отбора и группировки данных могут быть построены с использованием понятий: идентификатор ЛЖ и группы животных, номер сеанса и пробы эксперимента. На рис. 5 приведен пример скрипта, описывающего схему обработки результатов тестов на пространственную память в водном лабиринте Морриса (исследуется зависимость выраженности стратегии "тигмотаксис" от номера пробы в первом сеансе).

Процесс исполнения созданной пользователем программы действий сопровождается отображением процесса на блок-схеме и автоматически комментируется в виде текстовых сообщений.

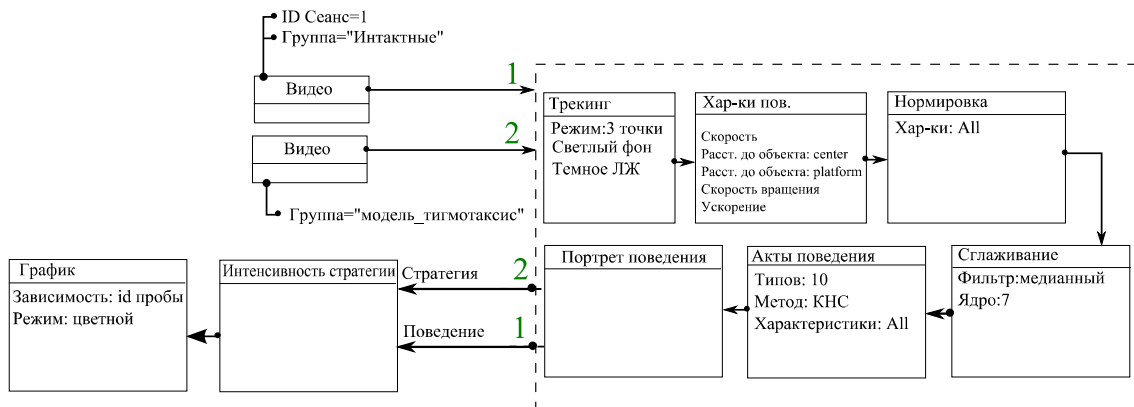


Рис. 5. Пример описания процесса анализа экспериментальных данных на языке GEPS

Заключение

Система EthoPlayer была успешно использована для обработки биологических экспериментов в установках «открытое поле», «домашняя клетка» и «водный лабиринт Морриса», направленных на изучение влияния фармакологических препаратов на когнитивные способности животных с навязанными моделями болезней [2] (болезнь Альцгеймера и др.). Разработанная система поддерживает расширение функциональности за счет внедрения новых модулей.

Список литературы

1. Cherepov A., Mukhina T., Anokhin K. Automatic segmentation of mouse behavior during video tracking in home cages // 5th Int. Conf. on Methods and Techniques in Behavioral Research "Measuring Behavior 2005". – 2005.
2. Gordon R. Ya., Makarova E. G., Podolskii I. Ya., Rogachevskii V. V., and Kordonets O. L. Impairment of Protein Synthesis Is an Early Effect of Amyloid- β in Neurons // Neurochemical Journal. – 2012. – Vol. 6, № 2. – P. 139-149.
3. Magnusson M. S. Analyzing complex real-time streams of behavior: repeated patterns in behavior and DNA // L'Éthologie Appliquée Aujourd'hui. – 2003. – Vol. 3. – P. 25-36.
4. Mishulina O.A., Sukonkin I.N. Multivariate time series segmentation for generalized description of dynamic systems operation // Optical Memory & Neural Networks (Information Optics). – 2012. – Vol. 21, № 2. – P. 94-104.
5. Noldus L. P. The Observer Video-Pro: New Software for the Collection, Management, and Presentation of Time-Structured Data From Videotapes and Digital Media Files /L. P. Noldus, R. J. Trienes, A. H. Hendriksen, H. Jansen, R. G. Jansen / Behavior research methods instruments and computers. – 2000. – Vol. 32. – P. 197-206.
6. Prati A. Shadow Detection Algorithms for Traffic Flow Analysis: a Comparative Study / A. Prati, I. Mikic, C. Grana, M. M. Trivedi // Intelligent Transportation Systems. – 2001. – P. 340-345.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ нормальной физиологии имени П. К. Анохина РАМН и Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН за полезные консультации по вопросам поведения живых систем, рекомендации по представлению результатов анализа экспериментальных данных и за предоставленные данные видеонаблюдений в лабораторных экспериментах.

Разработка системы анализа экспериментальных данных проведена при поддержке федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России": проекты П1052 и П264.

Рецензенты:

Редько Владимир Георгиевич, д.ф.-м.н., зам. руководителя Центра оптико-нейронных технологий Научно-исследовательского института системных исследований РАН, г. Москва.
Щукин Борис Алексеевич, д.т.н., профессор, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Москва.