

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛГОРИТМОВ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

К.Н. Ляхова<sup>1</sup>, Д.М. Утина<sup>1,2</sup>, Ю.С. Северюхин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория радиационной биологии, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>2</sup> Университет «Дубна», г. Дубна, Московская область, ул. Университетская, 19

E-mail: lyakhovakn@mail.ru

Работа посвящена исследованию алгоритмов компьютерного зрения для анализа экспериментальных данных. Исследование проводится с использованием экспериментальных данных сектора радиационной физиологии Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ, полученных в ходе изучения влияния ионизирующего излучения на поведенческие реакции лабораторных животных в тестовых установках «Открытое поле», «Водный лабиринт Морриса», «Т-лабиринт». Во время тестирования животных производится видеорегистрация их поведения с использованием программного комплекса EthoVision XT 13 (Noldus Technology, Нидерланды). Как правило на обработку видеофайлов одного эксперимента уходит около 2 недель, в зависимости от количества групп животных. При обработке видеоматериала сотрудники сектора радиационной физиологии сталкиваются с рядом проблем, связанных с недостатками программы EthoVision XT 13. В связи с этим представляется актуальным внедрение алгоритмов компьютерного зрения для упрощенного анализа экспериментальных данных при исследовании поведения лабораторных животных.

Ключевые слова: поведение, «Открытое поле», Т-лабиринт, Водный лабиринт, мыши, крысы, эмоциональный статус, ориентировочно-исследовательская реакция, центральная нервная система, радиобиология, ионизирующая радиация.

Кристина Ляхова, Дина Утина, Юрий Северюхин

Copyright © 2020 for this paper by its authors.

Use permitted under Creative Commons License Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

## 1. Введение

В настоящее время в нейрорадиобиологии остро стоит вопрос о модификации нарушений высших интегративных функций центральной нервной системы (ЦНС) средствами фармакохимической защиты при действии ионизирующих излучений (ИИ) с разными физическими характеристиками. Широкое применение источников ионизирующей радиации в различных сферах деятельности человека повышает вероятность поражения людей факторами радиационной природы как при авариях и инцидентах на объектах ядерной энергетики, так и в условиях повседневной жизни. Современный период развития науки в мире и в нашей стране в частности характеризуется увеличением числа и масштабов аварий и радиационных инцидентов на предприятиях ядерно-энергетического комплекса [1]. Потенциальную угрозу для человека представляет не только источники ядерной энергетики, но и медицинские и научные источники ионизирующего излучения. Становятся более разнообразными условия воздействия на человека и формирующиеся при этом формы лучевого поражения [2]. Описанию влияния ИИ на ЦНС посвящено большое количество исследований и фундаментальных монографий [3, 4], однако механизм действия ИИ до конца не изучен.

Действие ионизирующего излучения на ЦНС представляется комплексом сложных биохимических и морфофизиологических процессов, проявляющихся в широком диапазоне доз, неподдающихся, как правило, прямой дозовой зависимости. С началом космических полетов возникла задача оценить опасность клеточных повреждений в результате воздействия заряженных частиц, входящих в состав галактических космических лучей (ГКЛ), воздействию которых подвергаются космонавты в полетах за пределы околоземной орбиты. Данные о развитии радиационных повреждений при действии тяжелых заряженных частиц (ТЗЧ) на структуры головного мозга, и приводящих к нарушениям его интегративной целостности, дают основания рассматривать ЦНС как «критическую» систему при оценке риска радиационного воздействия на организм космонавтов при осуществлении межпланетных полетов [5]. При длительных космических полетах важно учитывать радиобиологические эффекты космической радиации на ЦНС, в частности на такие структуры как гиппокамп и мозжечок. Известно, что ТЗЧ, воздействуя на организм космонавта вызывают нарушения когнитивных функций [6]. В ряде работ у космонавтов описывались некоторые когнитивные дисфункции, сходные с острым воздействием ИИ, такие как нарушения кратковременной памяти, осложнения пространственной ориентации, изменение циркадных ритмов, усталость и нейропсихологические изменения (McPhee, Charles, 2009; Strangman et al., 2014).

Нарушение условно-рефлекторной деятельности у крыс было отмечено при облучении в дозе 30-40 мГр [7]. Также парадоксальные эффекты в действии малых доз ионизирующего излучения на ЦНС были зарегистрированы и на генном уровне [8]. При облучении в дозе 100 мГр в головном мозге мышей спустя несколько часов была обнаружена индукция генов, сходных с генами головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, в то время как при высокой дозе облучения – 2 Гр – таких эффектов не отмечено. В отдаленные периоды (через 1-2 года) после облучения в дозе 100 мГр у мышей отмечались лишь незначительные нарушения пространственной обучающей способности и памяти [9]. Облучение крыс и мышей ионами  $^{56}\text{Fe}$  с энергией 1 ГэВ в дозах 0.1-2.0 Гр приводит к нарушениям обучения в батарее тестов, направленных на оценку пространственной (Cherry et al., 2012; Haley et al., 2013) и рабочей памяти (Lonart et al., 2012). Данные результаты находят своё подтверждение в ходе облучения крыс  $^{28}\text{Si}$  1 ГэВ/н 1 Гр и  $^{48}\text{Ti}$  1.1 ГэВ/н дозами 0,5 и 1 Гр, что сопровождалось

отдаленными когнитивными нарушениями спустя 3-12 месяцев после облучения (Rabin, Carrihill-Knoll, Shukitt-Hale, 2011). Облучение мышей ионами  $^{12}\text{C}6+$  с энергией 284.7 МэВ (ЛПЭ=25.6 КэВ/нм) в дозе 4Гр приводило к увеличению времени поиска платформы в водном лабиринте Морриса, что свидетельствует о нарушении пространственной памяти и ориентации (Xie et al., 2014). Анализ когнитивных способностей у пациентов спустя длительное время (более года) после облучения показывает возможные отдаленные эффекты ионизирующего излучения, такие, как падение скорости обработки информации, ухудшение памяти, внимания и обучения. При этом подобные симптомы отсутствовали непосредственно во время проведения лучевой терапии, а при использовании только химиотерапии для лечения опухолей не проявлялись вовсе. (Goldberg, Bloomer, Dawson, 1982; Keime-Guibert, Napolitano, Delattre, 1998).

## 2. Материалы и методы радиобиологических исследований

Все эксперименты по исследованию влияния ИИ на поведенческие реакции проводят на мелких лабораторных животных – крысы, мыши. Выбор линии животных зависит от поставленной цели исследования. Обычно исследования проводят на крысах линии *Sprague Dawley* и мышках линий *ICR (CD-1)* и *C57 black*. В ходе всего эксперимента животные содержатся в стандартных лабораторных условиях и имели свободный доступ к воде и корму.

Облучение животных протонами или гамма квантами проводится в Медико-техническом комплексе ОИЯИ.

Оценка поведенческих реакций лабораторных животных проводят путем тестирования на установках «Открытое поле», «Водный лабиринт Морриса», а также «Т-лабиринт» со спонтанным чередованием (НПК Открытая Наука, Россия).



Рис.1. Тестовые установки: а-«Открытое поле» и Т-лабиринт (для мышей и крыс); б- Водный лабиринт Морриса

«Открытое поле» (ОП) – тестовая установка, которая предназначена для изучения поведения лабораторных животных в новых стрессогенных условиях и позволяет оценить выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов (паттернов); уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного («седацию-ажитацию»); стратегию исследовательского/оборонительного поведения;

привыкание; запоминание обстановочных стимулов; симптомы неврологического дефицита; локомоторную стереотипию, вызванную введением ДА-миметиков.

Установка является классической моделью исследования поведения грызунов, основанная на конфликте двух мотиваций - инстинктивной тенденции к исследованию нового окружения и тенденции минимизировать возможную опасность со стороны такового. Тест ОП является информативной методикой, позволяющей адекватно оценивать нейротропные эффекты повреждающих факторов окружающей среды. Время тестирования одного животного – 6 минут. Во время тестирования животного производится видеорегистрация поведения с использованием программного комплекса EthoVision XT 13 (Noldus Technology, Нидерланды). Производится автоматический анализ: общей пройденной дистанции (см); общей средней скорости (см/с); пройденной дистанции в пристеночной, промежуточной и центральной зоне арены (см); времени, пройденного в пристеночной, промежуточной и центральной зоне арены (с); видеотрекинг и тепловая карта перемещения животного в арене.

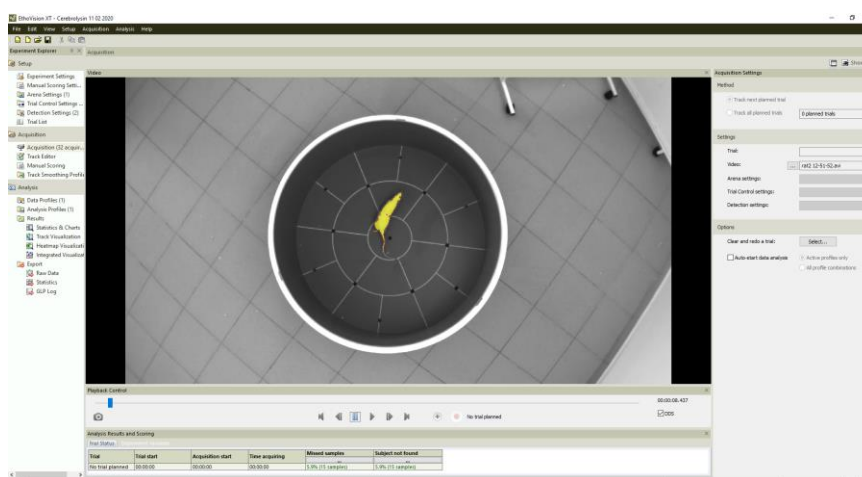


Рис. 2. Тестирование животного в “Открытом поле” с использованием программного комплекса EthoVision XT 13 (Noldus Technology, Нидерланды)

«Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ). Установка является одной из основных моделей для исследования пространственной памяти и процесса обучения у лабораторных грызунов. ВЛМ используется для изучения нарушений памяти, обучения и механизма их фармакологической коррекции [10]. Также тест имеет широкое применение в экспериментах по изучению нейропротекторного действия нейротрофических факторов [11-15].

Тест состоит из двух частей: обучения и проверки.

Обучение. В течение последовательных 4 дней крыс обучают находить платформу. Ежедневное обучение включает 3 попытки на каждое животное с интервалом 30 с. Арену визуально делят на 4 сектора. В ходе попыток животное последовательно помещают во второй, третий и четвертый (по часовой стрелке от целевого, целевой – сектор с платформой). Движения животного регистрируется цифровой видеокамерой. Тестирование проводится при тусклом свете, 70 люкс. Если животное не находит платформу в течение минуты, то его принудительно помещали на нее. В обоих случаях животное оставляют на платформе в течение 15 секунд. Успешность обучения оценивают по уменьшению таких параметров как: латентное время освобождения (с), в течение которого крыса находит платформу и забирается на нее; путь (см), который животное проходит от места помещения в воду до платформы; кумулятивную дистанцию между центром животного и платформой (см).

Проверка. На 5 день тестирования из бассейна убирают платформу. Проверка включает в себя также 3 попытки на каждое животное с интервалом 30 с. Животное последовательно помещают во второй, третий и четвертый сектор, однако время тестирования уже составляет 60 секунд. Если животное запомнило положение платформы, то большую часть времени оно будет находиться в целевом секторе.

Во время тестирования производится видеорегистрация поведения с использованием программного комплекса EthoVision XT 13 (Noldus Technology, Нидерланды). Во время тестирования производится автоматический подсчет следующих показателей: 1) латентное время освобождения (с), в течение которого крыса находит платформу и забирается на нее; 2) путь (см), который животное проходит от места помещения в воду до платформы; 3) кумулятивную дистанцию между центром животного и платформой (см), которую вычисляем как сумму всех расстояний между геометрическим центром крысы и центром платформы. Если животное не находит платформы, то латентное время принимается равным 60 секунд. Для каждого дня вычисляется среднее значение латентного времени, пройденного пути и кумулятивной дистанции по 3 попыткам. На 5 день тестирования отслеживается в какой из 4х зон животное находится больше всего времени: вычисляется среднее значение времени по 3м попыткам. Также строится тепловая карта и видеотрекинг перемещения животного по арене.

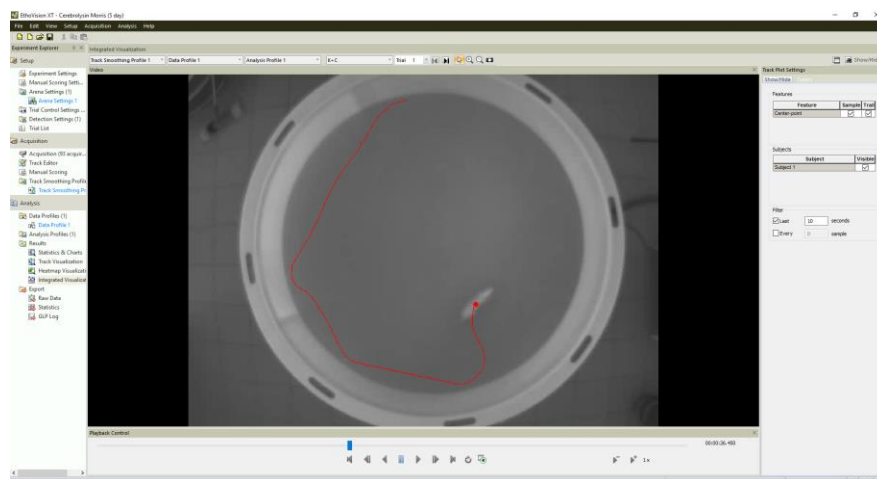


Рис. 3. Трекинг животного в “Водном лабиринте Морриса” с использованием программного комплекса EthoVision XT 13 (Noldus Technology, Нидерланды)

“Т-лабиринт” – установка, предназначенная для исследования рабочей памяти лабораторных грызунов, лежащую в основе поведения чередования рукавов (спонтанного или подкрепленного).

За 40-50 минут до тестирования необходимо поместить животных в комнату, где будут проходить испытания для адаптации животных и снижения стрессовых реакций. Время тестирования – 1,5-2 мин на испытание. На каждое животное 2 попытки. Промежуток между попытками – 60 сек. На начало тестирования дверцы правого и левого рукава открыты, дверца стартового плеча закрыта. Крысу помещают в стартовое плечо лабиринта и оставляют на 60-90 секунд. По истечении времени открывают дверцу стартового плеча и позволяют выбрать животному один из рукавов. Как только крыса полностью зашла в рукав, необходимо закрыть дверцу выбранного рукава. Вторая попытка проводится по аналогичной схеме. При анализе данных регистрируется процент чередования (количество поворотов в каждом плече цели) и общая продолжительность испытания (время достижения цели).

### **3. Экспериментальные работы**

Для использования алгоритмов компьютерного зрения создана база данных видеофайлов. Были взяты видеоматериалы двух экспериментов:

Эксперимент №1. Изучение комбинированного действия цитостатического действия препарата цитарабин и ускоренных протонов на поведенческие реакции лабораторных грызунов.

Эксперимент был проведен на 28 половозрелых крысах самцах линии Sprague Dawley, возраст 8-10 недель. Животные были распределены на 4 группы: 1–контроль, 2–контроль+АраЦ, 3–протоны, 4–протоны+АраЦ. Облучаемым и контрольным животным вводили дозу Ара-Ц 0,4 г/м<sup>2</sup> за 1-1,5 ч до облучения в хвостовую вену. Крысы были облучены протонами на пролет (тотально) в кранио-каудальном направлении на медицинском пучке фазотрона Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна). Доза облучения составила 3 Гр, средняя энергия – 170 МэВ, мощность дозы облучения – 0,8 Гр/мин. Животных фиксировали и облучали в специальных индивидуальных контейнерах. На 1, 30 и 90 сутки после облучения проводили оценку поведенческих реакций в «Открытом поле», «Водном лабиринте Морриса» и «Т-лабиринте».

Эксперимент №2. Поведенческие показатели половозрелых крыс, облученных протонами при внутрибрюшинном введении препарата «Церебролизин».

Эксперимент был проведен на 32 самцах крыс линии Sprague Dawley, возраст 8-10 недель. Животные были распределены на 4 группы: 1–Контроль+Церебролизин; 2–Контроль; 3–протоны 4Гр+Церебролизин; 4–протоны 4 Гр. Крысы были облучены ускоренными протонами тотально напролет на медицинском пучке фазотрона Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна). Доза облучения составила 4 Гр, средняя энергия – 170 МэВ, мощность дозы облучения – 0,7 Гр/мин. Животных фиксировали и облучали в специальных индивидуальных контейнерах. После облучения животным из групп №1 и №3 делали внутрибрюшинные инъекции «Церебролизина» (2,5 мл/кг, 1 мл). По аналогичной схеме вводили физиологический раствор животным из группы № 2 и 4. Препарат вводили 1 раз в день на протяжении 14 суток. На 50-е сутки после облучения проводили оценку поведенческих реакций в «Открытом поле» и «Т-лабиринте», в «Водном лабиринте Морриса»– на 60 сутки.

### **4. Трудности при обработке данных радиобиологических экспериментов**

При обработке экспериментальных данных возник ряд трудностей, связанных с недоработками используемого программного обеспечения:

1. В используемом ПО невозможно отслеживать индивидуальные поведенческие показатели (вертикальные стойки, норки, груминг, замирание, движение на месте) животных в тесте «Открытое поле», из-за этого приходится повторно просматривать видеоматериал и вручную подсчитывать необходимые показатели. Обработка видеофайлов одного эксперимента вручную в среднем занимает около 2 недель;

2. При тестировании животных в водном лабиринте Морриса возникают проблемы при обработке трекинга животного. Из-за наличия бликов на поверхности воды производится не корректное отслеживание животного (обрывание трека, происходит фокусировка не на животном, а на блике). Схожая ситуация обстоит и при занывании животного во время тестирования.

По мере проведения большого количества экспериментов накапливается большой массив данных. Один видеоролик при работе с установкой “Водный лабиринт Морриса” занимает около 2 Мб, в Открытом поле - 100 Мб, в Т-лабиринте - 10 Мб. Отснятый видеоматериал по указанному эксперименту №1 занимает 10 Гб памяти, по эксперименту №2–5 Гб. Количество подобных экспериментов в год варьируется от 3 до 5. Хранение данных требует единого информационного пространства с одновременным доступом всех участников эксперимента. Отсутствие такого хранилища чревато потерей важных данных в случае непредвиденных аварийных ситуаций.

## **5. Заключение**

В работе представлена актуальность использования алгоритмов компьютерного зрения для анализа экспериментальных данных. Несмотря на наличие в используемом программном комплексе Noldus EthoVision автоматической регистрации и построения трекинга и тепловой карты, анализа скорости в арене и др., остаются показатели поведения, которые автоматически не регистрируются. Из-за чего приходится повторно обрабатывать полученный видеоматериал вручную, на что уходит большое количество времени (до 2 недель на один эксперимент). В связи с этим считается актуальным внедрение алгоритмов компьютерного зрения для автоматизации обработки данных. Также необходимо создание единого информационного пространства для хранения экспериментальных данных, накопленных по мере проведения радиобиологических исследований.

## **Список литературы**

- [1] Аветисов Г.М., Гончаров С.Ф. Медицинские и санитарно-гигиенические проблемы ликвидации последствий радиационных аварий // Медицина катастроф. Медицины // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2008. №3 (23). Прил. 1. С. 176.
- [2] Тураи И. Уроки, которые следует извлечь из медицинской помощи, оказанной при недавних радиационных авариях // Мед. радиол. и радиацион. безопасность. 2006. Т. 51. № 5. С. 80–82.
- [3] Даренская Н.Г. Радиационные поражения центральной нервной системы // Радиационная медицина в 4 т. Т1. Теоретические основы радиационной медицины. М., 2004. С 315–326.
- [4] Давыдов Б.И., Ушаков И.Б., Федоров В. П. Радиационные поражения головного мозга. М., 1991.
- [5] Grigoriev, A.I., Krasavin, E.A., Ostrovsky M.A. On the risk assessment of the biological action of galactic heavy ions under interplanetary flight conditions. Russian journal of physiology. 2013; 99 (3): 273-80.
- [6] Parihar V.K., Allen B., Tran K.K. et al. What happens to your brain on the way to Mars// Sci. Adv. 1 May 2015. V. 1. № 4. e1400256.
- [7] Лившиц Н.Н. Влияние ионизирующих излучений на функции центральной нервной системы. М.: АН СССР, 1961

- [8] Lowe X.R., Bhattacharya S., Marchetti F., Wyrobek A.J. Early brain response to low-dose radiation exposure involves molecular networks and pathways associated with cognitive functions, advanced again and Alzheimer's disease. *Radiat. Res.* 2009. V. 171. № 1. P. 53-65.
- [9] Wang B., Tanaka K., Ji B. et al. Total body 100 mGy X-irradiation does not induce Alzheimer's disease – like pathogenesis or memory impairment in mice. *Radiat. Res.* 2014. V. 55. № 1. P. 84-96.
- [10] D'Hoodge, R. and De Deyn, P.P., Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory // *Brain Res.*, 2001, vol. 36, pp. 60–90.
- [11] Tandon P., Yang Y., Das K., Holmes G.L., Stafstrom C.E. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in seizures during development // *Neuroscience*. 1999;91(1):293-303.
- [12] Blaha G.R., Raghupathi R., Saatman K.E., McIntosh T.K. Brain-derived neurotrophic factor administration after traumatic brain injury in the rat does not protect against behavioral or histological deficits // *Neuroscience*. 2000;99:483-493.
- [13] Cirulli F., Berry A., Alleva E. Intracerebroventricular administration of brain-derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behavior but not memory retention in a Morris water maze task // *Neurosci. Lett.* 2000;287:207-210.
- [14] Cirulli F., Berry A., Chairotti F., Alleva E. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus- maze // *Hippocampus*. 2004;14:802-807.
- [15] Kulikov A.V., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Bazovkina D.V., Kulikov V.A., Naumenko V.S., Bazhenova E.Y., Popova N.K. Spatial learning in the Morris water maze in mice genetically different in the predisposition to catalepsy: the effect of intraventricular treatment with brain-derived neurotrophic factor // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014; 122:266-272.



# **USE OF COMPUTER VISION ALGORITHMS FOR THE ANALYSIS OF DATA FROM BEHAVIORAL EXPERIMENTS ON LABORATORY ANIMALS**

**K.N. Lyakhova<sup>1</sup>, D.M. Utina<sup>1,2</sup>, Yu.S. Severiukhin<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia*

<sup>2</sup> *Federal of State-Funded Educational Institution of Higher Education of Moscow Region "Dubna University", Dubna, Russia*

E-mail: lyakhovakn@mail.ru

This work is focused on the study of computer vision algorithms for the analysis of experimental data. The study is carried out using experimental data from the radiation physiology sector of the Laboratory of Radiation Biology of JINR, which were obtained in the course of studying the effect of ionizing radiation on the behavioral reactions of laboratory animals in the test setups "Open Field", "Morris Water Maze", and "T-Maze". During the testing of animals, their behavior is video recorded using the EthoVision XT 13 software package (Noldus Technology, Netherlands). Generally, it takes about 2 weeks to process video files of one experiment, depending on the number of animal groups. When processing the video material, researchers of the radiation physiology sector face a number of problems related to the imperfections of the EthoVision XT 13 program. In this regard, it seems relevant to implement computer vision algorithms to simplify the analysis of experimental data in the study of the behavior of laboratory animals.

Keywords: behavior, Open Field test, T-Maze, Water maze test, mice, rats, emotional status, orienting-exploratory reaction, central nervous system, radiobiology, ionizing radiation.

Kristina Lyakhova, Dina Utina, Yuri Severiukhin

Copyright © 2020 for this paper by its authors.

Use permitted under Creative Commons License Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).