УДК 004.415.2 + 57.084.1

А. Е. БАРТОШ, Т. А. ТЮШЕВ, Т. Б. МЕЛИК-КАСУМОВ

НОВОЕ ПРОГРАММНОЕ СРЕДСТВО *TAIL TRAIL* ДЛЯ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ТРЕКИНГА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТАХ

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Представлены особенности нового программного средства Tail Trail для анализа перемещения лабораторных животных в стандартных поведенческих тестах. Проведено сравнение точности трекинга в разработанной программе и аналоге ImageJ Animal Tracker при анализе локомоторной активности крыс с применением теста «Открытое поле» по одним и тем же видеозаписям экспериментов. По показателям общей пройденной дистанции и дистанции в выбранных зонах новая программа показала эквивалентность с референсной. Таким образом, разработанное программное средство не уступает референсному в точности пространственного трекинга. При этом программа Tail Trail обладает удобным интерфейсом, а также предоставляет расширенный набор инструментов визуализации: отображение трека в реальном времени, экспорт изображений с фоном и без, построение тепловых карт и генерацию видео с наложенной траекторией движения. Это позволяет сократить количество ручных операций и упрощает интерпретацию и представление результатов анализа.

Программа Tail Trail вместе с руководством пользователя и стандартным лицензионным соглашением (лицензия MIT) размещена на сайте Института физиологии НАН Беларуси в свободном доступе.

Ключевые слова: программное обеспечение, поведенческий тест, трекинг, тест «Открытое поле», ImageJ, Tail Trail.

Введение. Анализ поведения лабораторных животных в контролируемых условиях – важный инструмент, который активно используется в различных областях современной биологии и медицины [1–3].

В нормальной физиологии поведенческие тесты незаменимы для изучения фундаментальных механизмов обучения, памяти, исследовательского поведения, двигательной и эмоциональной активности, а также влияния на эти процессы факторов среды и образа жизни [4, 5]. В фармакологии стандартные поведенческие тесты используют для скрининга новых биологически активных соединений, а также для оценки влияния разрабатываемых лекарственных препаратов на двигательную активность, когнитивные функции и уровень тревожности и депрессивности на этапе доклинических испытаний [3]. Зоопсихология и этология обращаются к поведенческим тестам для изучения видовых стратегий адаптации, коммуникации и социального взаимодействия в контролируемых условиях [4, 6]. В патологической физиологии данные тесты служат объективным критерием оценки тяжести экспериментальных моделей патологий и эффективности исследуемых терапевтических подходов [7, 8].

Современные физиология и фармакология в значительной степени опираются на методы объективной оценки поведения лабораторных животных [2]. Ключевыми инструментами здесь выступают классические тесты: водный лабиринт Морриса (оценка пространственной памяти и обучения), Открытое поле (ОП, анализ локомоторной активности и тревожности), приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ, определение степени тревожности) и т.д. Основными количественными параметрами поведенческого фенотипирования выступают показатели локомоторной активности: общая пройденная

дистанция и суммарное время двигательной активности. Кроме того, часто проводится пространственно-временной анализ пребывания животного в целевых зонах интереса (англ. regions of interest, ROI), что позволяет оценивать не только общую подвижность, но и привязанность поведения к значимым секторам тестовой арены (например, центральная зона Открытого поля или открытые рукава в приподнятом крестообразном лабиринте при оценке тревожности).

Однако ручная обработка видеоданных или использование устаревшего программного обеспечения сопряжены с субъективностью, низкой воспроизводимостью результатов и значительными временными затратами.

Существует ряд коммерческих программ, обладающие широкими возможностями для анализа поведения лабораторных животных (ANY-maze, EthoVision XT, Conduct Vision и другие). Тем не менее, их высокая стоимость, часто включающая выплаты по абонементу, а также привязка к конкретному оборудованию делает их недоступными для многих научных коллективов, в том числе для небольших исследовательских центров и специализированных образовательных учреждений. С другой стороны, существуют также программы со свободным доступом, разработанные в научных центрах. Они в свою очередь, достаточно часто узко специализированы, имеют неудобный интерфейс и(или) низкую пропускную способность. Это создаёт барьер для широкого внедрения современных методов анализа трекинга в повседневную практику исследователей.

Цель данной статьи – представить новое программное решение для автоматизации анализа перемещения лабораторных животных в поведенческих тестах, разработанное с учётом принципов доступности и функциональной полноты, апробация его в лабораторных условиях в сравнении с плагином Animal Tracker программы ImageJ [9].

Материалы и методы исследования. При разработке программы использован язык программирования Python и библиотека алгоритмов компьютерного зрения OpenCV [10]. Программа Tail Trail была разработана в Институте физиологии НАН Беларуси для трекинга лабораторных животных в поведенческих тестах по видеофайлам. Рассматриваемая программа обеспечивает трекинг объекта, позволяет получать точную информацию о локомоции лабораторных животных и результаты в виде линии трека и тепловой карты.

Программное средство Tail Trail предназначено для построения и анализа линии перемещения лабораторных животных по видеозаписям поведения в стандартных тестах – открытое поле, водный тест Морриса, приподнятый крестообразный лабиринт и других. Возможности программы не ограничиваются стандартными поведенческими тестами: она может быть использована для трекинга любого подвижного объекта на контрастном статичном фоне.

После загрузки видеофайла пользователь может настроить условия обработки, используя интуитивно понятный интерфейс программы, представленный в виде ленты последовательных этапов. На этапе трансформации пользователь может выполнить сдвиг и поворот кадра при помощи аффинных преобразований по заданным параметрам для размещения арены в центре кадра. На следующем этапе на кадры видео можно наложить круглую бинарную маску заданного радиуса для исключения из анализа областей, не относящихся к арене. На этапе вычитания фона для отделения движущихся объектов от статичного фона используется алгоритм Background Subtractor MOG2 из библиотеки OpenCV. Для автоматического обучения модели статичного фона используется случайно выбранный набор кадров, равномерно распределенных по всей длине видео. Далее используется сглаживание для подавления шумов и повышения устойчивости трекинга с применением размытия по Гауссу. На следующем этапе устанавливается порог детекции. Изображение преобразуется в бинарное при помощи алгоритма вычисления порогового значения adaptive Threshold из библиотеки OpenCV. Адаптивный алгоритм вычисляет уникальный порог для каждой отдельной области и подходит для изображений с неравномерным освещением или тенями.

После запуска процедуры трекинга поиск объекта осуществляется путём выделения замкнутых контуров при помощи алгоритма find Contours из библиотеки OpenCV. Для каждого

из них вычисляется площадь и координаты центра масс. Отбор значимых контуров производится по минимально допустимой площади, что позволяет игнорировать мелкие артефакты и шумы. Стратегия идентификации целевого объекта зависит от текущего состояния трекера. Изначально трекер выбирает крупнейший по площади контур, исходя из предположения, что животное является самым большим подвижным объектом в кадре. В режиме активного слежения алгоритм переключается на выбор ближайшего к предыдущему положению кандидата, что позволяет игнорировать посторонние движущиеся объекты, если таковые появляются в поле зрения. Для сглаживания траектории и повышения устойчивости к случайным выбросам координат интегрирован линейный фильтр Калмана. Фильтр предсказывает ожидаемое положение объекта на основе предыдущей динамики, затем уточняет его с учётом измеренных координат. Это позволяет компенсировать кратковременные искажения силуэта, вызванные, например, грумингом или поднятием на задние лапы.

Для обработки ситуаций, когда животное временно пропадает из поля зрения, например, когда ныряет в водном тесте Морриса, реализован механизм интерполяции. Если дистанция до новой точки трекинга превышает критический порог, алгоритм, генерирует серию промежуточных точек, заполняя участок, на котором объект был потерян. Для упрощения предполагается, что на данном участке объект двигался равномерно прямолинейно. Это позволяет более корректно рассчитать пройденную дистанцию, минимизируя потери данных. Параллельно с определением координат выполняется анализ положения животного относительно заданных зон интереса. Алгоритм определяет принадлежность текущей точки к одной из зон интереса. Для предотвращения ложных срабатываний счетчика переходов на границах используется гистерезисный механизм. Повторный вход в зону регистрируется только после того, как животное удалилось от её границы на заданное пороговое расстояние. Это исключает регистрацию множество ложных переходов при движении вдоль границы зоны. Для каждой зоны в реальном времени рассчитывается время пребывания, пройденная внутри зоны дистанция, а также количество входов в зону.

После завершении обработки выполняется экспорт данных в файл data.xlsx в заданное местоположение: общая пройденная дистанция, общая длительность, данные по каждой зоне интереса. Есть возможность экспорта изображении трека и тепловой карты отдельно или наложенные на выбранный кадр видео. Для построения тепловой карты применяется способ ядерной оценки плотности распределение точек трека по арене. Также есть возможность экспортировать видео процесса трекинга и построения тепловой карты, что позволяет визуально оценить качество трекинга.

Для валидации алгоритмов трекинга и анализа перемещения новой программы было проведено сравнение результатов трекинга крыс в тесте «Открытое поле» с результатами референсной программы. В качестве последней выбран общедоступный плагин Animal Tracker для программы ImageJ. Данный выбор обусловлен тем, что ImageJ Animal Tracker является открытым общедоступным и широко используемым бесплатным решением для видеотрекинга лабораторных животных [9]. Коммерческие системы (EthoVision, AniMove и др.) обладают закрытым исходным кодом и алгоритмами, что делает невозможным анализ причин возможных расхождений при сравнении. Целью сравнения являлась верификация разработанного алгоритма трекинга и анализа перемещения в тесте «Открытое поле». Сопоставимость результатов с этим инструментом служит необходимым этапом проверки корректности результатов, полученных в разработанной программе.

Для сравнительного анализа работы алгоритмов трекинга и анализа перемещения в программах Tail Trail и ImageJ Animal Tracker было выбрано 30 видеофайлов (разрешение 640x480, 30 кадров в секунду) с записью теста «Открытое поле» у взрослых крыс массой 250–300 г. В ходе эксперимента животных помещали в центр круглой арены диаметром 1,2 м и проводили видеорегистрацию свободного поведения в течение 5 минут. Параметрами для

сравнения были выбраны общая пройденная дистанция, дистанции пройденные в центральной части ОП и на периферии.

Статистический анализ проводили в программах Statistica 10 и GraphPad Prizm 8. Результаты теста Шапиро-Уилка показали нормальное распределение для всех показателей. Данные представлены в виде среднего арифметического и его ошибки. Для оценки эквивалентности результатов, полученных в двух программах, использована процедура TOST (Two one sided t-tests) для зависимых выборок с границей эквивалентности в пределах 5 % от среднего значения показателя. Дополнительно проведен анализ различий по методу Бланда-Алтмана.

Результаты и их обсуждение. Результаты работы в программах Tail Trail и ImageJ Animal Tracker на заключительном этапе анализа перемещения крысы №5 в Открытом поле представлены соответственно на рисунках 1 и 2.

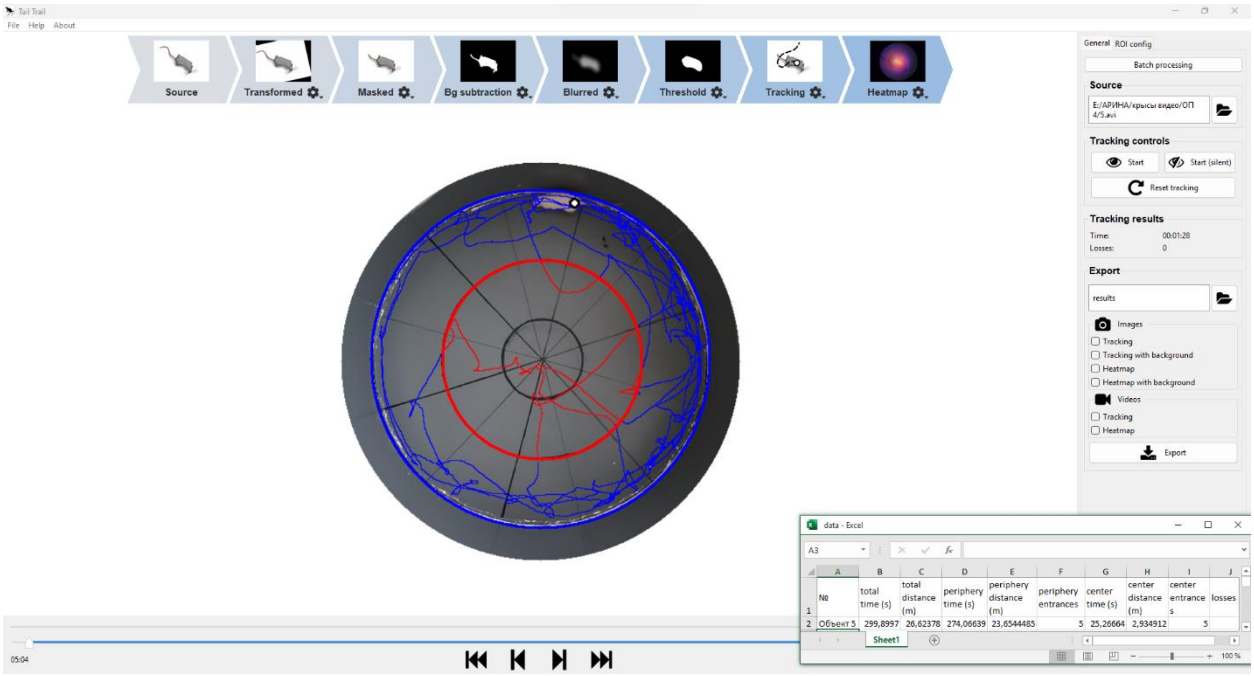

Рисунок 1. Окно программы Tail Trail в конце обработки видеофайла (крыса № 5) с количественными результатами в файле data.xlsx, открытом в редакторе MS Excel

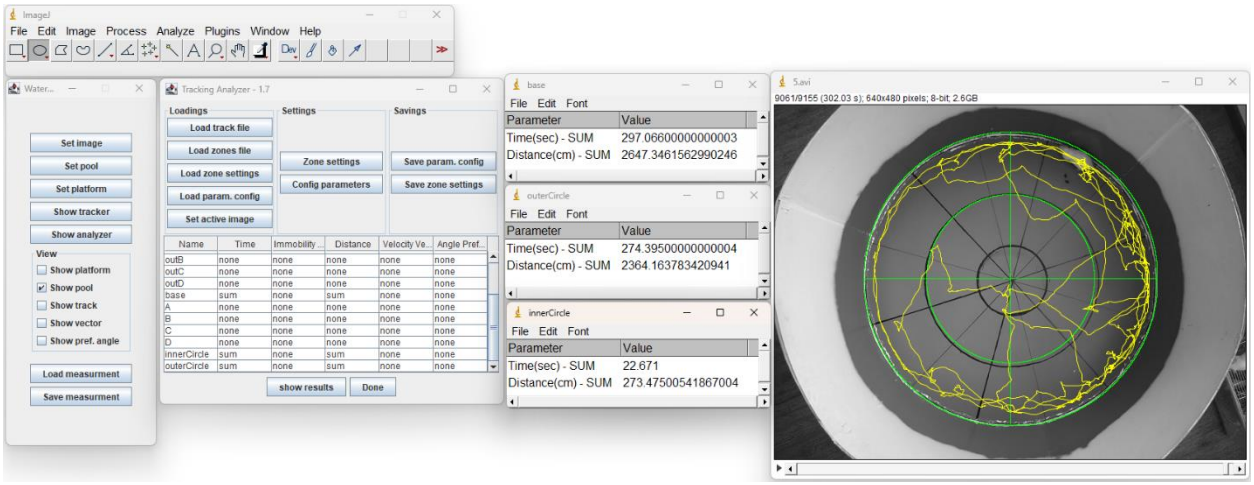

Рисунок 2. Снимок экрана с окнами программы ImageJ с плагином Animal Tracker в конце обработки видеофайла (крыса № 5)

Средние значения по данным, полученным в двух программах, представлены в таблице 1. Статистический анализ показал, что измерения в условиях проведенного сравнения являются эквивалентными ($p < 0{,}05$ для всех показателей). Дополнительно получены результаты по методу Бланда-Алтмана (рисунок 3). Для двух показателей расчётные значения по каждому видеофайлу лежат в границах интервала согласия. Единственный выброс отмечен в случае показателя «Дистанция в центре», что, видимо, определяет более высокое значение p по результатам TOST в сравнении с двумя другими показателями (таблица 1). Обращает на себя внимание небольшое смещение для всех показателей – 8–10 см в положительную сторону. Следует отметить, что это смещение составляет не более 2 % от величины анализируемых показателей, не влияет на эквивалентность измерений и может быть вызвано особенностями подготовки к трекингу в каждой из программ (рисунок 1 и 2).

Таблица 1. Результаты сравнительного анализа показателей локомоции крыс в тесте «Открытое поле» в программах Tail Trail и Animal Tracker

Параметры	**Средние значения в Tail Trail**	**Средние значения в ImageJ Animal Tracker**	***p*-значение (TOST)**
Общая дистанция, м	28,79 ± 1,22	28,66 ± 1,25	<0,001
Дистанция на перифериии, м	23,34 ± 0,98	23,20 ± 1,00	0,003
Дистанция в центре, м	5,44 ± 0,50	5,34 ± 0,48	0,020

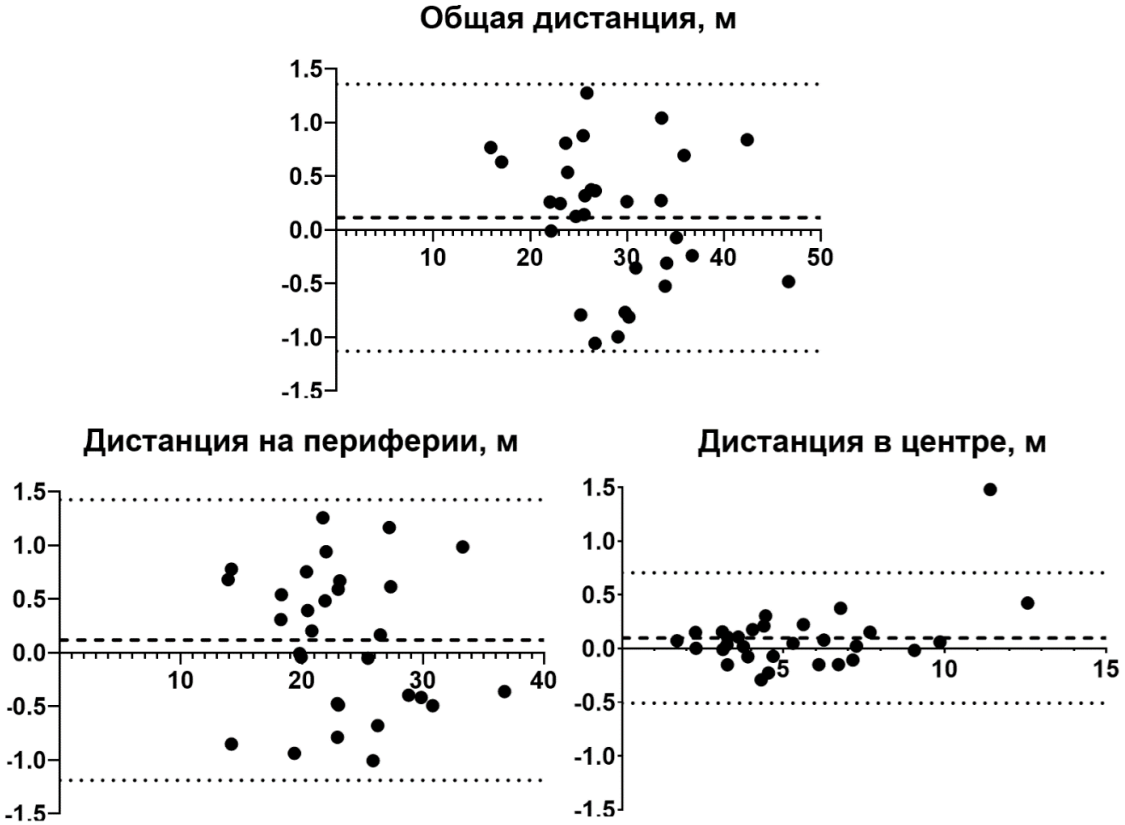

Рисунок 3. Результаты анализа по методу Бланда-Алтмана. По оси X – средние значения показателя в двух программах, по оси Y – разность показателей в двух программах (ImageJ – Tail Trail). Пунктирными линиями обозначены границы интервалов согласия, штриховой – смещения

Таким образом, проведенный статистический анализ указывает на то, что разработанная программа эквивалентна референсной в части трекинга и анализа перемещения крыс.

Полученные результаты подтверждают, что разработанная программа корректно обрабатывает видеозаписи в условиях достаточного контраста, обеспечивая точность,

сопоставимую с общепризнанным бесплатным инструментом ImageJ Animal Tracker. Это свидетельствует о том, что базовые алгоритмы выделения объекта и расчета координат реализованы корректно и не вносят значимых систематических искажений.

Помимо анализа перемещения лабораторных животных в тесте «Открытое поле», программа обладает также функционалом для проведения аналогичного анализа в других тестах (например, ПКЛ и водный тест Морриса) (рисунок 4).

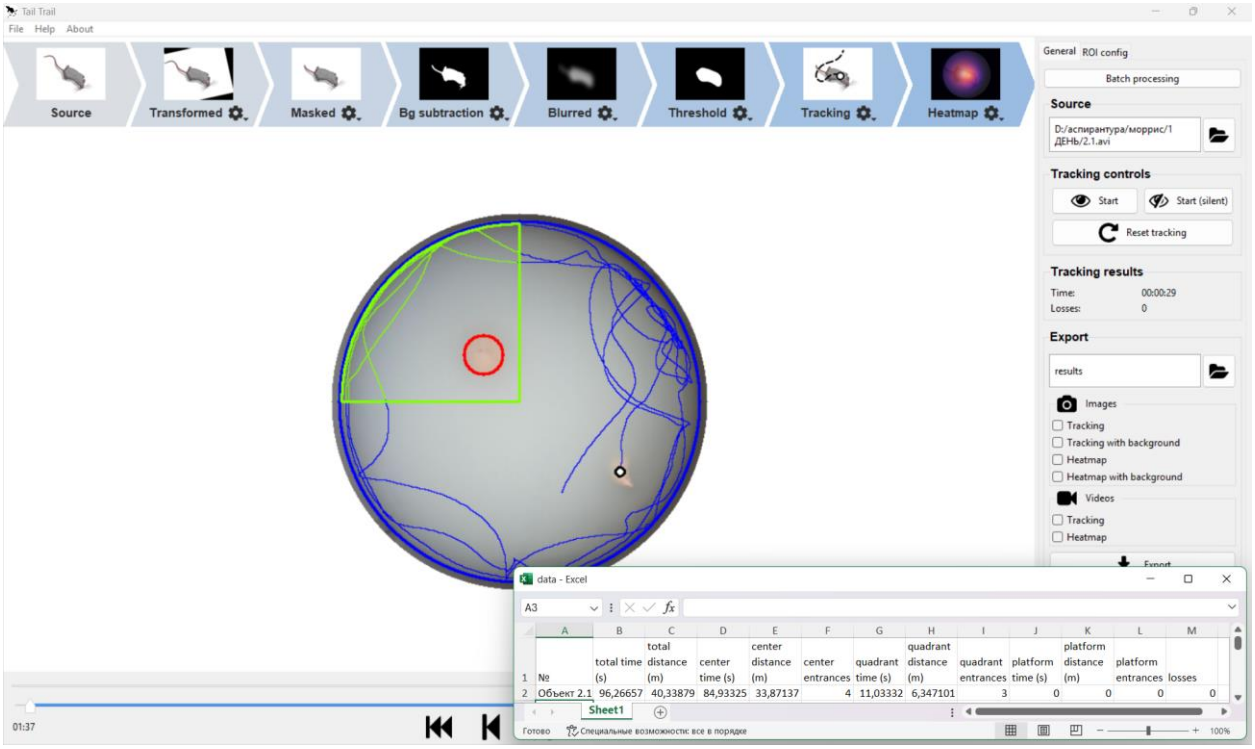

Рисунок 4. Окно программы Tail Trail в конце обработки видеофайла с тестом «водный лабиринт Морриса» и результаты обработки в файле data.xlsx

Заключение. В ходе сравнительного анализа разработанного программного обеспечения Tail Trail и референсного аналога ImageJ Animal Tracker показана эквивалентность результатов обработки одних и тех же видеофайлов поведения крыс в тесте «Открытое поле» по основным пространственным параметрам трекинга. Это подтверждает корректность работы алгоритмов трекинга и анализа перемещения, реализованных в разработанной программе, и позволяет рассматривать её в качестве валидного инструмента для обработки видеозаписей поведенческих тестов.

Помимо сопоставимой точности измерений, разработанная программа обладает рядом функциональных особенностей, повышающих её практическую ценность. Реализация единого интерфейса исключает необходимость переключения между отдельными модулями. Возможность визуализации трека в реальном времени облегчает контроль качества записи в процессе анализа. Экспорт изображений с оригинальным фоном или без него, автоматическое построение тепловых карт и генерация видео с наложенной траекторией движения расширяют инструментарий исследователя и сокращают время постобработки данных.

Таким образом, разработанное программное средство представляет собой доступную функциональную альтернативу существующим решениям, пригодную для использования в эксперименте при анализе локомоторной активности лабораторных животных.

Программа Tail Trail вместе с руководством пользователя и стандартным лицензионным соглашением (лицензия MIT) размещена на сайте Института физиологии НАН Беларуси в свободном доступе.

Литература:

[1]. *Rosso M., Wirz R., Loretan A.V. et al.* Reliability of common mouse behavioural tests of anxiety: A systematic review and meta-analysis on the effects of anxiolytics // Neurosci Biobehav Rev. 2022. Vol. 143. Art.104928.

[2]. *Chen L., Lu Y., Hua X. et. al.* Three methods of behavioural testing to measure anxiety - A review // Behav Processes. 2024. Vol. 215. Art. 104997.

[3]. *Acikgoz B., Dalkiran B., Dayi A.* An overview of the currency and usefulness of behavioral tests used from past to present to assess anxiety, social behavior and depression in rats and mice // Behav Processes. 2022. Vol. 200. Art. 104670.

[4]. *Obasa A., Schwerin S.C., Ray M. et. al.* Evaluation of baseline behavioral tests in ferrets // Behav Neurosci. 2022. Vol. 136, № 4. P. 330–345.

[5]. *Bowman R., Frankfurt M., Luine V.* Sex differences in anxiety and depression: insights from adult rodent models of chronic stress and neural plasticity // Front Behav Neurosci. 2025. Vol. 19. Art. 1591973.

[6]. *Gencturk S., Unal G.* Rodent tests of depression and anxiety: Construct validity and translational relevance // Cogn Affect Behav Neurosci. 2024. Vol. 24, № 2. P. 191–224.

[7]. *Schallert T.* Behavioral tests for preclinical intervention assessment // NeuroRx. 2006. Vol. 3, № 4. P. 497–504.

[8]. *Watanabe T., Sakamoto K.* Meta-analysis of cognitive and behavioral tests in leptin- and leptin receptor-deficient mice // Neurosci Res. 2021. Vol. 170. P. 217–235.

[9]. *Gulyás M., Bencsik N., Pusztai S. et. al.* AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program // Neuroinformatics. 2016. Vol. 14, № 4. P.479–481.

[10]. OpenCV 4.13.0 documentation / OpenCV team. URL: https://docs.opencv.org/4.13.0/index.html. (дата доступа: 01.10.2025).

A. E. BARTOSH, T. A. TYUSHEV, T. B. MELIK-KASUMOV

A NEW SOFTWARE TOOL TAIL TRAIL FOR AUTOMATED TRACKING OF LABORATORY ANIMALS IN BEHAVIORAL TESTS

State Scientific Institution "Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus

Summary

This paper presents the features of Tail Trail, a new software tool for analyzing the movements of laboratory animals in standard behavioral tests. Tracking accuracy in the developed software and its ImageJ Animal Tracker counterpart was compared when analyzing rat locomotor activity in the Open Field Test, using the same experimental video recordings. The new software demonstrated equivalence with the reference software in terms of total distance traveled and distance in selected zones. Thus, the developed software is comparable to the reference software in spatial tracking accuracy. Tail Trail also features a user-friendly interface and an expanded set of visualization tools: real-time track display, image export with and without background, heatmap generation, and video generation with superimposed motion trajectory. This reduces manual intervention and simplifies the interpretation and presentation of analysis results.

Tail Trail, along with a user manual and a standard license agreement (MIT license), is freely available on the website of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus.

Keywords: software, behavioral test, tracking, Open Field test, ImageJ, Tail Trail.