

طراحی و ساخت سیستم کاشتنی برای بررسی حرکات رفتاری موش صحرایی مبتنی بر روشهای بینایی ماشین و شبکه‌های عصبی عمیق برای کاربردهای علوم اعصاب

سیده مهشاد حسینی^۱، محمد اسماعیل زبائی^{*۱}

^۱ پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۹/۱۴

تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۹/۱۸

شاپای چاپی: 2588-493x

شاپای الکترونیکی: 2588-4921

* نویسنده مسئول

M_zibaye@sbu.ac.ir

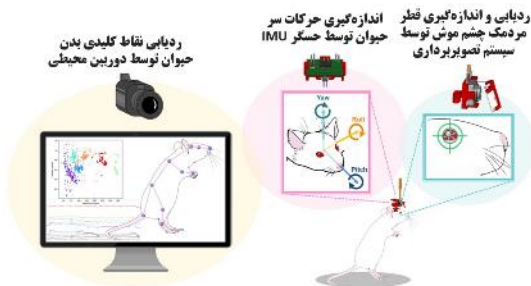
چکیده

پایش دقیق و کمی رفتار حیوانات آزمایشگاهی، به ویژه مدل‌های حیوانی علوم اعصاب، اهمیت بسیاری در درک عملکرد مدارهای عصبی و ارتباط آن‌ها با رفتارهای پیچیده دارد. در رفتارشناسی محاسباتی، با هدف خودکارسازی، افزایش دقت و کاهش وابستگی مطالعات به ناظر انسانی و تکرارپذیری نتایج، سیستم‌ها و الگوریتم‌های پردازشی نوینی در حال توسعه‌اند. در این پژوهش، سیستمی متشکل از دوربین‌های بررسی رفتار محیطی و یک ایمپلنت مینیاتوری با قابلیت کاشت بر روی جمجمه موش صحرایی، طراحی و ساخته شده که حرکات بدن حیوان، مردمک چشم و زوایای حرکتی سر را ثبت می‌کند. ایمپلنت دارای حسگر IMU برای اندازه‌گیری شتاب و حرکت زاویه‌ای سر و دوربین مادون‌قرمز برای مردمک‌سنجی می‌باشد که وزن نهایی آن حدود ۴.۵ گرم است. همچنین نرم‌افزاری برای پردازش و مصورسازی داده‌های رفتاری توسعه داده شده‌است. از ترکیب داده‌های شتاب‌سنج و ژيروسکوپ برای محاسبه زوایای اولیه سر حیوان و از روش‌های بینایی ماشین سنتی و شبکه‌های عصبی عمیق برای پردازش تصاویر استفاده می‌شود. الگوریتم‌های آستانه‌گذاری و لبه‌یابی، سرعت پردازش ۲۵ فریم بر ثانیه را برای ردیابی مردمک موش‌های رنگدانه‌دار و مرکز بدن فراهم می‌کنند که برای کنترل حلقه-بسته سیستم‌های عصبی مناسب است. برای تخمین حالت بدن و بررسی مردمک موش‌های زال، شبکه عصبی DeepLabCut همراه با روش‌های تقویت داده و یادگیری انتقالی استفاده شده که خطای مدل مردمک‌سنجی به ازای ۴۴۸ تصویر برچسب‌گذاری شده و ۳۰,۰۰۰ دور آموزشی، به ۳.۳۱ پیکسل کاهش یافته‌است. روش‌های یادگیری عمیق با وجود دقت بالا، بار پردازشی بالایی نیز دارند. لذا الگوریتم پردازشی مناسب با توجه به هدف آزمایش و سخت‌افزار در دسترس، انتخاب می‌شود. این سیستم چندگانه مطالعه رفتاری، قابلیت استفاده هم‌زمان با تکنیک اپتوژنتیک و ثبت‌های الکتروفیزیولوژی داشته و ابزاری مفید برای مطالعات علوم شناختی فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: اپتوژنتیک، رفتارشناسی محاسباتی، تحلیل خودکار ویدیویی رفتار، ردیابی مردمک، شبکه‌های یادگیری عمیق



مقدمه



شکل ۱: معرفی اجزای اصلی سیستم چندگانه بررسی رفتاری موش صحرایی در حال حرکت.

جزئیات رفتاری، مانند ردیابی و اندازه‌گیری قطر مردمک چشم و حرکات سر حیوان دارد. حرکات و حالت بدن حیوان توسط دوربین‌های نصب شده در محیط تست رفتاری تصویربرداری شده و سپس به صورت آنلاین و آفلاین با توجه به رزولوشن تصاویر و دقت مورد نیاز برای بررسی رفتار، توسط نرم‌افزار توسعه داده شده پردازش و تحلیل شده‌است.

۱- توسعه الگوریتم‌های تخمین حالت بدن

۱-۱- مدل‌های یادگیری عمیق برای استخراج نقاط

کلیدی تصویر

الگوریتم‌های بسیاری برای ردیابی و تخمین حالت بدن^۱ توسعه یافته‌اند [۱۶] که در این میان الگوریتم‌های مبتنی بر یادگیری عمیق کارآمدتر بوده و عملکرد آن‌ها بر روی ارزیابی حالت بدن انسان‌ها نیز ثابت شده‌است [۱۷ و ۱۸]. بسیاری از الگوریتم‌های تخمین حالت یادگیری عمیق به صورت لایه‌های رمزگذار-رمزگشا^۲ می‌باشند [۱۹]. مطابق شکل (۲)، لایه‌های رمزگذار ویژگی‌های تصویر را از فریم‌ها استخراج نموده و سپس لایه‌های رمزگشا مکان نقاط کلیدی بدن^۳ در تصویر را پیش‌بینی کرده و خروجی‌ها به ابعاد تصویر ورودی برگردانده می‌شود [۲۰]. در این الگوریتم‌ها، لایه‌های کانولوشنی^۴ برای پیش‌بینی مکان نقاط کلیدی در یک تصویر نیز کاربرد دارند که از آن‌ها برای دسته‌بندی در سطح پیکسلی استفاده می‌شود. نتایج خروجی این مدل، که در شکل (۲) نیز نمایش

مطالعات رفتارشناسی حوزه وسیع و مهمی در علوم اعصاب می‌باشند که در انجام آزمایشات علوم‌شناختی برای درک فرآیندهای عملکردی مغز مانند حرکت، شناخت و احساسات، عوامل بیماری‌های عملکردی و شناختی و مطالعه روی اثرات داروها نقش اساسی دارند [۱]. در این مطالعات هدف اصلی مشاهده رفتار و ثبت، پردازش و تحلیل داده‌های رفتاری با استفاده از سخت‌افزارها و نرم‌افزارهای مناسب می‌باشد [۲ و ۳]. جوندگانی مانند موش‌های صحرایی به عنوان مدل بیماری‌های انسانی نقشی بسیار کلیدی در مطالعات علوم اعصاب دارند. شکل‌گیری ابزارهای ثبت و دستکاری فعالیت‌های عصبی در مطالعات مرتبط با موش‌ها رو به گسترش است [۴ و ۵]، اما با این وجود اندازه‌گیری و بررسی جزئیات مشخصات رفتاری، به خصوص برای حیوان در حال حرکت آزادانه در محیط آزمایش، چالشی می‌باشد [۶-۹]. تغییرات مکان و قطر مردمک چشم و زوایای جهت‌گیری فضایی سر از جمله پارامترهای رفتاری مورد توجه است [۱۰-۱۴]. حرکات چشم بازتاب‌کننده بسیاری از عملکردهای مغز، از هماهنگی و ادغام بین سیستم عصبی و حرکتی بویژه فرآیند شناخت می‌باشد. همچنین اندازه‌گیری حرکات سر امکان بررسی عملکرد سیستم دهلیزی را می‌دهد که وظیفه نگاه‌داشتن ثبات بینایی در حین حرکت سر و حفظ تعادل بدن را دارد. اندازه‌گیری دقیق این پارامترها با توجه به سائز کوچک موش‌ها در حالت طبیعی رفتار بسیار دشوار است [۶، ۱۰ و ۱۵].

به این منظور سیستمی چندگانه برای ثبت و پردازش رفتار موش‌های صحرایی طراحی و ساخته شده‌است. برنامه‌ای مبتنی بر الگوریتم‌های بینایی ماشین کلاسیک و شبکه‌های یادگیری عمیق برای پردازش داده‌های رفتاری ارائه شده‌است. مطابق شکل (۱)، سخت‌افزار این سیستم به منظور تصویربرداری مادون قرمز و موقعیت‌یابی طراحی شده است که ایمپلنت مینیاتوری آن قابلیت کاشت بر روی جمجمه موش صحرایی را برای ثبت و تحلیل کمی

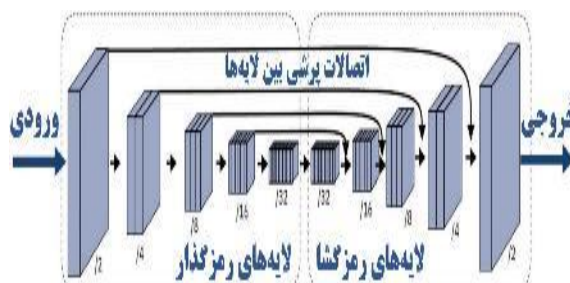
³ Posture key points

⁴ Convolutional Neural Network

¹ Pose estimation

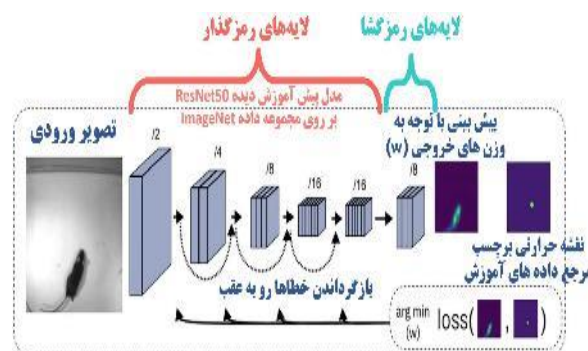
² Encoder-decoder

داده شده‌است، مجموعه‌ای از نقشه‌های اطمینان^۵ به ازای هر نقطه کلیدی می‌باشد. سپس با پردازش این نقشه‌ها و انتخاب مقدار بیشینه محلی در آن‌ها، مختصات دوبعدی هر یک از قسمت‌های بدن حیوان به دست می‌آید [۱۷].



شکل ۲: مصورسازی معماری پایه مدل‌های رمزگذار-رمزگشا. لایه‌های رمزگذار، تصویر ورودی را به ویژگی‌های فضای آن تبدیل کرده و سپس لایه‌های رمزگشا آن‌ها را به خروجی مورد نظر تبدیل می‌کنند [۱۷].

برای بهبود عملکرد این مدل‌ها، ارتباطی بین لایه‌های رمزگشا و همچنین ارتباطی میان لایه‌های رمزگذار و رمزگشا در معماری‌های بعدی افزوده شد که بر پایه آن شبکه‌هایی مانند DeepLabCut [۱۸]، Leap [۲۱] و DeepPose-kit [۲۲] برای شناسایی نقاط کلیدی و تخمین حالت بدن حیوانات توسعه یافته‌اند.



شکل ۳: ساختار شبکه DLC برای شناسایی نقاط کلیدی بدن. در هر دور آموزش نقشه حرارتی برچسب تصویر با خروجی مدل که چگالی احتمال حضور نقاط کلیدی است مقایسه شده و وزن‌های مدل با فرآیند برگشت به عقب^۶، به سمت کاهش خطای مدل بروز می‌شوند [۱۸].

مادل DLC^7 ، که در این پژوهش نیز مورد استفاده قرار گرفته است،

جعبه‌ابزاری منبع باز^۸ توسعه یافته بر پایه زبان برنامه‌نویسی پایتون

است که تمرکز آن بر تخمین حالت بدن حیوانات و تشخیص نقاط کلیدی تصویر بدون نیاز به نشانه‌گذاری مستقیم رنگی و یا فیزیکی بر روی بدن حیوان و یا اشیاء محیطی می‌باشد [۱۸ و ۲۳]. مطابق شکل (۳) ساختار DLC به صورت یک شبکه کانولوشنی عمیق است که همانند سایر الگوریتم‌های تشخیص اشیاء و تقسیم‌بندی معنایی^۹، از دو بخش رمزگذار و رمزگشا تشکیل شده‌است. لایه‌های کانولوشنی آن وظیفه استخراج ویژگی‌های^{۱۰} تصویر را برعهده دارند و لایه‌های دکانولوشنی برای افزایش اطلاعات بصری و تولید چگالی احتمال فضایی به صورت نقشه‌های اطمینان می‌باشند. مدل‌های DLC با بکارگیری روش‌های تقویت داده^{۱۱} و یادگیری انتقالی^{۱۲}، مطابق نتایج توانسته‌اند با آموزش مدل روی تعداد کمی از تصاویر برچسب‌گذاری^{۱۳} شده در حدود ۲۰۰ فریم، به دقت بالایی در پیش‌بینی بر روی داده‌های تست دست یابند که قابل مقایسه با دقت تشخیص انسان بوده‌است [۱۸ و ۲۴]. معماری لایه‌های کانولوشنی DLC می‌تواند یکی از مدل‌های MobileNetV2، EfficientNet و ResNet باشد که بر روی دیتاست ImageNet برای کاربردهای تخمین حالت بهینه شده‌اند. انتخاب نوع معماری مناسب جزو فرایامترهای^{۱۴} مدل بوده و با توجه به پیچیدگی مسئله، میزان دقت و سرعت پردازش مورد نیاز تعیین می‌شود. مدل ResNet50 دقت بالا و مناسبی را برای بسیاری از کاربردهای تخمین حالت در آزمایشگاه نشان داده‌است [۲۳ و ۲۵].

مدل DLC برگرفته از شبکه‌های عصبی کانولوشنی تمام متصل^{۱۵} بوده که در آن پس از آخرین لایه شبکه ResNet، به جای استفاده از لایه‌های تمام متصل^{۱۶} که معمولاً برای دسته‌بندی کاربرد دارند، از یک لایه دکانولوشن^{۱۷} با گام^{۱۸} ۸

¹² Transfer learning¹³ Data labeling¹⁴ Hyperparameter¹⁵ F-CNN: Fully Convolutional Neural Network¹⁶ FC: Fully Connected¹⁷ Deconvolutional layer

18 Stride

⁵ Confidence map⁶ Backpropagation

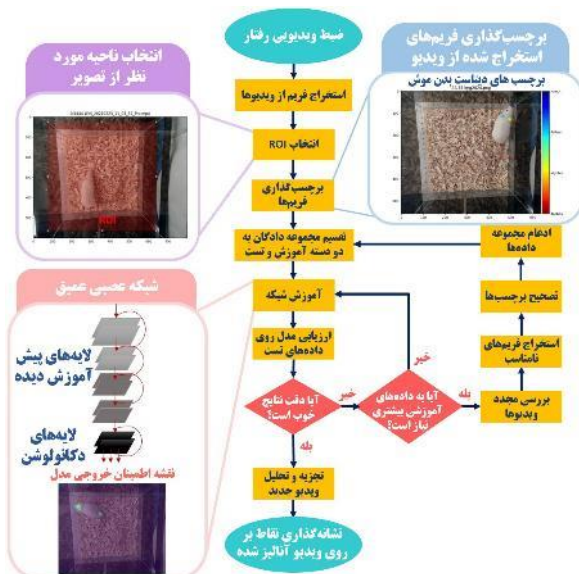
⁷ DLC: DeepLabCut

⁸ Open source

⁹ Semantic segmentation

¹⁰ Feature extraction¹¹ Data augmentation

شده است. این مراحل به ترتیب شامل ضبط ویدیویی رفتار برای جمع‌آوری مجموعه داده، انتخاب فریم از ویدیوهای ضبط شده، برچسب‌گذاری فریم‌های استخراج شده از مجموعه ویدیوها، انتخاب مشخصات شبکه و تنظیم فرآیند آموزش مدل بر روی داده‌های برچسب‌گذاری شده، ارزیابی مدل بر روی داده‌های تست، بهبود مدل با توجه به دقت آن در پیش‌بینی نقاط کلیدی و در نهایت استفاده از مدل برای آنالیز ویدیوی جدید می‌باشد.



شکل ۴: جریان کاری کار با پکیج DLC.

برای انتخاب فریم‌ها در پکیج DLC سه روش وجود دارد [۲۰]. روش اول انتخاب دستی فریم‌ها از ویدیوها توسط کاربر با کمک رابط گرافیک کاربری پکیج DLC می‌باشد. در روش دوم به ازای بازه‌های زمانی یکسان از ویدیو یک فریم استخراج می‌شود. این روش در صورتی مناسب است که حیوان رفتاری مشابه و همگن در طول مدت تست رفتاری داشته باشد. روش سوم، دسته‌بندی فریم‌های موجود در ویدیوها با استفاده از الگوریتم خوشه‌بندی K-means^{۲۵} می‌باشد که یک الگوریتم بدون نظارت^{۲۶} یادگیری ماشین کلاسیک است. در این روش

استفاده شده است که در خروجی چگالی احتمال نواحی حضور هر عضو را جداگانه برمی‌گرداند. برای آموزش شبکه DLC نیاز به تصاویر برچسب‌گذاری شده بوده که شامل فریم‌های ویدیو و مختصات نقاط نشانه‌گذاری شده در آن‌ها می‌باشد. مطابق شکل (۳)، برچسب‌ها به صورت تصاویر دودویی^{۱۹} هستند که در آن‌ها مختصات نقاط کلیدی به صورت دایره‌ای با مقادیر پیکسلی^۱ مشخص می‌شود. در هر دور آموزشی^{۲۰}، مقدار خروجی با برچسب اصلی^{۲۱} آن مقایسه شده و مجدد پارامترهای شبکه با توجه به مقدار خطا محاسبه شده، در راستای به حداقل رساندن تلفات، بهینه می‌شوند. برای به دست آوردن مختصات نقاط کلیدی تصویر، مقدار بیشینه از نقشه‌های اطمینان محاسبه می‌شود.

تشخیص و ردیابی دقیق اعضاء بدن با استفاده از الگوریتم‌های سنتی پردازش تصویر، به ویژه در مواردی که نیاز به تحلیل رفتار چند حیوان در محیط تست باشد به علت تداخل مسیر حرکتی حیوانات با یکدیگر، بسیار دشوار است. اما مدل‌های یادگیری عمیق برای تحلیل هم‌زمان بیش از یک حیوان بسیار انعطاف‌پذیر می‌باشند. مدل‌های تخمین موقعیت و حالات بدن چند حیوان به طور هم‌زمان، با دو رویکرد متفاوت پایین به بالا^{۲۲} و بالا به پایین^{۲۳} توسعه داده شده‌اند [۲۱ و ۲۶]. در رویکرد پایین به بالا، ابتدا نقاط کلیدی بدن تمام حیوانات شناسایی شده و سپس ارتباط صحیح میان این اعضاء ارزیابی شده و برای هر حیوان گروه‌بندی می‌شوند. اما در رویکرد بالا به پایین که کارکرد مدل DLC نیز بر همین اساس می‌باشد، ابتدا هر یک از حیوانات در تصویر شناسایی و جداسازی شده و سپس نقاط کلیدی اعضاء بدن هر یک شناسایی می‌شود [۲۶].

۱-۲- آموزش مدل یادگیری عمیق DeepLabCut

فرآیند آموزش یک مدل شبکه عصبی عمیق DLC، که به صورت روش یادگیری فعال^{۲۴} می‌باشد، با استفاده از پکیج آن که برای زبان برنامه‌نویسی پایتون ارائه شده، در فلوچارت شکل (۴) نمایش داده

^{۲۴} Active learning

^{۲۵} Clustering

^{۲۶} Unsupervised learning

^{۱۹} Binary

^{۲۰} Training epoch

^{۲۱} Ground truth

^{۲۲} Bottom-up

^{۲۳} Top-down

هر دسته از فریم‌ها مربوط به یک مجموعه رفتاری مشابه خواهد بود که از تمامی دسته‌ها تعداد مشخصی فریم به عنوان نماینده آن رفتار استخراج می‌شود.

فریم‌های انتخاب شده به دو دسته داده‌های آموزش و تست با نسبت ۸۰ به ۲۰ و یا ۷۰ به ۳۰ تقسیم می‌شوند. پیش از آموزش شبکه مشخصاتی شامل معماری مدل، تعداد دورهای آموزش، نرخ یادگیری شبکه و تابع بهینه‌سازی تنظیم می‌شود. با توجه تعداد پارامترهای بالای شبکه بهتر است آموزش آن حداقل برای ۲۰۰,۰۰۰ دور ادامه پیدا کند. پس از پایان فرآیند آموزش، مدل بر روی داده‌های تست ارزیابی می‌شود. در این مرحله نقاط پیش‌بینی شده توسط مدل برای هر تصویر به همراه برجسب‌های اصلی آن‌ها به طور هم‌زمان بر روی تصاویر داده‌های آموزش قرار داده می‌شود تا میزان دقت به صورت مصور توسط کاربر ارزیابی شود.

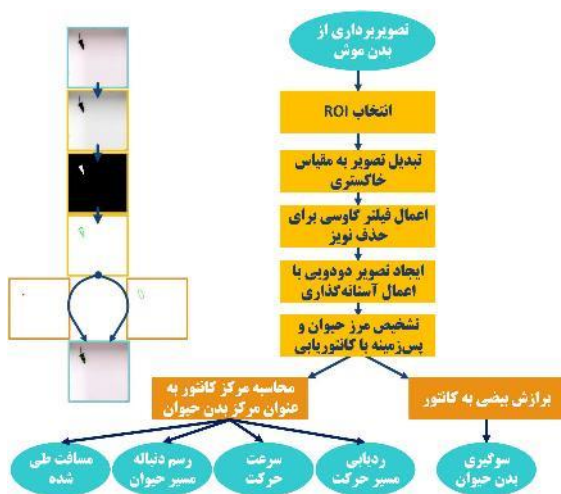
۳-۱- ردیابی حیوان توسط بینایی ماشین کلاسیک

بینایی ماشین کلاسیک در مقابل یادگیری عمیق، دقت پایین‌تری در تشخیص نقاط کلیدی حیوان دارند، اما مزیت آن‌ها در سرعت بالا و سادگی پردازش است که امکان آنالیز آنلاین ویدیو و پیاده‌سازی سیستم‌های حلقه-بسته^{۲۷} را می‌دهد [۱۶ و ۲۷].

در ردیابی بدن حیوان، ابتدا مکان حیوان نسبت به پس‌زمینه تصویر تشخیص داده شده و سپس مسیر حرکت آن در طول زمان آزمایش دنبال می‌شود. یک چالش برای استفاده از الگوریتم‌های کلاسیک برای ردیابی، محدودیت آن‌ها برای تفکیک حیوان از پس‌زمینه شلوغ و پیچیده است. برای حل این مشکل، اغلب پس‌زمینه‌ای با کنتراست بالا با بدن حیوان انتخاب می‌شود. به این معنی که برای حیواناتی با رنگ‌های تیره از پس‌زمینه ساده به رنگ سفید و برای حیوانات با رنگ پوست روشن، از پس‌زمینه تیره همگن استفاده می‌شود.

مراحل اجرای الگوریتم کلاسیک استفاده شده در این پژوهش برای تشخیص و ردیابی موش، در شکل (۵) نمایش داده شده‌است. ابتدا فریم ویدیو به مقیاس خاکستری تبدیل شده و سپس فیلتر گاوسی

با سایز هسته^{۲۸} ۵ برای حذف نویز بر روی تصاویر اعمال می‌شود. با استفاده از آستانه‌گذاری^{۲۹} بدن حیوان از پس‌زمینه جداسازی می‌شود، به این صورت که در تصویر دودویی حیوان با پیکسل‌های سفید و پس‌زمینه با مقادیر پیکسلی مشکی مشخص شوند. حد آستانه با توجه به هر محیط متفاوت خواهد بود و باید هر بار پیش از شروع پردازش، مقدار آن تنظیم شود. سپس توسط الگوریتم آشکارسازی کانتور، مرز بدن حیوان و محیط مشخص شده و بعد از آن مرکز کانتور پیدا می‌شود. برای پیدا کردن راستای بدن حیوان نیز از برازش بیضی به کانتور استفاده شده است. در خروجی پردازش، پارامترهایی شامل مختصات حیوان در طول مدت آزمایش، سرعت حرکت، راستای بدن حیوان و مجموع مسافت طی شده محاسبه می‌شود.



شکل ۵: مراحل پردازش تصاویر ویدیویی حرکت بدن حیوان با استفاده از روش پردازش تصویر سنتی.

۴-۱- ردیابی مردمک چشم

پردازش تصاویر چشم موش به منظور کمی‌سازی پارامترهایی مانند تغییرات شعاعی و حرکات مردمک، با استفاده از هر دو روش پردازش تصویر سنتی و شبکه‌های یادگیری عمیق DLC امکان‌پذیر است. در چشمان موش‌های رنگدانه‌دار^{۳۰}، به دلیل کنتراست بالایی که در نور مادون قرمز دارند، جداسازی مردمک و صلبیه آسان‌تر است. اما در موش‌های زال

²⁹ Thresholding

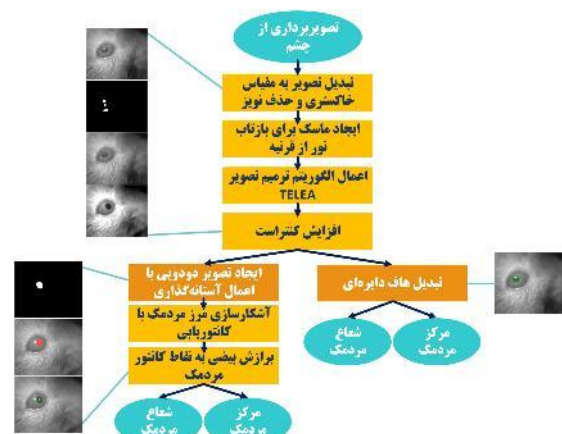
³⁰ Pigmented

²⁷ Closed-loop

²⁸ Kernel

به علت فقدان رنگدانه^{۳۱} و تأثیر عروق خونی، تصاویر دارای کنتراست پایین و نویز رنگی هستند که تشخیص عنبیه و مردمک را دشوار می‌کند. لذا الگوریتم‌های کلاسیک برای حیوان زال دقت و کارایی کافی نداشته و استفاده از شبکه‌های یادگیری عمیق برای بهبود دقت پردازش ضروری است. در ادامه پردازش تصاویر چشم با استفاده از هر دو رویکرد الگوریتم‌های سنتی و شبکه‌های DLC آورده شده است.

از آنجایی که روش‌های سنتی بسیار وابسته به تغییرات نور محیط و کیفیت تصویر هستند، نیاز به پیش‌پردازش اولیه داده‌ها می‌باشد. مراحل اجرای الگوریتم در شکل (۶) نمایش داده شده است. هر فریم در ابتدا به تصویر تک کاناله خاکستری تبدیل شده و سپس بر روی آن فیلتر گاوسی با سایز هسته 7×7 برای حذف نویزهای نمک و فلفل^{۳۲} اعمال می‌شود.



شکل ۶: مراحل محاسبه موقعیت و شعاع مردمک با الگوریتم‌های سنتی ببنایی کامپیوتر.

برای تصویربرداری، نور مادون قرمز به سطح چشم تابانده شده و با دوربین دید در شب تصاویر چشم ثبت می‌شوند. در تصاویر دوربین لکه‌ای سفید رنگ بر روی چشم مشاهده می‌شود که همان بازتاب نور مادون قرمز از قرنیه است. با توجه به الگوریتمی که برای آشکارسازی و ردیابی مردمک انتخاب می‌شود، وجود این لکه می‌تواند سبب خطا و کاهش دقت الگوریتم شود. بنابراین برای

آشکارسازی مردمک چشم موش‌های رنگدانه‌دار این لکه‌ها با استفاده از روش ترمیم تصویر^{۳۳} الگوریتم TELES حذف می‌شود. ابتدا باید یک ماسک دودویی برای محل بازتاب‌های نور به دست آید. پس از حذف نقاط نورانی و افزایش کنتراست تصاویر، دو روش تبدیل هاف دایره‌ای^{۳۴} و کانتوریابی^{۳۵} برای آشکارسازی مرکز و شعاع مردمک استفاده می‌شود. برای ردیابی مردمک در روش کانتوریابی، برای جداسازی مردمک از پس‌زمینه بر روی تصویر آستانه‌گذاری اعمال شده که حد آستانه آن باید با توجه به هر ویدیو انتخاب شود. پس از آن با کانتوریابی بر روی تصویر دودویی مرز مردمک و پس‌زمینه مشخص می‌شود که با برازش بیضی به نقاط کانتور، مرکز بیضی به عنوان مرکز مردمک و شعاع آن نیز به عنوان شعاع مردمک در خروجی به دست می‌آید. تبدیل هاف برای استخراج اشکال ساده از تصویر مانند دایره استفاده می‌شود. الگوریتم هاف دایره‌ای با مشخص کردن حد پایین و بالای شعاع دایره، در تصویر شروع به جستجوی اشکال دایره‌ای می‌کند. مرکز و شعاع دایره از مقادیر خروجی آن بوده که به عنوان مرکز و شعاع مردمک در نظر گرفته می‌شوند. اما تبدیل هاف برای تصاویری از ویدیو مردمک که دچار محوشدگی حرکتی هستند دچار خطا می‌شود.

برای محاسبه مرکز و شعاع مردمک چشم با استفاده از DLC، مطابق مراحل کار پکیج آن در شکل (۴)، ابتدا نقاط کلیدی اطراف مردمک چشم بر روی فریم‌های استخراج شده از ویدیوها برچسب‌گذاری می‌شود. مطابق فلوچارت شکل (۷)،



شکل ۷: محاسبه مرکز و شعاع مردمک با استفاده از DLC.

³⁴ Hough circle transform

³⁵ Contour extraction

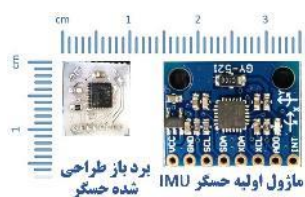
³¹ Albinism

³² Salt and pepper noise

³³ Image inpainting

N35 استفاده شده است. وزن نهایی کل ایمپلنت در حدود ۴/۵ گرم است. وزن ایده آل برای ساخت ایمپلنت های کاشتنی بر روی جمجمه موش های صحرانی کم تر از ۸ گرم می باشد. اجزای اصلی سیستم تصویربرداری از مردمک که در شکل (۸) نمایش داده شده، شامل دوربین مینیاتوری مادون قرمز^{۳۷}، آینه مادون قرمز و LED مادون قرمز (IR-LED) است. در این روش، نور مادون قرمز برای ضبط تصاویر به مردمک تابانده می شود و دوربین تصویر بازتاب شده از آینه داغ^{۳۸} را ثبت می کند. استفاده از طول موج نامرئی مادون قرمز علاوه بر جلوگیری از مداخله نور در حرکات چشم و قطر مردمک، ضبط تصویر در نور کم یا تاریک را نیز ممکن می کند. یک علت استفاده از آینه مادون قرمز، جلوگیری از انسداد میدان دید حیوان می باشد. تنظیم زاویه آینه باید پس از جراحی و کاشت قطعه روی سر و قبل از هوشیاری حیوان انجام شود. دوربین مینیاتوری رزبری پای برای نصب روی سر حیوان جهت ثبت تصاویر مردمک انتخاب شده است که از طریق کابل فلت به درگاه CSI برد رزبری پای متصل می شود.

برای اندازه گیری حرکات سر حیوان از حسگر IMU استفاده شده است. مطابق شکل (۹)، با هدف کاهش ابعاد و وزن نهایی ایمپلنت، ماژول حسگر شتاب سنج وژیروسکوپ ۶ محوره MPU6050 بازطراحی شده است. این حسگر شتاب خطی را در راستای سه محور X، Y و Z و همچنین سرعت زاویه ای را حول سه محور شتاب سنج اندازه گیری می نماید.



شکل ۹: مقایسه ابعاد ماژول حسگر شتاب سنج وژیروسکوپ ۶ محوره MPU6050 با برد حسگر مینیاتوری بازطراحی شده. کاشت ایمپلنت بر روی سر موش صحرانی نر با ۱۲ هفته سن و وزن تقریبی ۲۸۰ گرم از نژاد ویستار^{۳۹} انجام شده که مراحل

پس از پایان آموزش شبکه عصبی از مدل ذخیره شده برای شناسایی نقاط کلیدی در ویدیوهای جدید استفاده می شود. نقاط پیش بینی شده، محدوده اطراف مردمک را مشخص می کنند که برای محاسبه مختصات مرکز مردمک، به این نقاط با روش کمترین مربعات، یک بیضی برازش می شود. مختصات مرکز بیضی به عنوان مرکز مردمک و قطر آن به عنوان شعاع مردمک در نظر گرفته می شود. در صورتی که مردمک هم راستا با محور اپتیکی دوربین باشد، به صورت دایره مشاهده می شود و اگر از محور دور شود، فرم بیضی می گیرد. در سایر پژوهش ها از همین امر برای تبدیل مکان دوبعدی مردمک در تصویر دوربین به موقعیت فضایی آن در کره چشم استفاده شده است [۱۰ و ۲۸].

۲- طراحی و ساخت سیستم مطالعه رفتاری

همان طور که در شکل های (۱) و (۸) نشان داده شده، ایمپلنتی در ابعاد کوچک متشکل از حسگر IMU^{۳۶} برای اندازه گیری حرکات سر و سیستم تصویربرداری مادون قرمز جهت ثبت حالات چشم موش طراحی شده است. مطابق شکل (۸)، ایمپلنت شامل دو بخش دائمی و جداشونده است که قسمت دائمی آن از طریق جراحی روی جمجمه کاشته می شود و بخش جداشونده آن تنها در هنگام انجام تست های رفتاری بر روی سر حیوان نصب می شود. همچنین این سیستم امکان استفاده در هر دو مورد آزمایشات مربوط به موش آزاد متحرک و موش محصور شده را دارد.



شکل ۸: شماتیک طراحی سه بعدی و قطعات ساخته شده.

قطعات ایمپلنت پس از طراحی، به وسیله چاپگرهای سه بعدی رزینی مدل DLP و LCD ساخته شده اند. برای اتصال بخش جداشونده به پایه ثابت از پین هدر مینیاتوری و آهنربای نئودیمیوم

³⁸ Hot mirror

³⁹ Wistar

³⁶ IMU: Inertia Measurement Unit

³⁷ IR: Infrared

بلافاصله پس از جراحی مطابق شکل (۱۱)، در حالی که حیوان هنوز بیهوش است، پایه ایمپلنت به سر حیوان متصل شده و تنظیمات لازم برای زاویه مناسب دوربین و آینه هم‌زمان با مشاهده تصویر خروجی آن در نرم‌افزار توسعه داده شده، انجام می‌شود. از آنجایی که داروهای بیهوشی بر رفتار و حرکات چشم حیوان اثرگذار بوده و منجر به گشادشدگی مردمک و عدم تعادل حیوان می‌شود، ۳ تا ۵ روز زمان برای رفع اثرات داروها و ریکاوری در نظر گرفته و در این مدت وجود علائم درد و التهاب نیز پایش شده است. از روز چهارم پس از جراحی، برای کاهش استرس و عادت دادن حیوان، به دفعات برای ۲ تا ۳ روز متوالی در بازه‌های زمانی کوتاه ایمپلنت در محیط اصلی آزمایش رفتاری روی سر حیوان قرار داده شده و پس از گذشت این مدت، ضبط داده‌های رفتاری شروع شده است.



شکل ۱۱: آماده‌سازی و تنظیم سیستم تصویربرداری مینیاتوری بر روی سر موش پس از جراحی.

برای غربالگری اولیه قوه بینایی موش پیش از انجام جراحی، از مشاهده بازخورد پلک حیوان هنگام نزدیک کردن شی به چشم و آزمون قرارگیری بصری^{۴۲} استفاده شده است. در این آزمون رفتار موش هنگامی که از انتهای دم گرفته شده و به سمت لبه یک سکو برده می‌شود ارزیابی شده و باید پیش از اینکه به سطح برسد به بدن خود زاویه داده و پنجه‌های خود را به سمت لبه سکو بکشد. همچنین پس از کاشت ایمپلنت و

آن در شکل (۱۰) نمایش داده شده است. جراحی طبق دستورالعمل‌های کار با حیوانات انجام شده است [۲۹]. ابتدا موش با استفاده از ترکیب دارویی کتامین-زایلازین^{۴۰} بیهوش شده است. دوز مناسب دارو بیهوشی با توجه به وزن، سن و شرایط جسمی حیوان مطابق استاندارد تعیین می‌شود [۲۹]. این ترکیب دارویی برای جراحی جوندگان رایج بوده و عمق بیهوشی لازم را برای مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه می‌تواند حفظ کند که این زمان برای انجام مراحل جراحی کاشت ایمپلنت و تنظیمات نهایی محل دوربین و آینه روی سر حیوان مناسب است. سپس حیوان در دستگاه استریوتاکسی^{۴۱} قرار داده شده و پیش از شروع جراحی، چشم‌ها جهت جلوگیری از خشک شدن و آسیب به قرنیه با پماد چرب چشمی محافظت شده‌اند. پس از برش پوست و آماده‌سازی سطح جمجمه، به منظور استحکام اتصال قطعه روی سر حیوان، دو پیچ استیل به قطر ۱ میلی‌متر بر روی جمجمه کاشته شده و پس از قرارگیری قطعه بر روی سر، اطراف آن با سیمان دندان‌پزشکی پر شده است.

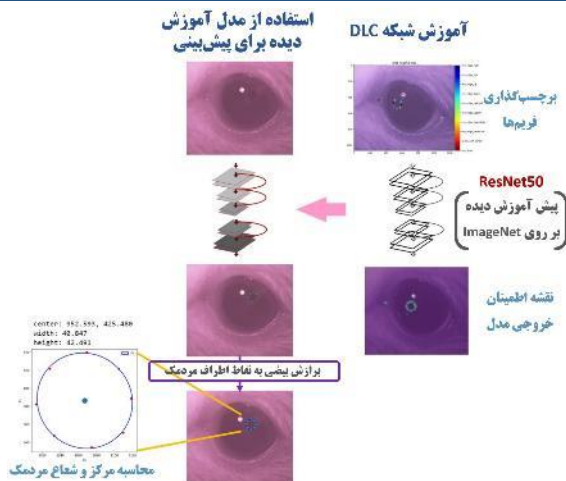


شکل ۱۰: مراحل آماده‌سازی حیوان و کاشت پایه ثابت همراه با آهنبای ایمپلنت. الف) جایگذاری سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی، ب) استریل نمودن پوست سر، ج) برش پوست سر پس از تزریق پرزوکائین^۱، د) انسداد خونریزی، ه-ز) نقاط نشانه‌گذاری، سوراخ نمودن جمجمه و کاشت پیچ‌ها، ح) کاشت قطعه با سیمان دندان‌پزشکی، ط) نمای قطعه کاشته شده پس از خشک شدن سیمان دندان‌پزشکی.

⁴² Visual placing test

⁴⁰ Ketamine - Xylazine

⁴¹ Stereotaxic



شکل ۱۴: ضبط ویدیو چشم موش در حال حرکت توسط دوربین متصل به سر و پردازش آن با استفاده از آموزش شبکه عصبی DLC و برازش بیضی.

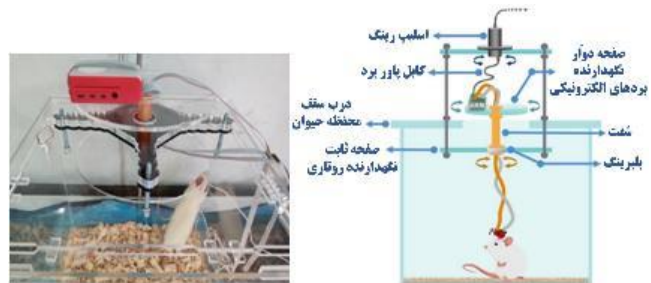
حرکت حیوان در تست‌های رفتاری سبب پیچش در کابل‌های اتصال می‌شود. لذا برای جلوگیری، یک سیستم روتاری مطابق شکل (۱۲) طراحی و ساخته شد. اساس کارکرد سیستم بر پایه حرکت دورانی بلبرینگ و واپیچش است. همچنین ثبت تصاویر بدن حیوان در تست‌های رفتاری، با نصب دوربین‌ها در بالای محفظه یا اضلاع جانبی آن انجام می‌شود. مطابق شکل (۱۳)، سه نوع دوربین، شامل دوربین دید در شب رزبری پای، وبکم و دوربین بی‌سیم با قابلیت تصویربرداری در نور کم و رزولوشن‌های مختلف استفاده شده است. الگوریتم‌های بینایی ماشین کلاسیک و یادگیری عمیق برای پردازش آنلاین و آفلاین تصاویر ثبت شده استفاده می‌شود.

۳- یافته‌ها

۳-۱- ثبت و پردازش تصاویر چشم حیوان در حال حرکت

برای ثبت حرکات مردمک چشم، ایمپلنت به پایه آهنربایی کاشته شده روی سر موش متصل شده و فرآیند تصویربرداری و ذخیره‌سازی ویدیو، توسط کاربر با استفاده از نرم‌افزار توسعه داده شده به زبان پایتون، کنترل می‌شود. نمونه تصویر ثبت

ریکاوری و پیش از شروع ثبت رفتار، علاوه بر تست‌های فوق از آزمون رفلکس نوری مردمک^{۴۳} (PLR) استفاده شده است. بدین صورت که میزان و سرعت تغییرات قطر مردمک نسبت به تغییرات شدت نور ارزیابی می‌شود. با توجه به اینکه مردمک چشم موش‌ها در نور مرئی محیطی به راحتی قابل تشخیص نیست، تست PLR با استفاده از سیستم تصویربرداری مادون قرمز ساخته شده در همین پژوهش، انجام شده است. اطمینان از سلامت چشم حیوان در مطالعات رفتاری مرتبط با بینایی، جهت جلوگیری از خطا و سوگیری نتایج اهمیت دارد، لذا استفاده از سایر روش‌های استاندارد سنجش چشم در موش‌ها با توجه به موضوع مطالعه و دقت مورد نیاز توصیه شده است [۳۰]. آزمون‌های رفتاری مانند شرطی‌سازی فعال^{۴۴} و ماز آبی^{۴۵} و تست‌های اپتوموتور^{۴۶} و اپتوکینتیک^{۴۷} و همچنین استفاده از الکترورتینوگرافی^{۴۸} در مواردی که نیاز به ارزیابی دقیق شبکه چشم می‌باشد، از جمله تست‌های رایج ارزیابی بینایی در موش‌ها هستند. سیستم مردمک‌سنجی ارائه شده در این پژوهش نیز علاوه بر اینکه امکان بررسی سلامت حرکات مردمک چشم را دارد، قابل استفاده و یا ادغام با سایر روش‌های غربالگری بینایی ذکر شده نیز می‌باشد.



شکل ۱۲: طراحی و ساخت سیستم روتاری کانکتور برای جلوگیری از پیچش کابل‌های ایمپلنت بر روی محفظه حیوان.



شکل ۱۳: چیدمان قرارگیری دوربین‌ها برای تصویربرداری رفتاری

⁴⁶ Optomotor

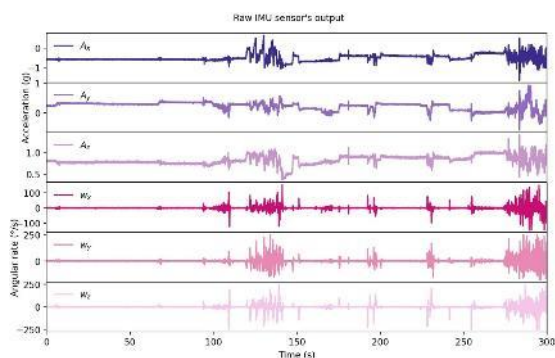
⁴⁷ Optokinetic

⁴⁸ ERG: Electroretinography

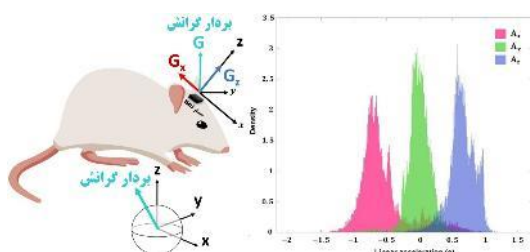
⁴³ PLR: Pupillary Light Reflex

⁴⁴ Operant Conditioning

⁴⁵ Water maze



شکل ۱۶: داده خام خروجی شتاب و سرعت زاویه‌ای حسگر IMU قرار گرفته روی سر موش در حال حرکت.



شکل ۱۷: اثر بردار گرانش در داده‌های حسگر شتاب متصل به سر حیوان.

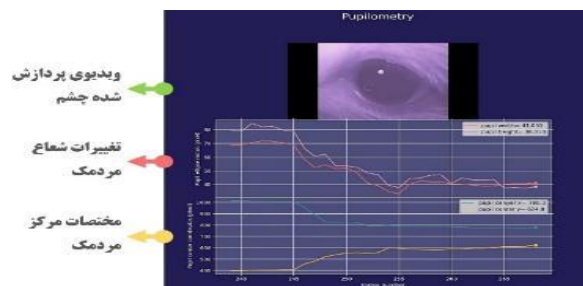
۳-۲- ثبت و پردازش حرکات سر حیوان توسط

حسگر IMU

پیش از اتصال حسگر به سر حیوان، حسگرهای IMU کالیبره می‌شوند و ضرایب انحراف و مقیاس حسگر محاسبه می‌شود. برای ثبت داده، پایه نگهدارنده حسگر توسط آهنربا به سر حیوان متصل شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار توسعه داده شده، خروجی حسگر به همراه برچسب زمانی آن‌ها ذخیره می‌شود. داده‌های خام حسگر شتاب وژیروسکوپ در نمودار شکل (۱۶) نمایش داده شده‌است که مطابق آن لحاظ سکون حیوان در داده‌ها مشخص است. با قرار دادن فیلتر آستانه بر

شده از چشم موش صحرایی در حال حرکت توسط ایمپلنت، در شکل (۱۴) نشان داده شده‌است. از آنجایی که چشم نژاد استفاده شده فاقد رنگدانه است، روش‌های کلاسیک برای بررسی حرکات مردمک مناسب نمی‌باشد و باید از مدل‌های یادگیری عمیق استفاده شود. برای آموزش مدل DLC، ابتدا از مردمک چشم تصویربرداری شده و ۱۴۰ فریم از ویدیو به صورت دستی استخراج شده‌اند. سپس فریم‌ها با استفاده از رابط کاربری متعلق به پکیج DLC برچسب‌گذاری شده‌اند. در این مرحله ۸ نقطه اطراف مردمک، یک نقطه گوشه پلک چشم و بازتاب نور LED از سطح زجاجیه به عنوان نقاط کلیدی مورد نظر برای ردیابی انتخاب شدند. این مراحل در شکل (۱۴) نمایش داده شده‌است.

مدل پیش آموزش دیده^{۴۹} ResNet50 برای لایه‌های اول شبکه DLC، که وظیفه استخراج ویژگی را دارند، استفاده شده‌است. مدل برای ۲۰۰,۰۰۰ دور، با تابع بهینه‌ساز SGD^{۵۰} آموزش داده شده و نتایج ارزیابی مدل بر روی داده‌های آموزش، خطای ۳.۱ پیکسل و برای داده‌های تست ۴.۵ پیکسل بود. مدل آموزش دیده برای پیش‌بینی نقاط کلیدی مردمک چشم در ویدیو جدید مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج مختصات نقاط از ویدیو، برای محاسبه مرکز مردمک و شعاع آن از روش برازش منحنی کمترین مربعات استفاده شده است. به این صورت که به ۸ نقطه پیرامون مردمک در هر فریم یک بیضی برازش شده و مرکز و قطرهای بیضی به عنوان مرکز و شعاع مردمک محاسبه می‌شوند. تصویر محیط نرم‌افزار برای نمایش هم‌زمان تصاویر ویدیو پردازش شده به همراه تغییرات شعاع و مکان مردمک در شکل (۱۵) نمایش داده شده‌است.

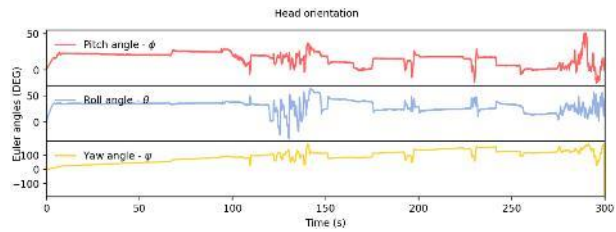


شکل ۱۵: نمایش هم‌زمان تصاویر فریم‌های دوربین و مختصات مرکز و شعاع مردمک در محیط برنامه.

⁵⁰ SGD: Stochastic Gradient Descent

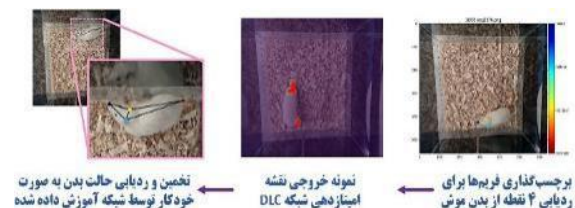
⁴⁹ Pre-trained model

روی داده‌های حسگر ژيروسکوپ می‌توان از آن برای دسته‌بندی لحظات سکون حیوان استفاده کرد.



شکل ۱۸: زوایای جهت‌گیری فضایی سر حیوان.

در مقادیر اندازه‌گیری شده توسط حسگر شتاب، مقدار شتاب ثابت گرانش نیز وجود دارد. این ویژگی برای تشخیص راستای بردار گرانش از داده‌های خام حسگر شتاب و استخراج زوایای حرکتی سر استفاده می‌شود [۱۱ و ۱۲]. همان‌طور که در شکل (۱۷) نمایش داده شده‌است، با توجه به راستای قرارگیری حسگر IMU روی سر حیوان، بردار گرانش دارای دو مؤلفه در راستای مثبت محور Z و راستای منفی محور X چهارچوب حسگر می‌باشد که اثر آن در هیستوگرام محاسبه شده برای داده‌های شتاب‌سنج متصل به سر حیوان نیز دیده می‌شود. مرکز هیستوگرام مؤلفه Y در حدود صفر است که این نشان‌دهنده حالت نرمال سر حیوان می‌باشد که در بیشتر مواقع راستایی مستقیم و زاویه‌ای رو به پایین دارد.



شکل ۱۹: آموزش مدل DLC برای ردیابی ۴ نقطه کلیدی از اندام‌ها و تخمین حالت بدن.

استخراج زوایای چرخش اوپلری^{۵۱} سر حیوان، توسط الگوریتم ادغام حسگرهای شتاب و ژيروسکوپ^{۵۲} انجام شده‌است [۳۱]. خروجی این الگوریتم به صورت چهارگان^{۵۳} بوده که با تبدیل آن به زوایای اوپلر، جهت‌گیری فضایی سر کمی‌سازی می‌شود [۱۱ و ۱۲]. در نمودار شکل (۱۸) زوایای چرخش سر حیوان به ازای داده‌های شتاب و ژيروسکوپ نمودار شکل (۱۶) محاسبه شده‌است. مشاهده می‌شود

زاویه یاو^{۵۴} با گذشت زمان دچار شیب مثبت شده‌است، که این امر ناشی از نویز موجود در داده‌های ژيروسکوپ می‌باشد که به صورت تجمعی در مقدار خروجی الگوریتم ادغام تأثیر می‌گذارد. الگوریتم ادغام حسگرهای شتاب و ژيروسکوپ تنها برای زوایای پیچ^{۵۵} و رول^{۵۶} می‌تواند مقدار خطای سوگیری حسگر ژيروسکوپ را در محاسبات جبران کند. برای رفع این مشکل باید از ادغام حسگرهای شتاب، ژيروسکوپ و مغناطیس‌سنج استفاده نمود.

۳-۳- آشکارسازی نقاط کلیدی و تخمین حالت بدن موش در حال حرکت توسط شبکه DLC

روش‌های سنتی علی‌رغم مزیتشان در سرعت اجرا، محدودیت‌هایی مانند عدم توانایی ردیابی اختصاصی اندام‌های حیوان، خصوصاً در محیط‌های پیچیده را دارند. برای این منظور برای تشخیص و ردیابی اعضای بدن موش در پس‌زمینه‌ی شلوغ و کنتراست پایین از روش یادگیری عمیق استفاده شد. در این پژوهش تمامی مراحل آموزش، ارزیابی و اجرای شبکه یادگیری عمیق DLC، بر روی کارت گرافیک در سرویس‌دهنده‌های محاسباتی فضای ابری انجام شده‌است. نتایج خروجی یک شبکه DLC آموزش داده شده بر روی تصاویر ضبط شده توسط دوربین وبکم برای ردیابی اعضا و تخمین حالت بدن موش، در شکل (۱۹) نمایش داده شده‌است. در این مدل ۴ نقطه بدن موش شامل گوش‌ها، محل اتصال دم به بدن و نوک پوزه به عنوان هدف ردیابی، انتخاب شده‌اند. از میان تمام ویدیوهای ضبط شده، سه عدد از آن‌ها که بهترین گوناگونی توزیع رفتار حیوان را داشت انتخاب شده و در مجموع ۴۴۸ فریم از این سه ویدیو با روش دستی استخراج و سپس برچسب‌گذاری شده‌است. از مدل ResNet50 پیش آموزش دیده بر روی دیتاست ImageNet به عنوان ساختار اصلی مدل و از تکنیک تقویت داده برای افزایش دقت مدل استفاده شده‌است. تعداد دوره‌های آموزش ابتدا ۳۰,۰۰۰ دور

⁵⁴ Yaw

⁵⁵ Pitch

⁵⁶ Roll

⁵¹ Euler rotation angles

⁵² Sensor fusion

⁵³ Quaternion

۳-۴- ثبت همزمان رفتار توسط دوربین‌ها و

حسگر IMU برای حیوان در حال حرکت

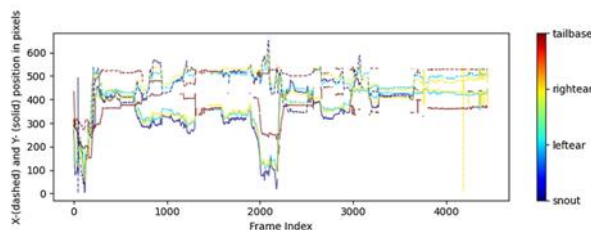
سیستم طراحی شده قابلیت ثبت همزمان داده‌های رفتاری از تمامی اجزا سیستم، شامل دوربین متصل به سر، حسگر IMU و دوربین‌های نصب شده در محیط تست رفتار را دارد. همانطور که در شکل (۲۲) نمایش داده شده، برد رزبری پای داده‌های تمام اجزا را ثبت کرده و سپس به صورت بی‌سیم، به واسطه برنامه‌نویسی سوکت و پروتکل ZMQ، آن‌ها را به کامپیوتر برای مَـصـورسازی و یا پردازش همزمان ارسال می‌کند. برای این موضوع دو برنامه مجزا برای اجرا در کامپیوتر و رزبری پای توسعه داده شده‌است.



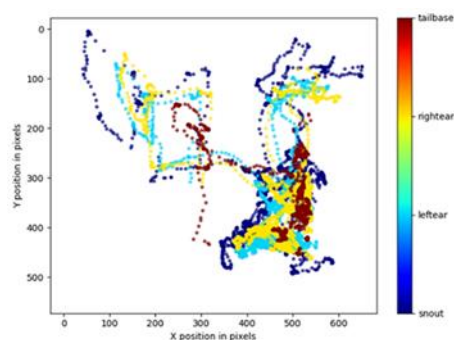
شکل ۲۲: انتقال بی‌سیم و نمایش همزمان تصاویر دوربین‌ها و داده‌های حسگر IMU از برد رزبری پای به کامپیوتر.

نتایج خروجی پردازش داده‌های ثبت شده همزمان برای موش در حال حرکت در یک بازه زمانی یکسان در نمودارهای شکل (۲۳-۲۵) نمایش داده شده‌است. نمودار شکل (۲۳) زوایای حرکتی سر حیوان و نمودار شکل (۲۴) به ترتیب از بالا مختصات مرکز مردمک، شعاع مردمک، سرعت حرکت حیوان و میزان جابه‌جایی آن در طول زمان را نشان می‌دهد.

تعریف شده و به ازای هر ۸ داده ورودی وزن‌ها توسط تابع بهینه‌ساز SGD با نرخ آموزش ۰.۰۰۵ بروزرسانی شده‌اند. وزن‌های مدل به ازای هر ۵,۰۰۰ دور ذخیره می‌شدند تا در صورت همگرا نشدن آن تا پایان فرآیند آموزش، امکان شروع مجدد آموزش شبکه از بهینه‌ترین مدل ذخیره شده وجود داشته باشد. پس از پایان آموزش، مدل بر روی داده‌های تست ارزیابی شده که دقت آن بر روی داده‌های آموزش ۲.۷۸ پیکسل و بر روی داده‌های تست ۳.۳۱ پیکسل بوده‌است. با توجه به اینکه سایز بینی حیوان که کوچکترین عضو ردیابی شده می‌باشد حدود ۴ پیکسل است، پس دقت مدل تا حدی قابل قبول می‌باشد. سپس فایل ویدیو جدید به مدل داده شده تا بر روی همه فریم‌های آن نقاط مورد نظر از بدن موش را شناسایی کرده و مطابق شکل (۱۹) مختصات مکان و اسکلت حالت بدن حیوان را بر روی ویدیوها نشانه‌گذاری نماید. نمودارهای شکل (۲۰) و (۲۱) نتایج خروجی پیش‌بینی مدل از ردیابی اعضای بدن موش در بازه ثبت ویدیو نمایش داده شده‌است.



شکل ۲۰: ردیابی ۴ نقطه از بدن موش در بازه ثبت ویدیو.

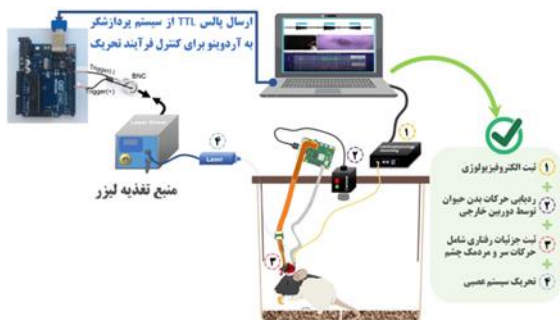


شکل ۲۱: تغییرات مکان حیوان در دو محور X و Y به ازای فریم‌های متفاوت.

موش، ب) ردیابی نقاط کلیدی بدن حیوان در محیط، ج) مکان نقاط کلیدی بدن موش در فریم‌های ویدیو، د) چگالی حضور حیوان در نواحی مختلف محیط، ه) سرعت حیوان در نواحی متفاوت در طول زمان، و) دنباله مسیر حرکت مرکز مردمک، ز) شناسایی مردمک.

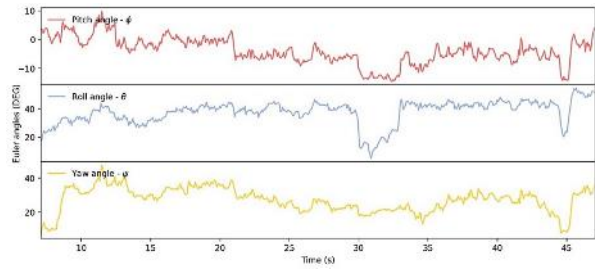
۳-۵- ادغام ثبت رفتار با سیستم حلقه-بسته تحریکی

الگوریتم پردازش تصویر سنتی ردیابی بدن حیوان قابلیت استفاده در سیستم‌های حلقه-بسته مبتنی بر تحلیل خودکار ویدیویی رفتار را دارد. سیستم تحریکی حلقه-بسته می‌تواند از نوع اپتوژنتیکی باشد که مشابه طرح‌واره شکل (۲۶) امکان ترکیب هم‌زمان این روش دستکاری اختصاصی سیستم عصبی، با سیستم‌های اندازه‌گیری و تحلیل خودکار رفتار و ثبت الکتروفیزیولوژی وجود دارد و می‌تواند ابزاری ارزشمند و کارآمد برای مطالعات علوم اعصاب باشد. در تکنیک اپتوژنتیک با برقراری شرط تحریک، تابش‌دهی توسط فیبرنوری به ناحیه هدف مغز انجام می‌شود. برای این منظور منبع تغذیه لیزر می‌تواند با توجه به مشخصات پالس تحریکی، مانند دوره تناوب، فرکانس، زمان استراحت و غیره توسط برد آردوینو کنترل شود. در شکل (۲۷)، محیط نرم‌افزار برای پیاده‌سازی یک نمونه سیستم حلقه-بسته ویدیویی رفتاری نمایش داده شده‌است.

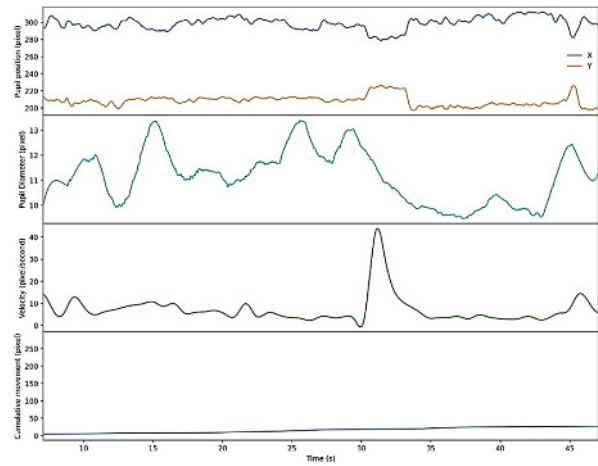


شکل ۲۶: طرح‌واره ترکیب روش‌های ثبت و تحریک هم‌زمان سیستم عصبی در کنار سیستم‌های تحلیل خودکار رفتاری.

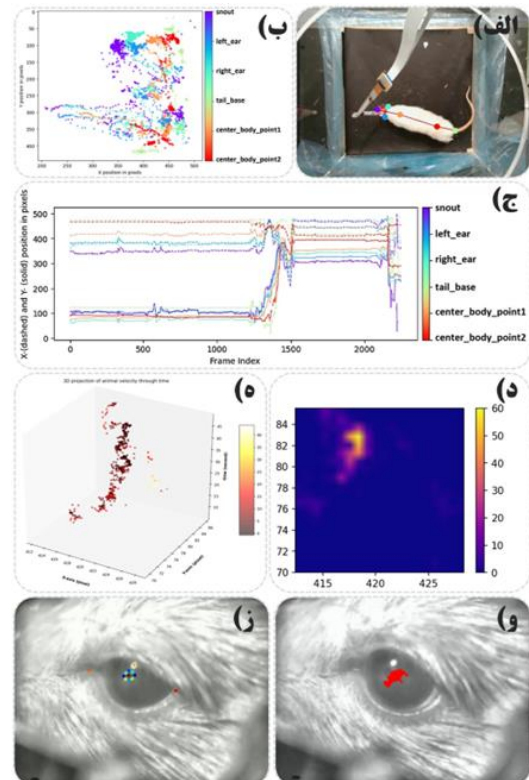
شرط شروع تحریک نوری تکنیک اپتوژنتیک، حضور حیوان در یک ناحیه مشخص از محیط تست تعریف شده که با عبور نقطه مرکزی بدن حیوان از مرز تعیین شده در برنامه، شرط



شکل ۲۳: زوایای چرخشی سر موش.



شکل ۲۴: نتایج پردازش داده‌های ثبت شده هم‌زمان از دوربین ایمپلنت و دوربین محیطی.

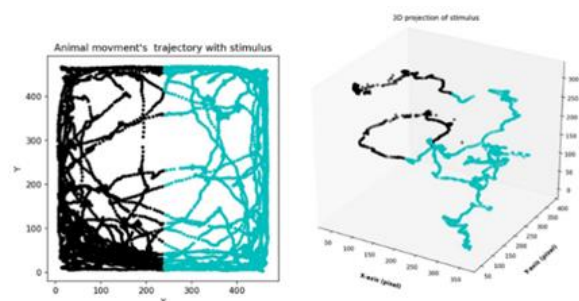


شکل ۲۵: نتایج پردازش داده‌های سیستم چندگانه بررسی رفتاری برای موش در حال حرکت. الف) ردیابی نقاط کلیدی و استخراج حالت بدن

آغاز تحریک برقرار شده است. نمودار شکل (۲۸)، لحظاتی را که شرط با حضور حیوان در ناحیه مورد نظر برقرار شده، نمایش می‌دهد.



شکل ۲۷: پیاده‌سازی سیستم تحریک و پردازش هم‌زمان داده‌های ویدیویی رفتاری.



شکل ۲۸: لحظات برقراری شرط آغاز تحریک نوری در طول تست.

۴- نتیجه‌گیری

مطالعه رفتار در علوم پزشکی و علوم اعصاب اهمیت بسیاری دارد اما تحلیل جامع آن به دلیل پیچیدگی رفتار، دشوار است. برای دستیابی به نتایج دقیق و تکرارپذیر، رفتارشناسی محاسباتی با استفاده از ضبط ویدیو و الگوریتم‌های بینایی کامپیوتر توسعه یافته است [۲] و [۳]. بررسی رفتار موش‌ها، به‌ویژه در حال حرکت، به دلیل سبزی کوچکشان چالش‌برانگیز است. در این پژوهش، سیستمی برای بررسی رفتار موش صحرانی طراحی شده که قادر به پایش حرکات چشم، جهت‌گیری سر و حالت بدن حیوان آزاد یا محصور شده است. ایمپلنتی مینیاتوری، با وزنی در حدود ۴.۵ گرم، برای کاشت روی جمجمه موش صحرانی طراحی شد که شامل دو بخش ثابت و جداشونده است؛ پایه ثابت در سر حیوان کاشته شده و بخش تصویربرداری مینیاتوری شامل دوربین مادون قرمز، LED مادون قرمز و آینه داغ تنها هنگام مطالعات رفتاری متصل می‌شود. کیفیت

تصاویر مردمک ثبت شده با این سیستم قابل مقایسه با پژوهش‌های مشابه است [۶ و ۱۰]. تصاویر مردمک با الگوریتم‌های سنتی کانتریبایی، تبدیل هاف دایره‌ای و شبکه عصبی DLC پردازش شده‌اند که موقعیت مرکز و تغییرات شعاع مردمک را استخراج می‌کنند. دوربین ایمپلنت ساخته شده قابلیت تنظیم زاویه را دارد تا علاوه بر چشم، بتواند حرکات سیبیل‌ها، لاله گوش و سایر اجزای صورت یا اشیاء محیطی پیرامون حیوان را نیز ثبت کند. پردازش این داده‌ها از جمله حرکات سیبیل‌ها نیز با شبکه‌های DLC امکان‌پذیر است [۱۰ و ۲۳].

در این طراحی از حسگر شتاب و ژيروسکوپ MPU6050 برای اندازه‌گیری حرکات سر حیوان استفاده شده که با اعمال الگوریتم ادغام حسگرهای شتاب و ژيروسکوپ بر روی مقادیر خروجی خام این حسگرها، جهت‌گیری فضایی سر به دست آمده‌اند. شیوه نمایش زوایای اوپلری که شیوه‌ای رایج برای توصیف شهودی جهت‌گیری فضایی سر حیوان می‌باشد [۱۱] و [۱۲]، مورد استفاده قرار گرفت.

ثبت ویدیویی رفتار با دوربین‌های محیطی و الگوریتم‌های سنتی و یادگیری عمیق DLC برای ردیابی بدن و استخراج نقاط کلیدی انجام شده است. الگوریتم‌های سنتی با نرخ پردازش ۲۵ فریم بر ثانیه، بار محاسباتی اندکی داشته و برای سیستم‌های حلقه-بسته مناسب‌اند. داده‌های هم‌زمان تمام اجزا سیستم، تحلیل حرکات مردمک، زوایای سر، سرعت، مسیر حرکت، ردیابی اعضا و حالت بدن موش صحرانی را به صورت کمی فراهم کرده‌اند. امکان بررسی حالت بدن حیوان به صورت سه‌بعدی با تصویربرداری هم‌زمان از رفتار حیوان در زوایای مختلف محیطی، با استفاده از چند دوربین و اعمال شبکه‌های DLC بر روی تصاویر تمام دوربین‌ها برای استخراج نقاط کلیدی بدن حیوان وجود دارد [۲۳]. برای این منظور باید پارامترهای دوربین‌ها با روش‌های کالیبراسیون تخمین زده شوند.

Neuropsychopharmacology, vol. 46, no. 1, pp. 33–44, 2021.

[۱۰] A. F. Meyer, J. Poort, J. O’Keefe, M. Sahani, and J. F. Linden, “A Head-Mounted Camera System Integrates Detailed Behavioral Monitoring with Multichannel Electrophysiology in Freely Moving Mice,” *Neuron*, vol. 100, no. 1, pp. 46–60.e7, Oct. 2018.

[۱۱] M. O. Pasquet *et al.*, “Wireless inertial measurement of head kinematics in freely-moving rats,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. October, pp. 1–13, 2016.

[۱۲] R. Fayat *et al.*, “Inertial measurement of head tilt in rodents: Principles and applications to vestibular research,” *Sensors*, vol. 21, no. 18, pp. 1–22, 2021.

[۱۳] W. Abbas and D. M. Rodo, “Computer methods for automatic locomotion and gesture tracking in mice and small animals for neuroscience applications: A survey,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 15, 2019.

[۱۴] S. Arvin, R. N. Rasmussen, and K. Yonehara, “EyeLoop: An Open-Source System for High-Speed, Closed-Loop Eye-Tracking,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 15, p. 494, Dec. 2021.

[۱۵] M. de Jeu and C. I. De Zeeuw, “Video-oculography in Mice,” *JoVE (Journal Vis. Exp.)*, no. 65, p. e3971, Jul. 2012.

[۱۶] V. Panadeiro, A. Rodriguez, J. Henry, D. Wlodkowic, and M. Andersson, “A review of 28 free animal-tracking software applications: current features and limitations,” *Lab Anim. (NY)*, vol. 50, no. 9, pp. 246–254, 2021.

[۱۷] E. Insafutdinov, L. Pishchulin, B. Andres, M. Andriluka, and B. Schiele, “DeeperCut: A Deeper, Stronger, and Faster Multi-Person Pose Estimation Model,” *Lect. Notes Comput. Sci.*, vol. 9910 LNCS, pp. 34–50, May 2016.

[۱۸] A. Mathis *et al.*, “DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning,” *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 9, pp. 1281–1289, Sep. 2018.

[۱۹] M. W. Mathis and A. Mathis, “Deep learning tools for the measurement of animal behavior in neuroscience,” *Curr.*

بررسی رفتار در طبیعی‌ترین حالت ممکن اهمیت بسیاری در نتایج مطالعات رفتارشناسی دارد و همچنین برای داشتن مطالعاتی همه جانبه از فعالیت عصبی گرفته تا رفتار، بکارگیری همزمان تکنیک‌ها و ابزارهای متفاوت مانند بررسی رفتاری، اپتوژنتیک و ثبت‌های الکتروفیزیولوژی بسیار مؤثر خواهد بود. ایمپلنت طراحی شده به دلیل وزن کم و طراحی انعطاف‌پذیر، قابلیت ترکیب آسان با سایر ابزارهای مطالعات علوم اعصاب را داراست و می‌تواند در طراحی و اجرای آزمایشات رفتاری نوین با نتایج کمی تکرارپذیر، مؤثر باشد.

منابع

[۱] J. W. Krakauer, A. A. Ghazanfar, A. Gomez-Marín, M. A. MacIver, and D. Poeppel, “Neuroscience Needs Behavior: Correcting a Reductionist Bias,” *Neuron*, vol. 93, no. 3, pp. 480–490, 2017.

[۲] S. R. Datta, D. J. Anderson, K. Branson, P. Perona, and A. Leifer, “Computational Neuroethology: A Call to Action,” *Neuron*, vol. 104, no. 1, pp. 11–24, Oct. 2019.

[۳] A. I. Dell *et al.*, “Automated image-based tracking and its application in ecology,” *Trends Ecol. Evol.*, vol. 29, no. 7, pp. 417–428, 2014.

[۴] Y. Hao, A. M. Thomas, and N. Li, “Fully autonomous mouse behavioral and optogenetic experiments in home-cage,” *Elife*, vol. 10, May 2021.

[۵] L. Berg, J. Gerdey, and O. A. Masseck, “Optogenetic Manipulation of Neuronal Activity to Modulate Behavior in Freely Moving Mice,” *JoVE (Journal Vis. Exp.)*, vol. 2020, no. 164, p. e61023, Oct. 2020.

[۶] D. J. Wallace, D. S. Greenberg, J. Sawinski, S. Rulla, G. Notaro, and J. N. D. Kerr, “Rats maintain an overhead binocular field at the expense of constant fusion,” *Nature*, vol. 498, no. 7452, pp. 65–69, Jun. 2013.

[۷] H. L. Payne and J. L. Raymond, “Magnetic eye tracking in mice,” *Elife*, vol. 6, Sep. 2017.

[۸] R. Paylor, “Simultaneous behavioral characterizations: Embracing complexity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 52, pp. 20563–20564, 2008.

[۹] L. von Ziegler, O. Sturman, and J. Bohacek, “Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling,”

- identification and tracking with DeepLabCut,” *Nat. Methods* 2022 194, vol. 19, no. 4, pp. 496–504, Apr. 2022.
- [۲۷] G.-W. Zhang, L. Shen, Z. Li, H. W. Tao, and L. I. Zhang, “Track-Control, an automatic video-based real-time closed-loop behavioral control toolbox,” *bioRxiv*, p. 2019.12.11.873372, Dec. 2019.
- [۲۸] T. Imai, Y. Takimoto, N. Takeda, A. Uno, H. Inohara, and S. Shimada, “High-Speed Video-Oculography for Measuring Three-Dimensional Rotation Vectors of Eye Movements in Mice. *PLOS ONE* 11(3), 2016.
- [۲۹] S. S. Oh and H. L. Narver, “Mouse and rat anesthesia and Analgesia,” *Current Protocols*, vol. 4, no. 2, Feb. 2024.
- [۳۰] H. Leinonen and H. Tanila, “Vision in laboratory rodents—tools to measure it and implications for behavioral research,” *Behavioural Brain Research*, vol. 352, pp. 172–182, Oct. 2018.
- [۳۱] S. O. H. Madgwick, A. J. L. Harrison, and R. Vaidyanathan, “Estimation of IMU and MARG orientation using a gradient descent algorithm,” *IEEE Int. Conf. Rehabil. Robot.*, pp. 179–185, 2011.
- Opin. Neurobiol.*, vol. 60, pp. 1–11, Feb. 2020.
- [۳۲] A. Mathis, S. Schneider, J. Lauer, and M. W. Mathis, “A Primer on Motion Capture with Deep Learning: Principles, Pitfalls, and Perspectives,” *Neuron*, vol. 108, no. 1, pp. 44–65, 2020.
- [۳۳] T. D. Pereira *et al.*, “SLEAP: A deep learning system for multi-animal pose tracking,” *Nat. Methods*, vol. 19, no. 4, pp. 486–495, Apr. 2022.
- [۳۴] J. M. Graving *et al.*, “DeepPoseKit, a software toolkit for fast and robust animal pose estimation using deep learning,” *Elife*, vol. 8, no. January 2020.
- [۳۵] T. Nath, A. Mathis, A. C. Chen, A. Patel, M. Bethge, and M. W. Mathis, “Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors,” *Nat. Protoc.*, vol. 14, no. 7, pp. 2152–2176, Jun. 2019.
- [۳۶] O. Sturman *et al.*, “Deep learning-based behavioral analysis reaches human accuracy and is capable of outperforming commercial solutions,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 45, no. 11, pp. 1942–1952, 2020.
- [۳۷] G. Lopes *et al.*, “Bonsai: An event-based framework for processing and controlling data streams,” *Front. Neuroinform.*, vol. 9, no. APR, pp. 1–14, 2015.
- [۳۸] J. Lauer *et al.*, “Multi-animal pose estimation,

Design and Development of an Implantable System for Behavioral Analysis in Rats Using Machine Vision and Deep Neural Networks for Neuroscience Applications

¹ Seyedeh Mahshad Hosseini, ¹ Mohammad Ismail Zibaii*

^{1*} Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Article details

Received: 2025/10/25

Accepted: 2025/12/5]

Published: 2025/12/8]

ISSN: 2588-493x

eISSN: 2588-4821

Correspondence email:

m_zibaye@sbu.ac.ir



Abstract

Accurate and quantitative monitoring of laboratory animals' behavior, particularly in neuroscience models, is essential for understanding the neural-circuit function and its relation with complex behaviors. In computational ethology, novel systems and algorithms have been developed to make experiments automated, more precise, and less reliant on human observers, which could improve the reproducibility and repeatability of the results. In this research, a system composed of behavior-monitoring cameras and a miniature cranial implant for rats was designed and fabricated to record the animal's body movement, track eye movements, and measure head orientation. The implant integrates an Inertial Measurement Unit (IMU) to measure head acceleration and angular velocity, as well as an infrared miniature camera for pupillometry; the total weight was about 4.5 g. A custom-developed software tool is designed to capture, process, and visualize the data. Sensor fusion of accelerometer and gyroscope data was used to compute the Euler angles of head motion. Classical computer-vision and deep neural-network algorithms were utilized for image analysis. Thresholding and edge-detection algorithms enabled real-time tracking of the pupil in pigmented rats and the body center, with a processing speed of 25 frames per second, which is suitable for closed-loop neural control. For body-pose estimation and pupil tracking in albino rats, the DeepLabCut networks were used along with data augmentation and transfer learning methods. This approach reduced the pupil detection error to 3.31 pixels after training on 448 labeled images for 30,000 iterations. While deep learning methods provide high accuracy, they impose substantial computational demands; therefore, the suitable algorithm should be chosen based on the experimental objective and available hardware resources. The proposed behavioral monitoring system can be used simultaneously with optogenetics and electrophysiological recordings, which provides a versatile and beneficial tool for advancing research in cognitive neuroscience.

Keywords: Optogenetics, computational ethology, automated video behavior analysis, pupil tracking, neural network