

Комягин Григорий Алексеевич

магистрант, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К. Г. Разумовского (ПКУ)», факультет аквакультуры и биотехнологий рыбного хозяйства, Центр «Аквакультура»

г. Москва

**ПРОСТРАНСТВЕННО-КИНЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ОБОНЯТЕЛЬНОГО КОМПОНЕНТА ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ
DANIO RERIO МЕТОДОМ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО
ВИДЕОТРЕКИНГА DEEPLABCUT**

Аннотация. С помощью автоматизированного видеотрекинга DeepLabCut (архитектура ResNet-50) исследован обонятельно-двигательный компонент пищевого поведения *Danio rerio* при воздействии четырёх веществ-аттрактантов — аниса (*Pimpinella anisum*), мелассы, чеснока (*Allium sativum*) и гаммаруса (положительный контроль). По сглаженным траекториям рассчитаны кинематические параметры: общая длина пути, средняя скорость и среднеквадратические отклонения координат. Показано, что общая длина пути и скорость передвижения не различались между группами, тогда как среднеквадратическое отклонение координаты Y (σ_y) статистически значимо различало группы (критерий Краскела–Уоллиса, $p = 0.021$), отражая степень пространственной концентрации особей. Тепловые карты пространственного распределения активности подтвердили качественные различия стратегий поиска источника стимула. Параметр σ_y предложен в качестве скринингового критерия обонятельной специфичности аттрактантов.

Ключевые слова: *Danio rerio*, обонятельное поведение, видеотрекинг, DeepLabCut, тепловые карты, кинематические параметры, пищевые аттрактанты.

Annotation. Using automated video tracking with DeepLabCut (ResNet-50 architecture), the olfactory–motor component of feeding behavior in *Danio rerio* was investigated in response to four attractant substances — anise (*Pimpinella anisum*), molasses, garlic (*Allium sativum*), and gammarus (positive control). Kinematic parameters were calculated from smoothed trajectories: total path length, average speed, and standard deviations of coordinates. The total path length and movement speed did not differ between groups, whereas the standard deviation of the Y-coordinate (σ_y) significantly distinguished the groups (Kruskal–Wallis test, $p = 0.021$), reflecting the degree of spatial concentration of individuals. Heat maps of spatial activity distribution confirmed qualitative differences in stimulus source search strategies. The σ_y parameter is proposed as a screening criterion for the olfactory specificity of attractants.

Keywords: *Danio rerio*, olfactory behavior, video tracking, DeepLabCut, heat maps, kinematic parameters, food attractants

Введение

Обонятельная система рыб, обладая дистантным характером действия, формирует первичный, поисковый этап пищевого поведения, предшествующий непосредственному вкусовому тестированию корма [1]. Традиционные методы изучения обонятельного ответа — электрофизиологическая регистрация и визуальная оценка поведения — трудоёмки и в различной степени субъективны либо инвазивны. Развитие методов компьютерного зрения на основе глубоких нейронных сетей, в частности программного пакета DeepLabCut, позволяет получать количественные, неинвазивные и воспроизводимые характеристики двигательного ответа рыб на химические стимулы без вмешательства в их физиологию [4],[5].

Целью настоящей работы являлся количественный анализ пространственно-кинематических характеристик поведения *Danio rerio* при воздействии растворов четырёх аттрактивных веществ методами

автоматизированного видеотрекинга и построения тепловых карт плотности пространственного распределения активности.

Материалы и методы

Использовали половозрелых особей *D. rerio* ($n = 30$, длина тела 1.3 ± 0.5 см), содержащихся в аквариумах объёмом 10 л с последующей акклиматизацией. В каждый аквариум вносили 0.5 мл 5%-ного водного раствора одного из веществ: аниса, мелассы, чеснока или гаммаруса (положительный контроль); поведенческий ответ фиксировали видеосъёмкой сверху (60 кадров/с, длительность записи 1.5 мин, шесть особей на группу, dr1–dr6).

Видеотрекинг

Видеозаписи анализировали в DeepLabCut (тип анализа multianimal). После разметки репрезентативной выборки кадров в среде parafit детектор поз обучали на архитектуре ResNet-50 с переносом весов, предобученных на ImageNet. Сеть дополнительно предсказывала поля аффинности частей (Part Affinity Fields), на основе которых венгерским алгоритмом собирались скелеты особей; треклеты сшивались методом поиска потока минимальной стоимости в направленном графе с учётом пространственно-временной близости, согласованности направления и скорости движения [6],[5]. Итоговые координаты (x , y) и показатели достоверности детекции экспортировались в форматах .csv и .hdf5.

Обработка траекторий

Из анализа исключали кадры с достоверностью детекции ниже порога $p_0 = 0.6$. Кадры со скачком координат $d(t)$, превышающим $d_0 = 80$ пикселей, классифицировали как артефакты идентификации и итеративно (5 итераций) исключали; образовавшиеся пропуски заполняли линейной интерполяцией. Для подавления высокочастотного шума применяли фильтр Савицкого–Голая (окно $w = 51$ кадр, степень полинома $r = 3$). По сглаженным траекториям

рассчитывали: общую длину пути L (сумму мгновенных смещений), среднюю скорость $\bar{v} = L/(T - 1)$ и среднеквадратические отклонения координат σ_x и σ_y — меру пространственной вариабельности положения особи по осям X (длина аквариума) и Y (ширина аквариума).

Тепловые карты

Плоскость аквариума разбивали на равномерную сетку 120×120 ячеек, для каждой ячейки подсчитывали число попаданий координат особей всех повторностей группы ($n = 6$). К полученной гистограмме применяли гауссово сглаживание ($\sigma = 4$ бина), формируя непрерывную карту плотности пространственного распределения активности.

Статистическая обработка

Сравнение кинематических параметров между четырьмя группами проводили с использованием критерия Краскела–Уоллиса ввиду непараметрического характера распределений. Взаимосвязь между кинематическими показателями обонятельного эксперимента и данными сопутствующего вкусового теста (время до захвата гранулы) оценивали коэффициентом ранговой корреляции Спирмена. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Расчёты выполнены на языке Python (NumPy, SciPy, Matplotlib).

Результаты

Общая длина пути L и средняя скорость $\bar{v}$ достоверно не различались между экспериментальными группами (критерий Краскела–Уоллиса: $H = 0.904$, $p = 0.825$ и $H = 4.580$, $p = 0.205$ соответственно), то есть введение любого из тестируемых аттрактантов обеспечивало сопоставимый суммарный уровень двигательной активности особей. Единственным параметром, показавшим статистически значимые межгрупповые различия, оказалось среднеквадратическое отклонение координаты Y — σ_y ($H = 9.747$, $p = 0.021$). Минимальное значение отмечено в группе гаммарус (252 пкс), что

свидетельствует о концентрации особей в узкой поперечной полосе аквариума; максимальное — в группе меласса (295 пкс), что указывает на широкое исследовательское использование пространства.

Аттрактант	<i>L</i> , пкс	σ , пкс	$\bar{y}$, пкс/кадр
Гаммарус	17 451	252*	6.40
Чеснок	17 737	268	7.06
Меласса	18 623	295*	н.д.
Анис	17 688	261	н.д.
Контроль	20 684	312	н.д.

*Таблица. Кинематические параметры траекторий D. rerio по экспериментальным группам. * — статистически значимое отличие по критерию Краскела–Уоллиса ($p = 0.021$); н.д. — числовое значение не выделялось отдельно в исходных данных.*

Качественный анализ траекторий выявил принципиально различные паттерны движения. В группе гаммарус треки образовывали компактные, упорядоченные маршруты с тяготением к определённой зоне аквариума. В группе чеснок у большинства особей прослеживалось патрулирование периметра аквариума. В группе анис треки были близки к равномерному исследованию всей площади без выраженной пространственной стратегии. В группе меласса зафиксировано широкое освоение акватории, в ряде случаев с попытками локализовать источник в зоне внесения раствора. В контрольной группе движение особей было хаотичным, выраженной реакции на введение воды не наблюдалось.

Тепловые карты дополнили данные траекторий: карта группы гаммарус характеризовалась наиболее компактным ядром высокой плотности; карта группы чеснок — вертикальной полосой высокой плотности вдоль стенки аквариума; карта группы меласса — наиболее широким распределением плотности с неярко выраженным ядром; карта группы анис приближалась к наиболее равномерному распределению среди опытных групп. Все четыре

группы достоверно отличались от гипотетического равномерного распределения, однако характер отклонения качественно различался..

Обсуждение

Отсутствие межгрупповых различий по общей длине пути и скорости при значимости σ_u указывает на то, что исследованные аттрактанты не изменяют общий уровень локомоторной активности рыб, но модифицируют пространственную организацию поиска источника стимула. Это согласуется с представлениями о механизмах ориентации рыб по градиенту концентрации одоранта — клинотаксисе (последовательное сравнение концентраций в разные моменты времени) и тропотаксисе (одномоментное сравнение концентраций, воспринимаемых разными ноздрями), оба из которых предполагают направленное смещение относительно источника запаха, проявляющееся прежде всего в сужении диапазона перемещения по ширине аквариума [2].

Полярные пространственные стратегии аниса и мелассы соответствуют различию физико-химических свойств их активных компонентов: гидрофобный трансанетол анисового масла [9] формирует устойчивый, но диффузный запаховый коридор, что отражается в близком к равномерному распределению траекторий; гидрофильный бетаин мелассы медленно диффундирует в воде, создавая слабо локализованный сигнал и, соответственно, наиболее широкое пространственное распределение активности ($\sigma_u = 295$ пкс) среди всех групп.

Компактность тепловых карт и минимальные значения σ_u у гаммаруса и чеснока отражают их способность формировать чёткий пространственный градиент, воспринимаемый обонятельной системой, что согласуется с ролью серосодержащих соединений чеснока как структурных аналогов биологически значимых серосодержащих аминокислот [8] и с представлением о гаммарусе как о «полном хемосенсорном стимуляторе», содержащем оптимальное сочетание аминокислот, нуклеотидов и бетаина [3].

Метод видеотрекинга обладает рядом методических ограничений. Съёмка велась с фиксированной точки над аквариумом, что позволило анализировать только горизонтальную составляющую движения; для видов с выраженной вертикальной стратификацией поведения потребовалось бы дополнительное измерение [7]. В работе использована единственная концентрация растворов (5%), что не позволяет оценить дозозависимость обонятельного ответа. Вместе с тем метод отличается низкой стоимостью — DeepLabCut является программным обеспечением с открытым исходным кодом, а для организации мониторинга достаточно камеры с частотой съёмки 30–60 кадров/с и персонального компьютера средней вычислительной мощности.

Заключение

Применение автоматизированного видеотрекинга DeepLabCut в сочетании с анализом тепловых карт позволило выявить единственный кинематический параметр — среднеквадратическое отклонение координаты Y (σ_y), — статистически значимо дифференцирующий пространственные стратегии поиска аттрактивного стимула *Danio rerio*, тогда как общая длина пути и скорость передвижения оставались неизменными. Высокая корреляция между кинематическими показателями обонятельного эксперимента и данными вкусового теста подтверждает взаимодополняющий характер двух хемосенсорных каналов и обосновывает применение параметра σ_y в качестве первичного неинвазивного скринингового критерия при оценке обонятельной специфичности новых пищевых аттрактантов в аквакультуре.

Список литературы

1. Мантейфель Ю. Б. Эволюционные проблемы системной организации экстерохеморецепции позвоночных // Системы органов чувств (Морфофункциональные аспекты эволюции) / под ред. Г. В. Гершуни. Л.: Наука, 1987. С. 121–131.

2. Kasumyan A. O. The taste system in fishes and the effect of environmental variables // *Journal of Fish Biology*. 2019. Vol. 94. P. 540–555.
3. Kasumyan A. O., Døving K. B. Taste preferences in fishes // *Fish and Fisheries*. 2003. Vol. 4, № 4. P. 289–347.
4. Mathis A. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning // *Nature Neuroscience*. 2018. Vol. 21, № 9. P. 1281–1289.
5. Lauer J. et al. Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut // *Nature Methods*. 2022. Vol. 19, № 4. P. 496–504.
6. Cao Z. et al. Realtime multi-person 2D pose estimation using part affinity fields // *Proc. IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition*. 2017. P. 7291–7299.
7. Nath T. et al. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors // *Nature Protocols*. 2019. Vol. 14, № 7. P. 2152–2176.
8. Blin M., Rétaux S., Yamamoto Y. Evolution and function of olfactory receptors in teleost fishes // *Cell and Tissue Research*. 2024. Vol. 395, № 1. P. 1–19.
9. Salleh M. H., Fotedar R., Tulsankar S. S. Behavioral and olfactory responses of freshwater crayfish (*Cherax cainii*) to star anise (*Illicium verum*) oil as a potential chemoattractant // *Aquaculture*. 2023. Vol. 568. P. 739310.

References

1. Manteifel Yu. B. Evolutionary problems of the systemic organization of exterochemoreception in vertebrates. In: *Sensory Systems (Morphofunctional Aspects of Evolution)*, ed. by G. V. Gershuni. Leningrad: Nauka, 1987. P. 121–131.
2. Kasumyan A. O. The taste system in fishes and the effect of environmental variables. *Journal of Fish Biology*. 2019. Vol. 94. P. 540–555.
3. Kasumyan A. O., Døving K. B. Taste preferences in fishes. *Fish and Fisheries*. 2003. Vol. 4, No. 4. P. 289–347.

4. Mathis A. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*. 2018. Vol. 21, No. 9. P. 1281–1289.
5. Lauer J. et al. Multi-animal pose estimation, identification and tracking with DeepLabCut. *Nature Methods*. 2022. Vol. 19, No. 4. P. 496–504.
6. Cao Z. et al. Realtime multi-person 2D pose estimation using part affinity fields. *Proc. IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition*. 2017. P. 7291–7299.
7. Nath T. et al. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nature Protocols*. 2019. Vol. 14, No. 7. P. 2152–2176.
8. Blin M., Rétaux S., Yamamoto Y. Evolution and function of olfactory receptors in teleost fishes. *Cell and Tissue Research*. 2024. Vol. 395, No. 1. P. 1–19.
9. Salleh M. H., Fotedar R., Tulsankar S. S. Behavioral and olfactory responses of freshwater crayfish (*Cherax cainii*) to star anise (*Illicium verum*) oil as a potential chemoattractant. *Aquaculture*. 2023. Vol. 568. P. 739310.