

Н. А. БЕРЕГОВОЙ, Б. Н. ДЕРИЙ, Л. В. ДЕРИЙ
(Новосибирск)

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ В НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Введение. В биологии сейчас можно обозначить несколько уровней исследования — от поведенческого до субмолекулярного, каждый из которых имеет свою разрешающую способность и дает информацию, органически связанную со своим «контекстом». Решение проблемы интерпретации данных, полученных на разных уровнях, мы видим в создании универсального инструмента, позволяющего объединить методы с различным разрешением в комплексном исследовании. КАМАК-системы, архитектура которых слабо зависит от методики эксперимента, оказываются эффективными для решения разных задач в рамках определенной проблемной области и могут послужить основой для такого универсального средства.

В межкаademической лаборатории комплексных исследований нейронных систем ИАиЭ СО АН СССР и ИКЭМ СО АМН СССР этот подход был реализован при автоматизации экспериментов по исследованию механизмов нервной регуляции ритма сердца человека в процессе выработки условно-рефлекторных реакций, по изучению клеточных механизмов условных рефлексов на моделях, для анализа кинетики ионных токов при фиксации потенциала мембран нервных клеток [1—3].

Предлагаемое нами решение задачи автоматизации обработки белковых спектров различных структур мозга создает предпосылки для совмещения результатов, полученных на электрофизиологическом и биохимическом уровнях исследования.

Постановка задачи. В функциональной биохимии мозга сейчас особое внимание уделяется белкам, поскольку именно они являются той структурной основой, на которой генетическая информация реализуется в разнообразные функции конкретных живых систем [4]. Этому способствовало развитие тонких методов, позволяющих проводить более полную экстракцию, очистку и фракционирование белковых молекул. Одним из лучших способов разделения является диск-электрофорез в полиакриламидном геле, обладающий целым рядом достоинств: высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, отсутствием необходимости предварительно концентрировать разбавленные растворы веществ, подлежащих разделению, и другие [5]. Основные преимущества полиакриламидного геля по сравнению с другими поддерживающими средами: простота приготовления из достаточно очищенных исходных материалов, возможность получения гелей с определенным размером пор, механическая прочность, химическая стабильность, прозрачность — позволяют получать лучшее разрешение, а также дают возможность последующей обработки результатов форе́за оптическими методами.

Гель, в котором под влиянием электрического поля произошло разделение нанесенных на него белков, окрашивается амидо-черным 10 В, специфически связывающимся с белками, после чего излишки красителя отмываются. Таким образом, форе́грамма представляет собой прозрачную пластинку с темно-синими полосами белковых фракций, расположенными перпендикулярно направлению тока (рис. 1). Электрофореграмму можно сканировать на денситометре, результатом чего является профиль ее оптической плотности — денситограмма. В большинстве исследований она

Рис. 1. Денситограмма — профиль оптической плотности электрофореграммы.

Для последующего счета радиоактивной метки гель разрезается на части пропорционально отрезкам базовой линии, рассеянной перпендикулярами.

подвергается качественному анализу — сравнению спектров между собой. Однако чаще всего различия проявляются не в исчезновении или появлении определенных фракций, а в количественных перераспределениях между ними. Для того чтобы оценить подобные изменения, совершенно необходимы методы количественной обработки денситограмм.

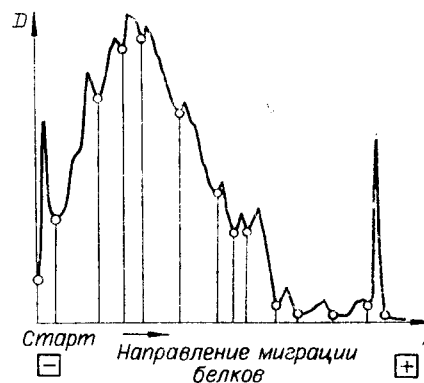
Известно, что при работе в определенных границах пропорциональности, значения которых получают опытным путем, между количеством белка во фракции и площадью соответствующего пика на денситограмме существует линейная зависимость. Поэтому основной задачей при обработке денситограмм является подсчет площадей определенных пиков, а также их суммы (для определения относительного количества). Обычно это делают вручную с помощью миллиметровой бумаги или вырезая из кальки фигуру, заключенную между профилем оптической плотности и базовой линией, и взвешивая ее на аналитических весах.

Таким образом было проведено исследование относительного количества белка типа S-100, специфического для нервной системы [6]. Однако в спектре водорастворимых белков мозга при данных условиях он движется быстрее всех и отстоит далеко от основной группы фракций, что существенно облегчает задачу: пик имеет форму нормального распределения, не представляет трудности идентифицировать его начало и конец. Гораздо сложнее провести эту операцию, если интересующий пик находится в той части денситограммы, где близко соседствующие фракции, частично перекрываясь, изменяют форму кривой таким образом, что невозможно определить границу раздела между ними. Известны работы [7, 8], где такая обработка проводится вручную: из ложбинок между пиками опускается перпендикуляр на базовую линию, а затем уже описанным способом подсчитываются площади. Очевидно, что это очень трудоемкий метод, который к тому же грешит большими неточностями.

Существуют данные, полученные при исследовании пиков газовых хроматограмм, согласно которым для вычисления площадей пиков с достаточной точностью требуется несколько большая частота квантования, чем по критерию Найквиста. Так, для восстановления площадей пиков с погрешностью менее 1 % надо использовать такую частоту квантования, которая гарантировала бы $N_{1/2} \geq 5$, где $N_{1/2}$ — количество точек на полуширину пика.

Если учесть, что электрофореграмма длиной 100 мм содержит около 20 полос (см. рис. 1), то при скорости движения стола микрофотометра 100 мм/мин для описания пиков с погрешностью менее 1 % необходимо, чтобы частота квантования была не ниже 3 Гц. Учитывая неравномерность распределения полос на электрофореграмме и разную ширину пиков, целесообразно увеличить ее до 10 Гц.

Наиболее простыми методами математического разделения пиков являются методы треугольников, «демократического» разделения и перпендикуляра [9]. Последний дает несколько худшее приближение по сравнению с методом «демократического» разделения, но является быстродействующим, в нем нет необходимости вычисления второй производной, как в случае метода треугольников. Поскольку в задачу нашего исследования входило также определение включения радиоактивной метки в



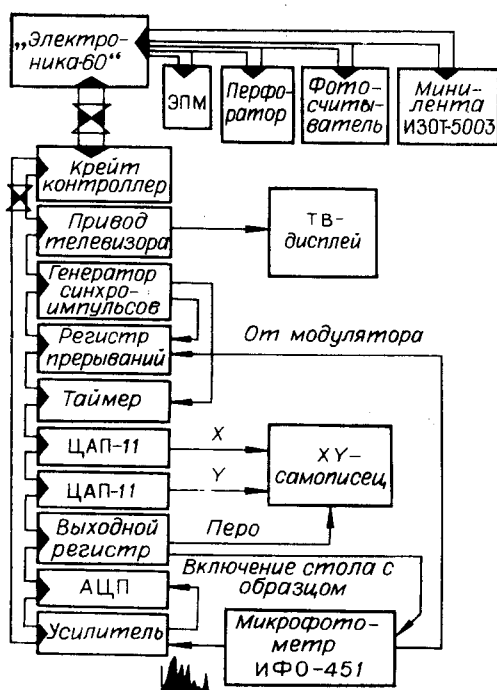


Рис. 2. Структура системы для автоматической обработки электрофореграмм.

писать простые программы на пустом месте — все это может оказаться непреодолимым барьером для нейрофизиолога. Несмотря на это, достоинства микро-ЭВМ на БИС достаточно очевидны, и многие исследователи находят упомянутые трудности вполне преодолимыми.

Почему же нельзя получить сразу два преимущества таких машин: стоимость, размеры и надежность микро-ЭВМ, с одной стороны, и полную программную совместимость с мини-ЭВМ, с которой все хорошо знакомы, — с другой? Было бы удивительно, если бы не появилась микро-ЭВМ, в которой это противоречие было снято. В отечественной промышленности требование полной программной совместимости с 16-разрядными мини-ЭВМ типа СМ-3 и СМ-4 впервые было выполнено при разработке микро-ЭВМ «Электроника-60». Свойство программной совместимости с широко распространенными в экспериментальных лабораториях и имеющими мировую известность мини-машинами должно сыграть решающую роль при выборе микро-ЭВМ для нейрофизиологических исследований. Это, во-первых, позволит использовать опыт и материал, накопленные при работе на мини-ЭВМ, и, во-вторых, даст возможность применять более мощную мини-ЭВМ, имеющую, как правило, операционную систему на НМД либо НМЛ, в качестве машины программной «поддержки», т. е. для составления программ на языках высокого уровня, редактирования, получения объектных программ и т. д.

Применение в описываемой системе микро-ЭВМ «Электроника-60» способствовало быстрому ее освоению и позволило провести подготовку всех программ средствами операционной системы RT-11, реализованной на ЭВМ М400. Использование КАМАК в качестве интерфейса между ЭВМ и серийным прибором дало возможность избежать разработки каких-либо дополнительных устройств и направить основные усилия на создание прикладных программ, обеспечивающих автоматизацию тех процедур, которые наиболее часто встречаются в биохимической практике лаборатории. При этом мы стремились к тому, чтобы сохранить возмож-

белковые фракции, что предполагало последующее разрезание геля на части, подсчет площадей с помощью метода перпендикуляра оказался предпочтительнее, так как он позволяет однозначно соотносить данные денситометрии с результатами счета радиоактивности.

Технические средства системы. Основными компонентами системы являются микро-ЭВМ «Электроника-60», крейт КАМАК и серийный микрофотометр ИФО-451 (рис. 2). Почему «Электроника-60»? При существующем многообразии типов микро-ЭВМ интерес к ним иногда остывает, когда пользователь внезапно обнаруживает, что он получил набор компонентов вместо законченной вычислительной машины, а начиная заниматься средствами программного обеспечения, выясняет, что предоставлен самому себе. Переход в мир программирования ППЗУ, использование кросс-ассемблеров и эмуляторов, а также попытка на-

ность дальнейшего развития прикладных программ силами самих экспериментаторов (биологов, биохимиков) в процессе усложнения задачи исследования.

Назначение модулей КАМАК, показанных на рис. 2, следующее. Крейт-контроллер [10] служит для организации связи между микро-ЭВМ и экспериментальным оборудованием. Измерение запускается включением стола микрофотометра через выходной регистр, после чего начинается сканирование образца. Напряжение, характеризующее оптическую плотность образца, подается на вход нормирующего усилителя со встроенным фильтром нижних частот. Выход усилителя подключен непосредственно к АЦП. Импульсы от генератора синхросигналов, задающие частоту квантования, поступают на один из входов регистра прерываний. Для определения скорости выполнения различных процедур в системе, например рисования графика, использован таймер.

В настоящее время при организации интерактивного режима «экспериментатор — система» намечается тенденция к переходу от дисплеев на ЭЛТ к дисплеям растрового типа. Основными преимуществами последних являются их простота и невысокая стоимость. В частности, для этой цели пригодны бытовые телевизоры (ТВ). Модуль управления черно-белым телевизором (привод телевизора) [11], использованный в системе, уже осваивается Опытным заводом СО АН СССР для серийного выпуска в 1981 г. Память, необходимая для воспроизведения одного кадра, а также схема регенерации изображения на экране вмонтированы непосредственно в модуль управления телевизором, поэтому наличие в системе дисплея почти не влияет на загруженность процессора, что важно при проведении экспериментов в реальном времени и интенсивном взаимодействии экспериментатора с системой через дисплей. Для получения «твердой копии» телевизионного кадра был применен стандартный двухкоординатный самописец Н-306, для управления которым служат два 11-разрядных ЦАП (координаты) и один бит выходного регистра (перо).

Программное обеспечение. Одним из самых распространенных среди экспериментаторов языков высокого уровня является Бейсик. Хотя язык в своей основе прост, он обеспечивает возможность выполнения арифметических операций, количественного сравнения, индексации, вычисления распространенных функций, составления списков, упорядочения элементов, т. е. представляет собой довольно мощное средство программирования.

Как показывает опыт, после нескольких часов работы над этим языком человек со средней подготовкой уже может составлять некоторые простые программы. К недостаткам Бейсика следует отнести его невысокое быстродействие, так как он является языком интерпретирующего типа. В экспериментах реального времени для достижения хороших временных характеристик Бейсик целесообразно использовать в комбинации с программами, требующими максимального быстродействия и написанными, например, на Ассемблере. Средства Бейсика допускают встраивание таких программ.

Нами была исследована возможность применения в системе языка высокого уровня САТУ [12], который представляет собой расширенную КАМАК-операторами модификацию Бейсика и в отличие от последнего является довольно быстродействующим, поскольку организован как компилятор. К сожалению, в САТУ отсутствует возможность вычисления элементарных функций и проведения операций в формате с плавающей запятой. В связи с этим мы использовали САТУ только для тестирования КАМАК-оборудования, проверки правильности составления алгоритмов и их отладки, где САТУ показал высокую эффективность.

Все программы, управляющие КАМАК-аппаратурой, были написаны на Ассемблере и сопряжены с Бейсиком стандартным способом [13].

Форма записи	Функция	Назначение параметров	Результат
EXF(1, E, G)	Накопление массива измерений	E — указатель начала массива, G — указатель конца массива (номера первой и последней точек)	Массив длиной G—E
EXF(2, E, G)	Вывод на графообразователь	E и G — номера первой и последней точек выводимого массива	График
EXF(3, E)	Последовательная запись в переменные Бейсика чисел из массива	E — номер первого числа	
EXF(4, D(I))	Последовательная запись переменных Бейсика (D(I)) в массив с фиксированными границами	D(I) — индексированная переменная Бейсика	
EXF(5, X, Y)	Диалог: оператор определяет, нужно ли числа, указанные на счетчике-индикаторе в кресте КАМАК, выделенные на графике пером самописца и взятые из массива с нижней границей X, заносить в массив с нижней границей Y	X — номер первой точки исходного массива, Y — номер первой точки выходного массива	Массив с нижней границей Y
EXF(6, A)	Обнуление счетчиков EXF(3, E), EXF(4, D(I)) и задание шага по X при выводе на графообразователь	A — шаг по X	—
EXF(7, B)	Считывание в переменную Бейсика числа, равного длине выходного массива в EXF(5, X, Y)	B — количество усредняемых точек при измерении, B — четное	—
EXF(8, E)	Резерв	—	—
EXF(9, E, G)	Вывод массива на растровый дисплей	E и G — номера первой и последней точек выводимого массива	График на экране ТВ
EXF(10, A)	Заливка белым экрана ТВ и задание шага по X при выводе графика на ТВ	A — шаг по X	Очистка экрана ТВ
EXF(11, E, G)	Резерв	—	—
EXF(12)	Вывод текста на экран ТВ, Выход из режима вывода текста по «#»	—	—
EXF(13, H)	Проведение базовой линии на высоте H	H — высота базовой линии	—
EXF(14)	Вывод текста на графообразователь	—	—

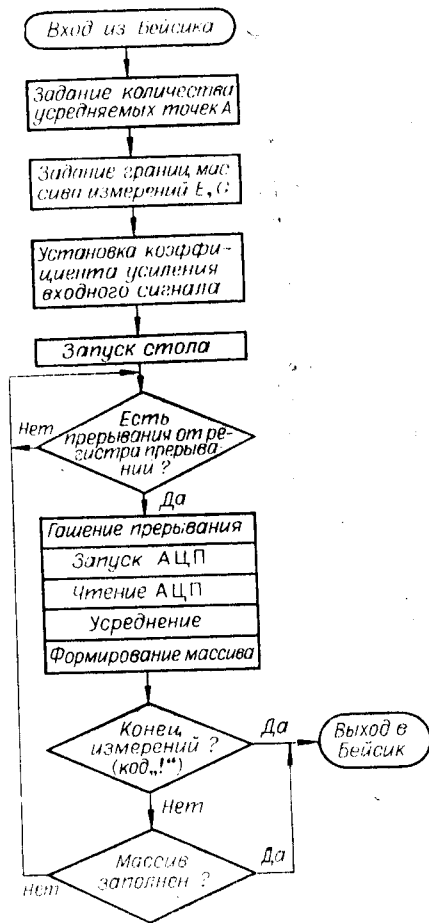


Рис. 3. Блок-схема, иллюстрирующая процесс измерения при сканировании электрофореграммы.

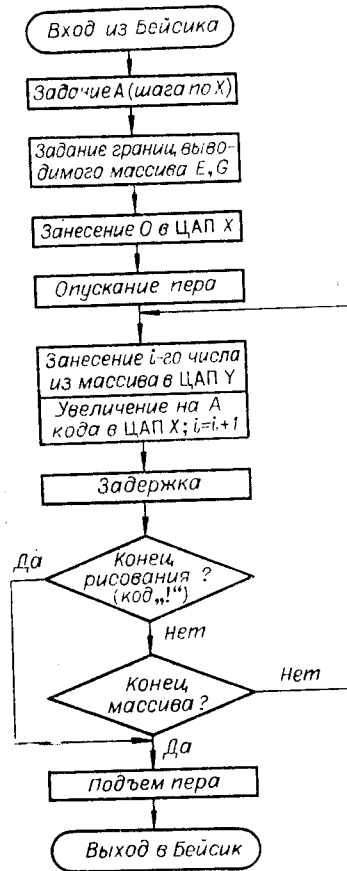


Рис. 4. Блок-схема программы рисования графиков на двухкоординатном самописце.

Внешняя программа на Ассемблере имеет несколько точек входа, каждая из которых является началом определенной управляющей подпрограммы. Эти управляющие подпрограммы дальше мы будем называть внешними функциями (EXF).

Запуск внешних функций делается из Бейсика с помощью любого оператора, содержащего обращения к EXF. Внешние функции сведены в таблицу, и для вызова одной из них достаточно в качестве первого параметра EXF указать ее номер в таблице (см. пример).

Пример

```

10 LET E=0
20 LET G=600
30 LET A=2
40 LET C=EXF (7, A)
50 LET C=EXF (1, E, G)
60 LET B=1
70 PRINT EXF (6, B)
80 LET C=EXF (2, E, G)
90 DIM D(100)
100 LET C=EXF (6, B)
110 FOR I=1 TO 99
120 LET D(I)=EXF(3, E)
130 NEXT I
140 FOR I=1 TO 99
150 LET C=EXF (4, D(I))

```

Пример

```

160 NEXT I
170 LET X=1000
180 LET Y=1100
190 LET C=EXF(5, X, Y)
200 LET U=EXF (7, A)
210 PRINT U
220 LET C=EXF (9, E, G)
230 LET C=EXF (10, A)
234 LET H=120
236 LET C=EXF (13, H)
240 LET C=EXF (12)
    1200, 200 (BK)
    (ТЕКСТ 1)
    1200, 150 (BK)
    (ТЕКСТ 2)
#

```

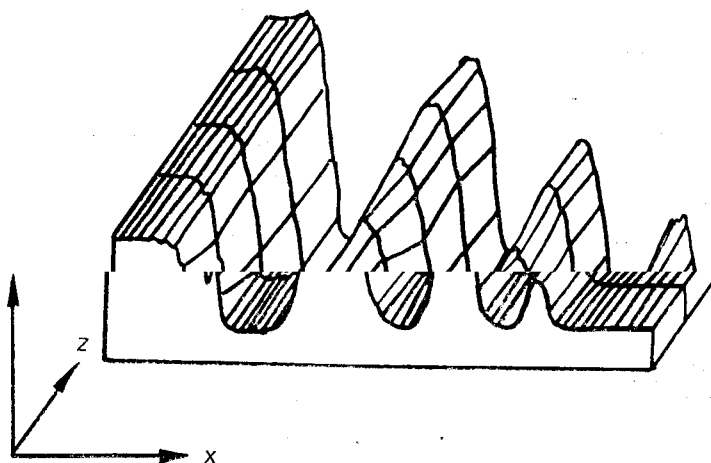


Рис. 5. Пример трехмерного графического изображения для сравнительного анализа денситограмм:

оси X — электрофоретическая подвижность белков, Y — оптическая плотность, Z — параметр, по которому производится сравнение (отдел мозга, состояние и т. д.).

Необходимый объем оперативной памяти 12 К (К-1024) слов. Из них приблизительно 4 К занимает Бейсик, 4 К — программы на Ассемблере, 4 К — программы на Бейсике, переменные Бейсика и массив Ассемблера, причем на последний отведено 2 К слов.

Процесс измерения отображен на соответствующей блок-схеме (рис. 3). Перед началом собственно измерительной процедуры программно задаются границы массива измерений, устанавливается коэффициент усиления входного сигнала и приводится в движение столик ИФО-451. По запросу от регистра прерываний (см. рис. 2) запускается цикл преобразования АЦП, и результат преобразования из буферного регистра АЦП записывается в массив. Измерения прекращаются после заполнения массива, указанного в EXF (1, E, G), или по команде оператора. При необходимости массив измерений (зависимость оптической плотности от координаты) можно вывести на графопостроитель, задав предварительно шаг рисования (A) по координате X и границы выводимого массива (см. таблицу). Процедура рисования состоит в последовательном занесении чисел из массива в ЦАП Y и увеличении каждый раз на A кода в ЦАП X. Читатель сможет уяснить принцип работы этой программы из блок-схемы на рис. 4. Выбор скорости вывода массива обусловлен быстродействием самописца.

Оператор может выводить графическую информацию не на графопостроитель, а на экран телевизора. Отличие этой процедуры от уже показанной на рис. 4 заключается лишь в структуре команд, запускающих этот режим (см. пример).

Обработка результатов измерений. Все расчетные программы написаны на Бейсике, поэтому перед обработкой необходимо получить представление массива измерений в виде переменных Бейсика. Это делается посредством специальных внешних функций, передающих данные из массива, накопленного при измерении, в массив Бейсика. Для математической обработки в Бейсике создан буферный массив.

Ниже приводится описание базовой программы на Бейсике, которая может служить исходной при усовершенствовании алгоритмов обработки.

Наиболее часто используемой характеристикой при обработке электрофореграмм является площадь отдельных фрагментов под кривой оптической плотности образца. Описываемый алгоритм состоит из двух частей: первая — разделение на фрагменты, вторая — счет площадей фрагментов и их процентного отношения к суммарной площади. Площадь отдельного фрагмента ограничена снизу базовой линией, а слева и справа — перпендикулярами, опущенными на базовую линию (см. рис. 1). Каждый фрагмент может содержать один или несколько пиков денситограммы. Следовательно, задача детектирования фрагмента в самом простом варианте сводится к нахождению минимумов на кривой оптической плотности. Эти минимумы и считаются точками, ограничивающими пик. В описываемой программе пик детектируется, если его высота, т. е. расстояние от основания пика до его вершины, больше некоторой пороговой величины, заданной перед началом работы программы. Все расчеты ведутся относительно базовой линии, проведенной на уровне самого глубокого минимума. Оператор может в диалоговом режиме исключить из рассмотрения те минимумы, зарегистрированные программой, которые, по его мнению, не являются точками, ограничивающими фрагменты. В конечном итоге результат такой совместной работы ЭВМ и оператора распечатывается на ЭВМ в следующем виде:

TOTAL SQUARE		22 058	
SQUARE		IN % FROM TOTAL SQUARE	
1	3563	%	16. 15287
2	7076	%	32. 07906
3	3533	%	16. 01686
4	7080	%	32. 0972
5	806	%	3. 654003

Заключение. Главное преимущество предложенного нами решения задачи обработки электрофореграмм перед такими прогрессивными подходами, как, например, создание денситометров со встроенными микропроцессорами (фирмы „Hitachi”, „Perkin-Elmer”, „Desaga” и пр.), состоит, во-первых, в использовании стандарта КАМАК, который уже достаточно широко развит у нас в стране, универсален и, следовательно, дешев.

Второе преимущество, которое по значимости может конкурировать с первым, — простота организации единого банка данных, полученных в разных экспериментах, в том числе на разных уровнях исследования, с целью более глубокого проникновения в причинно-следственные взаимоотношения структуры и функции живых систем. При наличии единого банка данных возможно проведение сравнительного анализа денситограмм с использованием трехмерных изображений, в которых третьей координатой может быть функциональное состояние животного (возбуждение — торможение, обучение — псевдообучение — угашение и т. п.), отдел мозга (кора — подкорковые структуры), данные электрофизиологических экспериментов и др.

Пример такого сравнительного графического изображения денситограмм для исследования тенденций изменения их компонент в зависимости от функционального состояния (ось Z) показан на рис. 5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шульман Е. И. и др. Система автоматизации исследований рефлекторных изменений сердечного ритма человека при кратковременных воздействиях. — Автометрия, 1981, № 4.
2. Дерий Б. Н. Исследование простых нейронных структур на линии с ЭВМ. Ч. 1. Аппаратно-программное обеспечение. — Автометрия, 1979, № 6.

3. Буш А. В., Гайнутдинов Х. Л., Хиченко В. И. Исследование вольт-амперных и инактивационных характеристик ионных каналов нейрональных мембран с помощью ЭВМ.— Автометрия, 1981, № 4.
4. Долгов О. Н., Полетаев А. Б., Шерстнев В. В. Белковая специфичность как основа молекулярной организации интегративной деятельности нервной системы.— УФН, 1980, т. 11, № 3.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в поллакриламидном геле. М.: Мир, 1971.
6. Горш Л. В., Лавриненко И. А., Штарк М. Б. Исследование белкового спектра различных структур мозга зимоспящих.— В кн.: Механизмы зимней спячки млекопитающих. Владивосток: изд. ДВНЦ АН СССР, 1977, с. 82—85.
7. Pohle W., Matthies H. Incorporation of ³H-leucine into Brain Cells After Learning.— Pharmac. Biochem. and Behavior., 1974, vol. 2, p. 573—577.
8. Popov N. et al. Changes in Labelling of Soluble and Solubilized Rat Brain Proteins Using ³H-leucine as Precursor During a Learning Experiment.— Acta Biol. Med. Germ., 1975, vol. 34, p. 583—592.
9. Кюлик Э. А. и др. Применение ЭВМ в газовой хроматографии. М.: Наука, 1978.
10. Касперович А. И., Солоненко В. И. Крейт-контроллер к ЭВМ «Электроника-60».— В кн.: Автоматизация научных исследований на основе применения ЭВМ. [Тез. докл. Всесоюз. конф.]. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1979, с. 6—7.
11. Приманчук Н. А. и др. Модули телевизионного дисплея в стандарте КАМАК.— Автометрия, 1980, № 4.
12. Clout P. N. CAMAC Software.— IEEE Trans. on Nuclear Sci., 1977, vol. NS-24, N 1.
13. Бэйсик. Программное обеспечение ЭВМ «Электроника-60». М.: ЦНИИЭлектроника, 1978.

Поступила в редакцию 22 января 1981 г.

УДК 150.72.002.5

Ю. К. АЛЛНК, А. Г. ЛУУК, М. Х. МПЙЛЬ

(Тарту)

АВТОМАТИЗАЦИЯ ПСИХОЛОГИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Особенности автоматизации экспериментов в психологии. Предпосылки автоматизации психологического эксперимента имеют ряд отличительных черт по сравнению с автоматизацией экспериментов в нейрофизиологии и биофизике. Как правило, в психологическом исследовании в качестве испытуемых участвуют люди, которые добровольно согласны быть в этой роли лишь ограниченное время. Поэтому психолога-экспериментатора всегда интересовало эффективное использование времени эксперимента, достижение максимально возможной организованности, надежности и краткосрочности его. Уровень этих требований еще больше возрастает, если исследование проводится в прикладных целях за счет рабочего времени испытуемого. С другой стороны, от сложного эксперимента требуется, чтобы процедура протекала для испытуемого естественно, без применения жесткого принудительного темпа со стороны экспериментатора или аппаратуры. Для каждого испытуемого заданный темп и порядок предъявления сигналов должны быть по возможности индивидуальными. Это означает, что каждый психологический эксперимент должен проходить в адаптивном режиме: такие характеристики действия испытуемого, как скорость, качественная или количественная сторона его ответной реакции определяют те или иные параметры последующей стимуляции [1, 2].

Как и в других сферах автоматизации исследований, к техническим средствам автоматизации психологического эксперимента относят ЭВМ