

ZEBRA BALIĞI *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan) YÜZME HAREKETİNİN ÜÇ BOYUTLU DÜZLEMDE TAKİBİ

Utku GÜNER

Trakya Üniversitesi, Balkan Yerleşkesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 22030 Merkez, Edirne
e-mail: uguner@trakya.edu.tr

Alınış (Received): 25 Mart 2016, Kabul Ediliş (Accepted): 22 Nisan 2016, Basım (Published): 15 Haziran 2016

Özet: Hayvan davranışlarının üç boyutlu olarak izlenmesi son yıllarda özellikle fare, sıçan ve zebra balığı gibi birçok deney hayvanında kullanılmaktadır. Temel olarak, iki düzlemde elde edilen verilerin analizi ve birleştirilmesiyle üç boyutlu hareketin oluşturulması ve analizi yapılabilir. Bu yolla elde edilecek üç boyutlu hareket tek düzlemdeki harekete göre daha doğru analiz edilebilir. Üç boyutlu hareketin belirlenmesi, özellikle balıklarda doğal hareketlerin (XYZ düzlemlerinde) daha doğru ve gerçek ortama uygun analiz edilmesini sağlar. Hayvan davranış ve aktivitelerinin izlenmesinde sayısal video izleme sistemleri manuel izlemeye göre daha avantajlıdır. Sayısal video izleme kullanıcıya bağlı hataları ortadan kaldırır ve daha hızlı ve doğru sonuç alma imkânı sağlar. Bu çalışma zebra balıkları üzerinde davranışsal aktivite izlenmesinde donanım ve yazılım sorunlarının nasıl çözülebileceğini ve zebra balığından üç boyutlu (3D) verilerin nasıl elde edilebileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Zebra balığı, video izleme teknolojisi, 3D video analizi.

Monitoring of Zebra Fish *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan) Swimming Movement in Three Dimensions

Abstract: Three-dimensional animal behavioral monitoring has recently been used in many experimental animals such as mouse, rat and zebra fish. In principle, it is possible to obtain and analyze a three-dimensional movement pattern by analyzing and combining the data in the two axes. Three dimensional movement obtained by this way might be analyzed more accurately than one dimensional movement. Determination of three dimensional movement (in XYZ axes) provides a more accurate and natural like analysis of movements particularly in fishes. Digital video monitoring systems used in animal behavior and activity studies are more advantageous than manual tracking. Digital video surveillance eliminates user based errors and provides to obtain fast and more accurate results. This research shows how to solve hardware and software problems in behavioral monitoring activity of zebra fish and how to obtain the three-dimensional (3D) data from zebra fish movements.

Key words: Zebrafish, video surveillance technology, 3D video analysis.

Giriş

Deney hayvanları içinde balıklar, davranışları ve aktivitelerinin izlenmesinde önemli bir gruptur (Srivastava ve ark. 1990). Sucul hayvanların davranışlarının izlenmesi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Scalzo ve Levin 2004, Güner 2013, Medishetti ve ark. 2013). Deney hayvanı olarak zebra balığının (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) kullanımı günümüzde artmaktadır. Zebra balığı diğer deney hayvanlarına göre (örneğin kemirgenlere) nispeten basit bir sinir sistemine sahiptir (Atchison ve ark. 1987, Green ve ark. 2012) ve bu nedenle de diğer deney hayvanları üzerinde yapılabilecek olan gen, nöral sistem, öğrenme, motor kontrol, sosyal etkileşim ve bellek araştırmalarında tercih edilmektedir (Wehnekamp ve ark. 2014). Toksik etkiye bağlı davranış değişikliklerinin incelenmesinde de zebra balığı kullanılmaktadır (Scheerbaum ve Noack 2003, Gerhardt 2007, Vutukuru ve Basani 2013). Zebra balığı ile gerçekleştirilen deneylerin en önemli avantajı,

deneylerde çok sayıda bireyin aynı anda kullanılabilir olmasıdır (Şişman ve ark. 2008). Böyle bir çalışma alternatif deney hayvanlarına göre daha küçük laboratuvar alanında, daha düşük bir maliyetle ve daha geniş veri seti ile gerçekleştirilebilir (Scalzo ve Levin 2004).

Hayvan aktivitelerinin ve davranışlarının izlenmesinde sayısal video tabanlı yöntemler diğer yöntemlere göre (örneğin direkt izlemeye) daha hızlı ve objektif ölçüm imkânı vermelerinin yanı sıra (Mathur ve Guo 2010) kullanıcı hatalarından uzak, standart ve otomatize davranışsal analizlerin yapılmasına da katkı sağlarlar (Cachat ve ark. 2011a). Sayısal video tabanlı davranış analiz yöntemleri istenen davranışları istenen sürede sürekli olarak takip etme ve aynı anda analiz etme imkânı verir (Noldus ve ark. 2001).

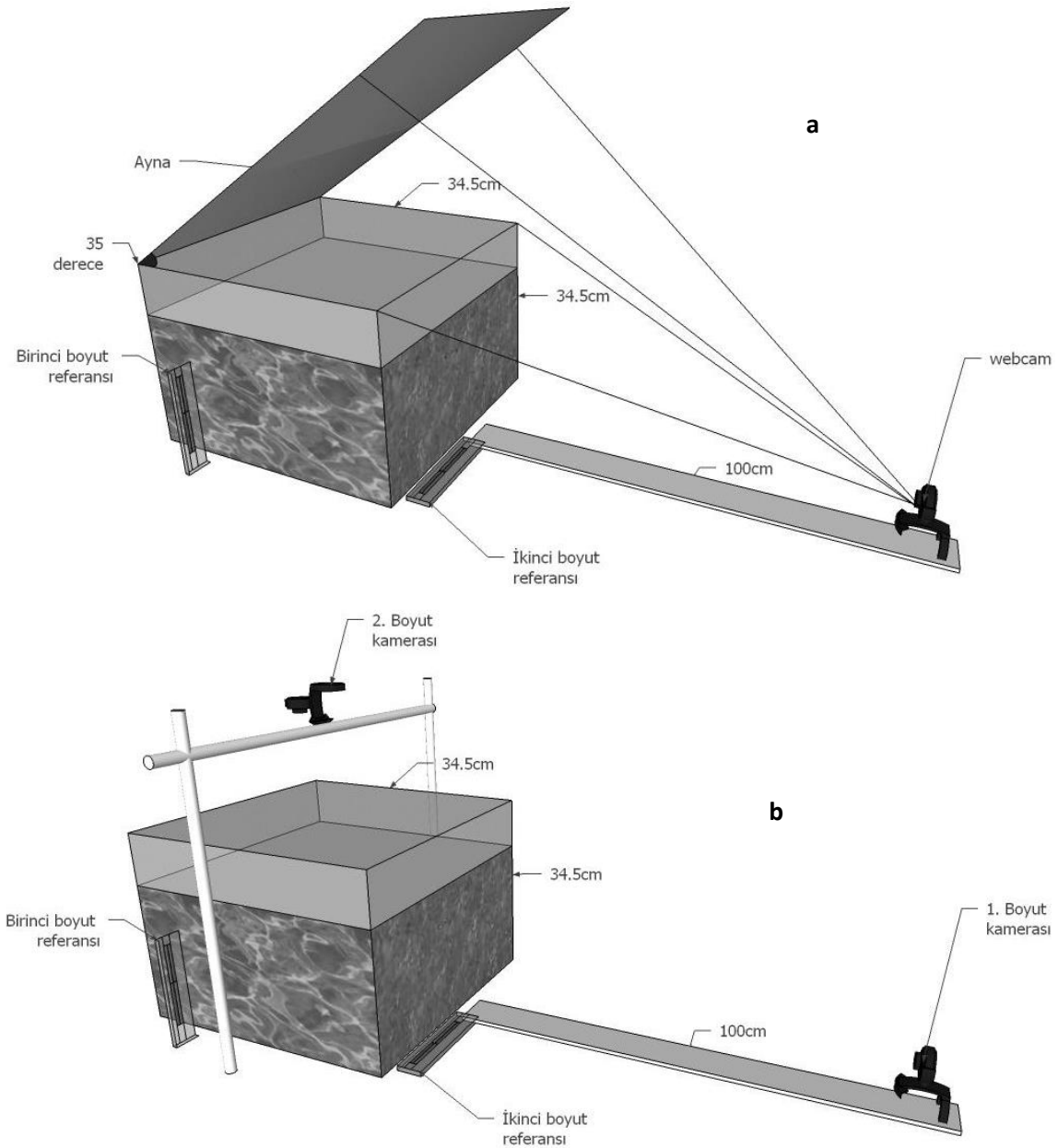
Sayısal video tabanlı sistemler ile yapılan davranış analizlerinde zebra balığı modelleri de kullanılmaktadır.

Genetik araştırmalarda da yaygın olarak kullanılan bir deney hayvanı olan zebra balığının yüzme hızı (Gerlai 2003), toplam mesafe gibi davranışlarının bilgisayar destekli olarak belirlenmesini mümkündür (Noldus ve ark. 2001). Sucul hayvan hareketlerin analizlerinde genellikle yalnızca yandan ya da üstten izleme yapılırken (Fontaine ve ark. 2008), son yıllarda üç boyutlu hareket analizleri (XYZ boyutlarında) için gereken donanım ve yazılım sorunları çözülmüştür (Spitzen ve ark. 2008, Cachat ve ark. 2011b).

Üç boyutlu (3D) bir sayısal video analizi araştırmacıya bağlı hataları ortadan kaldırır, çalışmanın güvenilirliğini artırır ve sübjektif ve yanlış yorumlamayı engeller (Spitzen ve ark. 2008). Sayısal video tabanlı yöntemlerde üç boyutlu hareketin belirlenmesindeki sorunlar son yıllarda gerçekteştirilen denemeler ile ortadan kaldırılmış

olsa da günümüzde kullanılan sayısal video analiz yazılımları direkt olarak üç boyutlu analiz yapmamaktadır. Bu nedenle de araştırmacılar iki boyutlu olarak elde ettikleri ham verileri işleyerek üç boyutlu rekonstrüksiyon aracılığı ile üç boyutlu hareket elde etmektedirler. Belirli bir süre boyunca ve iki ayrı boyutta (örneğin üstten ve yandan) elde edilen verilerin bir araya getirilmesi üç boyutlu hareketin oluşturulmasına ve analizine izin verir (Ylief ve Poncin 2003).

Bu çalışmada, zebra balıklarının davranış aktivitelerinin izlenmesinde üç boyutlu (3D) verilerin nasıl elde edilebileceği konusunda yapılan çalışmalar derlenerek, bu konudaki donanım ve yazılım sorunlarının çözümlüne yönelik uygulamalı bir değerlendirme yapılması amaçlanmıştır.



Şekil 1. Sayısal video izleme sistemi şematik görünümü a. Tek kameralı aynalı, b. İki kameralı.

Materyal ve Metot

Deneylerde ticari olarak elde edilen 0,8-1,0gr ağırlığında zebra balıkları (*Danio rerio*) kullanılmıştır. Balıklar deney ortamına alışmaları için 3 günlük bir süre ile deneylerin gerçekleştirileceği laboratuvar ortamında tutulmuştur. Deneyler, 22-25°C su sıcaklığına sahip 30litre hacimli (34,5x34,5x34,5cm) camdan yapılmış bir deney tankında gerçekleştirilmiştir (Chejiin ve Heredia 1980).

Sayısal video kayıt sistemi olarak düşük performanslı, Windows XP tabanlı bir PC ile bir ve/veya iki web kamerası (Lemon Pocket-Cam 6651) kullanılmıştır. Tüm deneyler 12:12 saat karanlık:aydınlık periyoduna sahip laboratuvarında aydınlık periyodundan gerçekleştirilmiştir. Deney ortamının aydınlatılması tavanda bulunan floresan ampulleri ile sağlanmıştır. Sayısal video kayıtları deney düzeneğine bağlı bilgisayarın ayrı bir sürücüsüne kayıt edilmiş bu yolla olası bir hata durumunda veri kaybının önüne geçilmiştir. Sayısal video görüntüsünün çözünürlüğü 320×240dpi ile 640×480dpi arasında olacak şekilde, saniyedeki kare hızı ise 30fps olarak ayarlanmıştır. Daha yüksek video kalitesinde dosya boyutları çok büyük olacağından en küçük dosya boyutunda en yüksek görüntü kalitesi parametreleriyle optimizasyon sağlanmıştır. Kullanılan yazılım, renk bilgisi kullanmadığında daha küçük boyutta kayıt dosyası oluşturduğu için görüntü siyah beyaz olarak kayıt edilmiştir. Sayısal video görüntüleri “avi” formatında kaydedilmiştir.

Balık davranışlarını bilgisayar destekli izleme ve iki boyutlu analizinde kullanabilecek az sayıda açık ve ticari yazılım vardır. Çalışmada Balık hareketlerin belirlenmesi

için 10 dakikalık görüntü kayıtları alınmış ve analiz edilmek üzere Ethovision XT7 yazılımına aktarılmıştır. Ethovision XT7 ile video görüntüleri analiz edilerek elde edilen zaman ve koordinat verileri 3D hareketin belirlenmesinde kullanılmıştır.

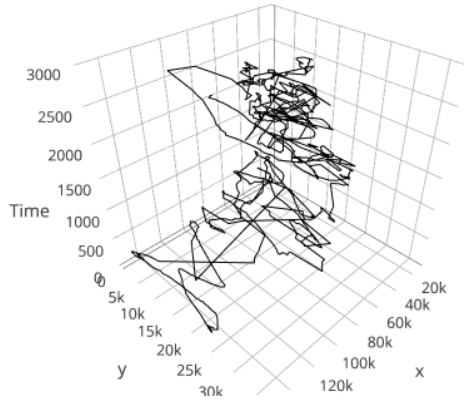
3D analiz için gerekli olan optik düzenekler bir ve/veya iki video kameralı olarak tasarlanabilir. Bu tip düzeneklerin temel noktası hareket eden hayvanın her iki düzlemdeki hareketini tek bir zaman aralığında (bir ya da iki dosya olarak üstten ve yandan) kayıt edebilmesidir. Bir kameralı sistemde tek bir video kayıt dosyası oluşturulur. Video görüntüsü alt ve üst olarak ikiye ayrılırken, görüntünün üst kısmında üstten hareket kayıt edilirken alt kısmında ise yandan hareket görüntüsü tek zaman aralığında kayıt edilir (Şekil 1A). İki kameralı sistemde ise üst ve yan görüntüler aynı anda ayrı ayrı olarak kayıt edilir (Şekil 1B).

Her iki donanımın (Şekil 1A ve B) kurulum ve kalibrasyonu maliyete göre değerlendirildiğinde avantaj ve dezavantajları olduğu ortaya çıkmıştır. Daha az optimizasyon, ayarlama ve kalibrasyon gerektiren iki kameralı sistem farklı iki görüntü dosyası oluştururken, bir kameralı sistem tek bir görüntü dosyası oluşturmaktadır. İki kamera basit ve kolay kullanılmasına (kamera açılı ve mesafelerinin tek kameralı sisteme göre kolay ayarlanması) karşın farklı iki video dosyası oluşturması ve daha yüksek maliyet nedeniyle daha uzun ve karmaşık bir analize ihtiyaç duyar.

Zebra balığı hareketlerinin 3 boyutlu analizi çalışmasında her iki deney tasarımı da kullanılmıştır. Her iki deney için de, analiz yazılımında ihtiyaç duyulan

Tablo 1. Ethovision XT7 yazılımı ile elde edilen bir ham veri örneği.

Birinci Boyut (yandan)		İkinci Boyut (üstten)		Zaman
X değeri	Y değeri	X değeri	Y değeri	
67,06	27,01	20,73	2,92	9,01
51,83	8,77	19,56	10,10	9,02
51,36	8,68	19,14	9,89	9,03
50,88	8,55	18,82	9,89	9,04
49,63	8,08	18,46	9,85	9,05
49,75	8,20	18,22	9,84	9,06
46,86	13,39	16,80	9,62	9,07
48,25	13,39	15,58	8,35	9,08
50,56	14,08	14,61	7,18	9,09
50,79	14,08	14,23	6,61	9,10
51,71	14,43	14,05	6,21	9,11
52,17	14,54	13,99	5,57	9,12
51,94	14,31	13,98	4,52	9,13
51,37	13,27	13,98	3,14	9,14



Şekil 4. İki boyutlu verilerin işlenmesi ile üç boyutlu yörünge rekonstrüksiyonu.

kalibrasyon, üzerinde 5 ve 10 cm işaretleri olan cetvellerle yapılmış ve yazılım bu yolla kalibre edilmiştir (Cachat ve ark. 2011a). Sayısal görüntülerden konum ve hız verisinin elde edilmesi için görüntünün yazılım ile işlenmesi ve analiz edilmesi gerekir (Stewart ve ark. 2010). Ethovision XT7 yazılımı her bir seferde ancak bir boyuttaki (üsten ya da yandan elde edilen) görüntüyü işleyerek ham veri (zamana bağlı mesafe bilgisi) haline getirebilir. Her iki düzlemden (şekilde Y ve Z, yandan ve üstten) elde edilen görüntüler yazılımla değerlendirilmiş ve sayısal değerlere dönüştürülmüştür. Elde edilen her iki ayrı veri dosyası, zamana bağlı olarak eşleştirilmiş ve tek bir veri dosyası haline getirilmiştir (Tablo 1).

Çalışmada farklı donanımlarla (Şekil 1A ve B; aynalı ve 2 kameralı donanım) elde edilen sayısal video görüntüler Ethovision XT7 yazılımı ile (üstten ve yandan balığın hareketlerini gösteren) veri dosyalarına (zamana bağlı XY koordinatlarından oluşan) dönüştürülmüştür. Ethovision XT7 yazılımı sayısal video görüntülerini işleyerek zamana bağlı koordinatlara dönüştürmekte ve CSV (virgül ile ayrılmış sayısal veri) veri formatında araştırmacılara vermektedir. Elde edilen verilerin doğrulanması (aynı zaman aralığında aynı verilerin alınmış olduğunun onaylanması) ve her iki veri setinin zamana bağlı olarak birleştirilme işlemi MS-Excel'de yapılmıştır (Tablo 1).

Balığın herhangi gibi zamanda üç boyutlu koordinatı (XYZ olarak) için üç adet koordinat verisi gerekmektedir (Şekil 2A ve B). Üç boyutlu koordinat verisinin ilk ikisi farklı düzlemlerden elde edilen verilerden sağlanırken üçüncü veri her iki veri setini birleştirilen zaman verisidir (Şekil 3).

Revize edilen veriler web tabanlı grafik programı olan PLOTLY (<https://plot.ly/external/9>) ile 3 boyutlu grafiğe dönüştürülmüştür (Şekil 4).

Sonuç ve Tartışma

Zebra balığı üzerinde yapılan genetik mutasyon, ilaç tarama ve toksik araştırmalarda davranış değişiminin ölçülmesi ve değerlendirilmesi, özellikle de üç boyutlu

hareketin değerlendirilmesi araştırmalara önemli katkı sağlayabilir (Saverino ve Gerlai 2008). Zebra balığı erginleri yanı sıra embriyoları üzerinde yapılan araştırmalarda da davranış değişiminin ölçülmesi araştırılmaktadır. Bu araştırmalarda elde edilen sonuçlar, memeli toksikolojisi ve teratolojisi literatürü ile paralellik göstermektedir (Bailey ve ark. 2013). Zebra balığı dışında, örneğin kemirgen modellerde üç boyutlu hareketinin belirlenmesi farklı yazılım ve donanım çözümleri gerektirmektedir. Buna karşın benzer yazılımlar kullanılmaktadır (Noldus ve ark. 2001).

Diğer balık modelleriyle karşılaştırıldığında zebra balığının sosyal bir hayvan olması dikkate alınmalıdır. Bunun yanı sıra, özellikle tüm davranış değişimi araştırmalarında su kalite parametrelerinin de dikkate alınması önemlidir (Saverino ve Gerlai 2008).

Araştırma sonunda her iki donanımla elde edilen iki boyutlu verilerden 3 boyutlu hareket grafiği çizilmiştir (Şekil 4). Bu amaçla hem donanım hem de yazılım alanında gereken optimizasyon bu araştırma ile gerçekleştirilmiştir. Üç boyutlu hareketin analizi yapılması için gereken optik ve mekanik donanım Şekil 1'de gösterilmiştir. Aynalı donanımda 33 derecelik açı ve şekildeki verilen ölçümlerde yerleştirilen ayna ile en uygun görüntünün alınması sağlanmıştır (Şekil 1A). Çalışmada önerilen donanım modelleri ile farklı organizmalarda (fare, sıçan, arı vb.) hareket analizi yapabilme imkânı vardır. Bu çalışmada verilen veri birleştirme tekniği tüm çalışmalarda kullanılabilir. Balık davranışlarının iki boyutlu analizlerindeki önemli bir sınırlama ve eksiklik olan yalnız üstten ya da yandan görüntüleme (dolayısıyla yalnızca iki boyutlu veri elde edilmesi) bu araştırma ile çözülmektedir. Üç boyutlu hareketin belirlenmesinde iki boyutlu verilerin rekonstrüksiyonu zebra balığı dışında farklı deney hayvanlarında da kullanılabilir. Özellikle balık ve uçan hayvanlarda yapılacak üç boyutlu hareket analizinde gereken donanım ve yazılım sorunları bu çalışmada sunulan veriler kullanılarak çözülebilir. Zebra balığı ile yapılan bu çalışma kolaylıkla farklı balık türlerinde ya da üç boyutlu analizi istenen hayvanlarda kullanılabilir ve benzer yaklaşımlarla yeni deney tasarımları mümkündür.

Günümüzde zebra balığı davranışlarının tek boyutlu analizlerinde kullanılan tüm parametreler üç boyutlu analizlerde de kullanılmak üzere geliştirilebilir. Belirli davranışların başlama ve sona erme noktalarının belirlenmesinde üç boyutlu analiz hatasız ve doğru veri toplama imkânı verir. Çalışmanın yapıldığı tarihte doğrudan üç boyutlu bir analiz yapan bir davranış analiz programı ticari olarak bulunmamaktadır. Buna karşın yakın bir gelecekte doğrudan 3 boyutlu analiz yapabilecek yazılımların araştırmacılara sunulması beklenmektedir. Sucul hayvanların üç boyutlu hareketinin belirlenmesinde donanım alanında özellikle kamera, optik, sayısal görüntü elde edilmesi konusunda daha fazla araştırma yapılması ve daha basit ve uygulanabilir çözümlerin bulunması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Atchison, G.J., Henry, M.G. & Sandheinrich, M.B. 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of fishes*, 18(1): 11-25.
2. Bailey, J., Oliveri, A. & Levin, E.D. 2013. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Research Part C*, 99(1): 14-23.
3. Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Kyzar, E., Wu, N. & Kalueff, A.V. 2011a. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS ONE*, 6(3): e17597.
4. Cachat, J.M., Stewart, A., Utterback, E., Kyzar, E., Hart, P.C., Carlos, D., Gaikwad, S., Hook, M., Rhymes, K. & Kalueff, A.V. 2011b. Deconstructing adult zebrafish behavior with swim trace visualizations. *Zebrafish neurobehavioral protocols*, 191-201.
5. Chejini, J.E. & Heredia, H. 1980. Design and Test of a Tank for Behavioral-Studies in Fish. *Acta Cientifica Venezolana*, 31(3): 275-280.
6. Fontaine, E., Lentink, D., Kranenbarg, S., Muller, U.K., van Leeuwen, J.L., Barr, A.H. & Burdick, J.W. 2008. Automated visual tracking for studying the ontogeny of zebrafish swimming. *Journal of Experimental Biology*, 211(8): 1305-1316.
7. Gerhardt, A. 2007. Aquatic behavioral ecotoxicology—prospects and limitations. *Human and Ecological Risk Assessment*, 13(3): 481-491.
8. Gerlai, R. 2003. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behavior genetics*, 33(5): 461-468.
9. Green, J., Collins, C., Kyzar, E.J., Pham, M., Roth, A., Gaikwad, S., Cachat, J., Stewart, A.M., Landsman, S. & Grieco, F. 2012. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. *Journal of neuroscience methods*, 210(2): 266-271.
10. Güner, U. 2013. Behavioral Changes Induced by Neonicotinoid insecticide Acetamiprid in freshwater shrimp (*Caridina nilotica*). *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 1: 6-10.
11. Mathur, P. & Guo, S. 2010. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease*, 40(1): 66-72.
12. Medishetti, R., Sripuram, V., Yellanki, S., Rao, P., Chatti, K., Oruganti, S. & Kulkarni, P. 2013. Zebra Fish Pharmacokinetic Studies. *Indian Journal of Pharmacology*, 45: 251-251.
13. Noldus, L.P., Spink, A.J. & Tegelenbosch, R.A. 2001. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers*, 33(3): 398-414.
14. Saverino, C. & Gerlai, R. 2008. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behavioural brain research*, 191(1): 77-87.
15. Scalzo, F.M. & Levin, E.D. 2004. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model system in neurobehavioral toxicology. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6): 707-708.
16. Scheerbaum, D. & Noack U. 2003. Sensitivity of the zebra fish embryo test to industrial effluents compared to the golden orfe toxicity test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(6): 663-664.
17. Spitzen, J., Spoor, C., Kranenbarg, S., Beeuwkes, J., Grieco, F., Noldus, L., van Leeuwen, J. & Takken, W. 2008. Track3D: Visualization and flight track analysis of *Anopheles gambiae* ss mosquitoes. *Proceedings of Measuring Behavior*, 2008: 133-135
18. Srivastava, A., Denschlag, H.O., Kelber, O. & Urlich K. 1990. Accumulation and Discharge Behavior of Cs-137 by Zebra Fish (*Branchydanio rerio*) in Different Aquatic Environments. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles*, 138(1): 165-170.
19. Stewart, A., Cachat, J., Wong, K., Gaikwad, S., Gilder, T., DiLeo, J., Chang, K., Utterback, E. & Kalueff, A.V. 2010. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behavioural processes*, 85(2): 198-203.
20. Şişman, T., İncekara, Ü. & Yıldız, Y.Ş. 2008. Determination of acute and early life stage toxicity of fat-plant effluent using zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*, 23(4): 480-486.
21. Vutukuru, S.S. & Basani, K. 2013. Acute effects of mercuric chloride on glycogen and protein content of Zebra fish, *Danio rerio*. *Journal of Environmental Biology*, 34(2): 277-281.
22. Wehnekamp, F., Gabriela, G., Brauchle, C., Misgeld, T. & Lamb, D.C. 2014. 3D Real-Time Orbital Tracking Microscopy in Zebra Fish Embryos. *Biophysical Journal*, 106(2): 23a-23a.
23. Yliff, M.Y. & Poncin, P. 2003. Quantifying spontaneous swimming activity in fish with a computerized color video tracking system, a laboratory device using last imaging techniques. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4): 281-282.