

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Υβριδική φωτοακουστική απεικόνιση και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού για τη μελέτη και την ποσοτικοποίηση της μελανίνης σε λέπια ψαριών.**

**ΔΡΑΓΑΝΙΔΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**

Επιβλέποντες : Δρ. Γιάννης Ζαχαράκης, Δρ. Γιώργος Τσερεβελάκης

Υπεύθυνος Καθηγητής : Ρακιτζής Θεόδωρος-Πέτρος

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του εργαστηρίου, κ. Γιάννη Ζαχαράκη που μου έδωσε την δυνατότητα να συμμετάσχω σε αυτό το πρότζεκτ και να δω από πρώτο χέρι την ερευνητική διαδικασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γιώργο Τσερεβελάκη για την μεγάλη βοήθεια του με την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για την προθυμία του να απαντήσει στις αρκετές μου απορίες. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Αθανάσιο Σαμαρά για τις πολύτιμες πληροφορίες και κατευθύνσεις που μου έδωσε για το βιολογικό κομμάτι της έρευνας. Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους κυρίους Μαυράκη Κωνσταντίνο και Οικονόμου Αθανάσιο για την άψογη συνεργασία μας κατά την λήψη ενός μεγάλου όγκου μετρήσεων.

<b>Περίληψη</b>	<b>4</b>
<b>Κεφάλαιο 1 Βιολογικό υπόβαθρο</b>	
<b>1.1</b> Λέπια	<b>5</b>
<b>1.2</b> Χρωματισμός του ψαριού	<b>5</b>
<b>1.3</b> Μελανίνη	<b>5</b>
<b>Κεφάλαιο 2 Φωτοακουστική Μικροσκοπία</b>	
<b>2.1</b> Φωτοακουστικό φαινόμενο	<b>8</b>
<b>2.2</b> Παραγόμενη Κυματομορφή	<b>9</b>
<b>2.3</b> Πλεονεκτήματα ΦΜ	<b>10</b>
<b>2.4</b> Ενδογενείς Παράγοντες Αντίθεσης	<b>11</b>
<b>2.5</b> Κατηγορίες ΦΜ	<b>11</b>
<b>Κεφάλαιο 3 Μικροσκοπία Φθορισμού</b>	
<b>3.1</b> Φθορισμός	<b>13</b>
<b>3.2</b> Αυτοφθορισμός	<b>14</b>
<b>3.3</b> Μικροσκοπία Φθορισμού	<b>15</b>
<b>3.4</b> Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού σάρωσης λέιζερ	<b>16</b>
<b>Κεφάλαιο 4 Υβριδική Μικροσκοπία</b>	<b>17</b>
<b>Κεφάλαιο 5 Υλικά και Μέθοδοι</b>	
<b>5.1</b> Πειραματική διάταξη	<b>19</b>
<b>5.2</b> Προετοιμασία δειγμάτων	<b>22</b>
<b>5.3</b> Πειραματική διαδικασία	<b>22</b>
<b>5.4</b> Ταυτοποίηση μελανοκυττάρων	<b>22</b>
<b>5.5</b> Επεξεργασία εικόνων	<b>23</b>
Γράφημα συσχέτισης φωτοακουστικού σήματος με συγκέντρωση	
<b>5.6</b> μελανίνης	<b>24</b>
<b>Κεφάλαιο 6 Αποτελέσματα</b>	
<b>6.1</b> Σύγκριση ετεροειδών ψαριών	<b>25</b>
<b>6.2</b> Σύγκριση ομοειδών ψαριών με διατροφικές διαφοροποιήσεις	<b>30</b>

### ***Περίληψη***

Σε αυτήν την έρευνα, υποδεικνύουμε έναν καινοτόμο και αξιόπιστο τρόπο ανάλυσης και ποσοτικοποίησης της μελανίνης σε λέπια ψαριών διάφορων ειδών. Για την υλοποίηση του στόχου αυτού, χρησιμοποιήσαμε ένα υβριδικό σύστημα απεικόνισης το οποίο συγχωνεύει δυο τεχνικές μικροσκοπίας, την μικροσκοπία αυτοφθορισμού και την φωτοακουστική μικροσκοπία. Η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση της μελανίνης μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για το ίδιο το ψάρι τόσο σε επίπεδο φυσιολογίας, καθώς αυτή η χρωστική ουσία αποτελεί δείκτη της υγείας και της ευζωίας του οργανισμού, αλλά και σε οικονομικό επίπεδο, αφού το χρώμα του δέρματος του ψαριού αποτελεί κριτήριο για την ποιότητα του. Προβήκαμε λοιπόν, στην απεικόνιση λεπιών από λαβράκι, τσιπούρα και φαγκρί θαλάσσης και μετά την επεξεργασία των σημάτων τους, παρατηρήσαμε διαφορές μεταξύ τους τόσο στην ποσότητα όσο και στην κατανομή της μελανίνης. Επίσης απεικονίσαμε δείγματα λεπιών που ανήκαν σε 2 ομάδες τσιπουρών ιχθυοτροφείου, όπου στη μία ομάδα είχε δοθεί τροφή με αντιμελανικές ιδιότητες, και μετά την ανάλυση των σημάτων, επισημάναμε διαφορές στο ποσοστό επικάλυψης της επιφάνειας του λεπιού από την μελανίνη. Τέλος, εκμεταλλευόμενοι των φωτοακουστικών σημάτων πρότυπων δειγμάτων μελανιού σουπιάς σε τζελ αγαρόζης, κατασκευάσαμε ένα γράφημα συσχέτισης του φωτοακουστικού σήματος με συγκέντρωση μελανίνης για την μετάφραση του σήματος μελανίνης από Volt σε συγκεντρώσεις. Έχοντας διαθέσιμη πλέον μια αξιόπιστη μέθοδο για την ποσοτικοποίηση και μελέτη της μελανίνης, προστίθεται ένα παραπάνω εργαλείο στις μελλοντικές έρευνες για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου και των λειτουργιών της σε έναν οργανισμό.

## ***Κεφάλαιο 1: Βιολογικό υπόβαθρο***

### ***1.1 Λέπια***

Τα λέπια είναι μικρές άκαμπτες πλάκες οι οποίες περιβάλλουν το δέρμα του ψαριού. Ένα λέπι είναι ουσιαστικά μια συσσωμάτωση κερατοκυττάρων, η οποία σχηματίζεται από οστά<sup>[1]</sup> που προέρχονται από τη δερμίδα, το στρώμα του δέρματος που βρίσκεται ανάμεσα στην επιδερμίδα και στους υποδόριους ιστούς<sup>[2]</sup>. Τα λέπια έχουν ως ρόλο να προστατεύουν το ψάρι τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες όσο και από θηρευτές, λειτουργώντας ως μια ασπίδα ενώ ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται με την επιδερμίδα είναι ο εξής: το ένα άκρο είναι είτε ενσωματωμένο στη σάρκα είτε προσκολλημένο εσωτερικά με οστά και το άλλο άκρο είναι ελεύθερο και στραμμένο προς την ουρά του ψαριού.

### ***1.2 Χρωματισμός του δέρματος***

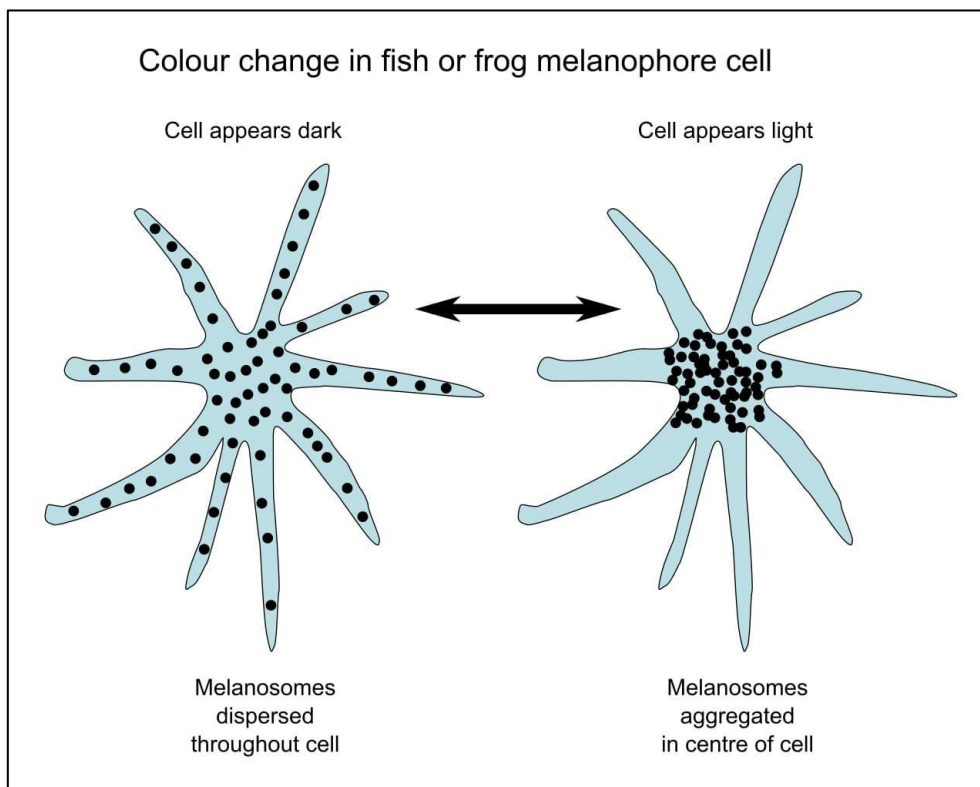
Σε ένα ψάρι, ο χρωματισμός του δέρματος του είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού τριών χρωστικών ουσιών που περιέχονται μέσα σε κύτταρα που ονομάζονται χρωμοφόρα. Οι τρεις αυτές χρωστικές είναι η μελανίνη, η ξανθίνη και η ερυθρίνη.<sup>[3]</sup> Ανάλογα με τις ποσότητες αυτών και την κατανομή τους στο δέρμα, το ψάρι φέρει και αντίστοιχο χρώμα.

Τα διάφορα είδη ψαριών, όπως είναι αναμενόμενο, εμφανίζουν διαφορές στο χρώμα τους. Μερικές από τις παραμέτρους που επιφέρουν αυτές τις διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικά είδη είναι τα φυλετικά χαρακτηριστικά, η διατροφή, το φυσικό περιβάλλον μέσα στο οποίο ζει και εξελίσσεται ο οργανισμός, γνωστό και ως ενδιαίτημα<sup>[4]</sup>, ο βαθμός έκθεσης στην ακτινοβολία, οι αντιθηρευτικές προσαρμογές κλπ. Διαφοροποίηση ως προς τον χρωματισμό εμφανίζεται όμως και σε ψάρια του ίδιου είδους. Οι διαφορές αυτές ονομάζονται ενδοειδικές και οφείλονται κυρίως σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία του νερού, το χρώμα του υποβάθρου, το φάσμα και η ένταση του φωτός.<sup>[5]</sup>

### ***1.3 Η μελανίνη***

Όπως προαναφέρθηκε, η μελανίνη είναι μια χρωστική ουσία υπεύθυνη για τον χρωματισμό του δέρματος. Η σύνθεση, η αποθήκευση και η μεταφορά της χρωστικής αυτής λαμβάνει χώρα στα μελανοσώματα, τα οποία είναι οργανίδια που βρίσκονται μέσα στα μελανοκύτταρα.<sup>[6]</sup>

Σε πολλά είδη ψαριών τα μελανοσώματα εμφανίζουν την δυνατότητα κίνησης μέσα στα μελανοκύτταρα με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αλλαγές στο χρωματισμό του ψαριού. Οι αλλαγές αυτές αποσκοπούν συνήθως είτε για την φωτοπροστασία του ψαριού είτε για κάποια συμπεριφορική σηματοδότηση. Η παραπάνω διαφοροποίηση στην κατανομή της μελανίνης μπορεί να εξηγηθεί κοιτώντας το φαινόμενο σε μοριακό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, στα μελανοκύτταρα υπάρχουν κάποιοι μοριακοί κινητήρες, οι οποίοι όταν λάβουν σήμα, είτε μεταφέρουν μελανοσώματα στην περιφέρεια του κυττάρου είτε τα συγκεντρώνουν στο κέντρο του. Όταν τα μελανοσώματα είναι διασκορπισμένα στην περιφέρεια τότε εξασφαλίζεται μεγαλύτερη φωτοπροστασία του κυττάρου και αυτό μάλιστα φαίνεται πιο σκούρο ενώ όταν τα μελανοσώματα συσσωρεύονται στο κέντρο, το κύτταρο έχει πιο ανοιχτό χρώμα.<sup>[7]</sup>



Εικόνα 1. Οι δυο διαφορετικοί τρόποι κατανομής των μελανοσωμάτων σε ένα μελανοφόρο κύτταρο ψαριού.[7]

Ένας βασικός ρόλος της μελανίνης στα ψάρια, όπως και στον άνθρωπο, είναι η προστασία του DNA των κυττάρων από αλλοιώσεις εξαιτίας της υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας. Ανάλογα λοιπόν, με το βαθμό έκθεσης στην ακτινοβολία ή αλλιώς, ανάλογα με το βάθος που ζει το εκάστοτε είδος ψαριού, το ίδιο φέρει και αντίστοιχες ποσότητες μελανίνης, τις οποίες κατανέμει με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίσει την μέγιστη προστασία του. Πέρα από την προστασία από την επιβλαβή ακτινοβολία, η μελανίνη προσφέρει προστασία και από

τυχόν θηρευτές μέσω του καμουφλάζ (ειδικότερα σε σκοτεινά οικοσυστήματα) ενώ συνδέεται και με την ρύθμιση της θερμοκρασίας του οργανισμού.

Επιπλέον, η μελανίνη εμφανίζει άμεση συσχέτιση με τον τρόπο που αποκρίνονται τα διάφορα είδη στη κλιματική αλλαγή. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι απέναντι σε αλλαγές εξαιτίας της υπερθέρμανσης του πλανήτη όπως η αύξηση της UV ακτινοβολίας, η αύξηση της θερμοκρασίας και της υγρασίας, η ερημοποίηση εκτάσεων κλπ., τα είδη που φέρουν μη αμελητέες ποσότητες μελανίνης παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβιωσιμότητα. Η μελανίνη λοιπόν, μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας ανθεκτικότητας απέναντι στην κλιματική αλλαγή.<sup>[8]</sup>

Τέλος, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της μελανίνης και της ικανότητας του οργανισμού να αντιστέκεται σε μολύνσεις από παράσιτα<sup>[9]</sup>. Η μελανοποίηση του δέρματος θα μπορούσε άμεσα να αποτρέψει τον πολλαπλασιασμό των παράσιτων μέσα ή πάνω στο σώμα του ψαριού μέσω της τοξικότητας των μορίων μελανίνης ενώ η ίδια η μελανίνη, ούσα στενά συνδεδεμένη με το ανοσοποιητικό σύστημα, θα μπορούσε να σηματοδοτήσει και αντίστοιχες ανοσολογικές αποκρίσεις του οργανισμού για τον περιορισμό της αναπαραγωγής των παράσιτων.<sup>[10]</sup>

Γίνεται αντιληπτό λοιπόν, ότι η εύρεση ενός τρόπου ποσοτικοποίησης της μελανίνης θα αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο για να μπορέσουμε να εξάγουμε χρήσιμες πληροφορίες και συμπεράσματα για το ψάρι. Μάλιστα, θεωρείται ότι η περιεκτικότητα και η κατανομή της σε ένα ψάρι μπορούν να αποτελέσουν δείκτη της υγείας και της ποιότητας διαβίωσης του σε περιβάλλοντα ιχθυοκαλλιέργειας ενώ παράλληλα, έρχονται στο προσκήνιο και οικονομικοί παράγοντες καθώς το χρώμα της σάρκας και του δέρματος θεωρούνται βασικά κριτήρια για την ποιότητα του ψαριού.<sup>[5]</sup>

Στο δικό μας πείραμα, υλοποιήσαμε την ποσοτικοποίηση αυτή με την απεικόνιση λεπιών του εκάστοτε είδους ψαριού που θέλαμε να μελετήσουμε. Στο ελεύθερο άκρο των λεπιών υπάρχει μια περιοχή με μελανοφόρα κύτταρα του δέρματος και είναι αυτή η περιοχή που μας δίνει το φωτοακουστικό σήμα.

## Κεφάλαιο 2: Φωτοακουστική Μικροσκοπία

### 2.1 Φωτοακουστικό Φαινόμενο

Η φωτοακουστική μικροσκοπία είναι μια ανερχόμενη μέθοδος απεικόνισης και η βασική της διαφορά από την οπτική μικροσκοπία είναι ότι, ενώ και εδώ υφίσταται ακτινοβολήση του δείγματος, αυτό που ανιχνεύεται είναι υπέρηχος και όχι φως.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο φωτοακουστικό φαινόμενο. Πιο αναλυτικά, μία δέσμη εξέρχεται από την παλμική ή χρονικά μεταβαλλόμενη (ως προς την ένταση) πηγή laser και προσπίπτει πάνω στο δείγμα, όπου και απορροφάτε από τα μόρια του δείγματος. Η ενέργεια της δέσμης μετατρέπεται εν μέρει ή ολοκληρωτικά σε θερμότητα, με αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της θερμοκρασίας και την επακόλουθη θερμοελαστική διαστολή του υλικού. Δημιουργείται λοιπόν, ένα κύμα πίεσης το οποίο διαδίδεται μέσα στο δείγμα και φέρει τυπικές συχνότητες 1-150 MHz. Όντας υπερηχητικό, ανιχνεύεται εν τέλει από έναν υπερηχητικό μετατροπέα και καταγράφεται με τη μορφή σήματος.<sup>[11]</sup>

Τα υπερηχητικά κύματα που προκύπτουν μετά από την θέρμανση του δείγματος περιγράφονται μαθηματικά από την παρακάτω εξίσωση κύματος,

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{u_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right)p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H(\vec{r}, t)}{\partial t},$$

όπου  $p(\vec{r}, t)$  η χωροχρονική συνάρτηση πίεσης,  $u_s$  η ταχύτητα του ήχου,  $\beta$  ο συντελεστής θερμικής διαστολής όγκου,  $C_p$  η ειδική θερμοχωρητικότητα σε σταθερή πίεση και  $H(\vec{r}, t)$  η χωροχρονική συνάρτηση θέρμανσης, η οποία ορίζεται ως η θερμική ενέργεια ανά μονάδα χρόνου και ανά μονάδα όγκου<sup>[12]</sup>. Από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει και η απαίτηση η πηγή του laser να είναι παλμική ή χρονικά μεταβαλλόμενη για την δημιουργία των υπερηχητικών κυμάτων, καθώς στην περίπτωση ενός CW laser η θέρμανση του δείγματος θα γινόταν με σταθερό ρυθμό, δηλαδή  $\frac{\partial H(\vec{r}, t)}{\partial t} = 0$ . Στην περίπτωση ενός CW laser λοιπόν, παύει να υπάρχει η πηγή των κυμάτων και κατά συνέπεια το φωτοακουστικό φαινόμενο.

Η σχέση συσχέτισης μεταξύ της μεταβολής της θερμοκρασίας και της μεταβολής πίεσης δίδεται από την εξίσωση  $\frac{\Delta V}{V} = -\kappa \Delta p + \beta \Delta T$  για πολύ μικρές μεταβολές του όγκου ( $\Delta V \rightarrow 0$ ) και είναι η ακόλουθη,



$$\Delta p = \frac{\beta}{\kappa} \Delta T$$

όπου  $\beta$  ο συντελεστής θερμικής διαστολής όγκου και  $\kappa$  η ισόθερμη συμπιεστότητα. Για δείγμα μαλακού ιστού προκύπτει ότι  $\frac{\beta}{\kappa} = 8 \text{ mbar/mK}$ , δηλαδή αύξηση θερμοκρασίας κατά 1 mK συνεπάγεται την αύξηση πίεσης κατά 8 mbar<sup>[13]</sup>.

Επιπλέον, συνδυάζοντας τον νόμο Beer-Lambert ( $I=I_0e^{-\mu x}$ ) και το νόμο της θερμιδομετρίας ( $Q=cm\Delta T$ ) και κάνοντας τις κατάλληλες αντικαταστάσεις, μπορεί κάποιος να πάρει την σχέση μεταξύ των θερμοκρασίας  $\Delta T$  και της ροής ενέργειας του laser. Η σχέση είναι η ακόλουθη,

$$\Delta T = \frac{\eta F \mu}{\rho c}$$

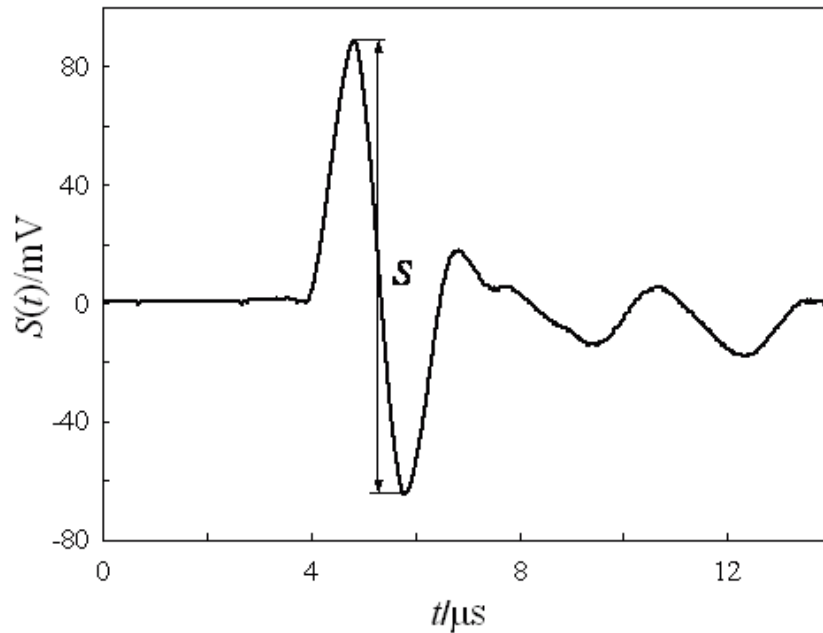
Όπου  $\eta$  είναι ο συντελεστής μετατροπής οπτικής ενέργειας σε θερμική,  $F$  η ροή οπτικής ενέργειας,  $\mu$  ο συντελεστής απορρόφησης,  $\rho$  η πυκνότητα του υλικού και  $c$  η θερμοχωρητικότητα του υλικού. Σε τυπικά πειράματα φωτοακουστικής απεικόνισης η αύξηση της θερμοκρασίας είναι της τάξεως των μερικών δεκάδων mK και αντίστοιχα οι μεταβολές πίεσης της τάξεως των μερικών εκατοντάδων mbar.

## 2.2 Παραγόμενη κυματομορφή

Μετά την ανίχνευση των φωτοακουστικών κυμάτων από τον υπερηχητικό μετατροπέα, αυτό που θα παρατηρήσει κάποιος στον άξονα του χρόνου με τη χρήση ενός παλμογράφου είναι η κυματομορφή της εικόνας 2. Στην κυματομορφή αυτή υπάρχει μία θετική και μία αρνητική κορυφή, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυκνώματα και αραιώματα των φωτοακουστικών κυμάτων και κάποιες αμελητέες κορυφές που αντιστοιχούν σε ανακλάσεις. Το πλάτος από κορυφή σε κορυφή αποτελεί δείκτη του βαθμού απορρόφησης της ακτινοβολίας από την εκάστοτε, προς μελέτη περιοχή και κατά συνέπεια είναι ανάλογο του συντελεστή απορρόφησης  $\mu$ , της ροής ενέργειας του laser  $F$  και εξαρτάται από τις θερμοδυναμικές σταθερές του μέσου ( $\beta$ ,  $\kappa$ ).

Η παραγόμενη φωτοακουστική κυματομορφή φέρει λοιπόν, ουσιώδη πληροφορία για την απεικόνιση και η ίδια καθορίζεται τόσο από τα χωροχρονικά χαρακτηριστικά της διέγερσης όσο και από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του απορροφητή. Έτσι, διαφορετικές γεωμετρίες απορροφητών (κύλινδρος, δίσκος, ράβδος κλπ.) οδηγούν σε διαφορετικές

κυματομορφές ενώ διαφορετικά μεγέθη απορροφητών οδηγούν σε διαφορετικές ακουστικές συχνότητες. Μάλιστα, μικρότερα μεγέθη οδηγούν σε υψηλότερες ακουστικές συχνότητες. Τέλος, μεγάλο ρόλο έχει η χρονοδιάρκεια του παλμού. Όσο μικρότερος είναι ο παλμός, τόσο πιο εντοπισμένο είναι το σήμα στον χρόνο με αποτέλεσμα καλύτερη χωρική ανάλυση.



Εικόνα 2. Τυπικό φωτοακουστικό σήμα πλάτους S.[13]

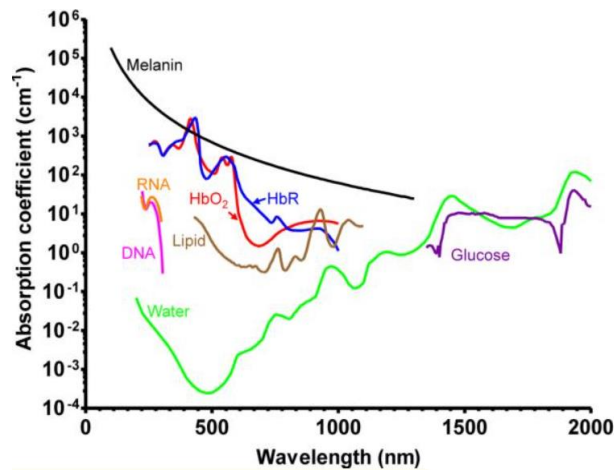
### 2.3 Πλεονεκτήματα ΦΜ

Αρχικά, στη φωτοακουστική μικροσκοπία η πληροφορία προέρχεται από την ανίχνευση υπερήχων και ο ήχος σε αντίθεση με το φως, έχει πολύ μικρότερη πιθανότητα σκέδασης από τα μόρια του δείγματος συγκριτικά με το φως. Με την μέθοδο αυτή λοιπόν, επιτυγχάνεται μεγάλο βάθος διείσδυσης στο δείγμα. Επιπροσθέτως, είναι δυνατή η in-vivo μελέτη και απεικόνιση των δειγμάτων ενώ λόγω των πολύ χαμηλών θερμοκρασιών που απαιτούνται, η τεχνική είναι και μη καταστρεπτική. Υπάρχει επίσης, η δυνατότητα 3-D απεικόνισης και ο λόγος είναι ο εξής: στα διάφορα βάθη που διεισδύει το φως έχουμε την δημιουργία φωτοακουστικών κυμάτων, τα οποία διαδίδονται με την ταχύτητα του ήχου και ανιχνεύονται από έναν υπερηχητικό μετατροπέα με κάποια διαφορά χρόνου λόγω χωρικής απόστασης. Μετρώντας αυτήν την διαφορά χρόνου και γνωρίζοντας την ταχύτητα του ήχου

στο εκάστοτε μέσο, υπολογίζεται η απόσταση μεταξύ των σημείων και η απεικόνιση αποκτά τρισδιάστατο χαρακτήρα.<sup>[14]</sup>

#### 2.4 Ενδογενείς Παράγοντες Αντίθεσης

Στην φωτοακουστική μικροσκοπία, η απαραίτητη αντίθεση για την διάκριση λεπτομερειών στην τελική εικόνα προκύπτει από την διακύμανση του συντελεστή απορρόφησης των διάφορων συστατικών του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, σε βιολογικά δείγματα υπάρχουν οι λεγόμενοι, ενδογενείς παράγοντες αντίθεσης, οι οποίοι απορροφούν πολύ έντονα συγκεκριμένα μήκη κύματος ο καθένας και δεν προκαλούν κάποια διαταραχή στον ιστό, αφού είναι μη τοξικοί.



Εικόνα 3 Φάσματα απορρόφησης των κύριων ενδογενών παραγόντων αντίθεσης σε βιολογικό ιστό. Οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη, κόκκινη γραμμή (150 g/L στο αίμα), μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη, μπλε γραμμή (150 g/L στο αίμα), λιπίδια, καφέ γραμμή (20% κατ' όγκο στον ιστό), νερό, πράσινη γραμμή (80% κατ' όγκο στον ιστό), DNA, magenta γραμμή (1 g/L σε πυρήνες κυττάρων), RNA, πορτοκαλί γραμμή (1 g/L σε κυτταρικούς πυρήνες), μελανίνη, μαύρη γραμμή (14.3 g/L σε ανθρώπινο δέρμα), γλυκόζη, μωβ γραμμή (720 mg/L στο αίμα).

Χρησιμοποιώντας λοιπόν το αντίστοιχο μήκος κύματος απορρόφησης, δύναται η απεικόνισή τους μέσω φωτοακουστικής μικροσκοπίας. Για παράδειγμα, στην περιοχή του υπεριώδους (UV) (180 nm έως 400 nm) και ορατού (400 nm έως 700 nm) (UV-VIS), οι κύριοι απορροφητές για την φωτοακουστική απεικόνιση είναι το DNA / RNA, η μυοσφαιρίνη, η αιμοσφαιρίνη και η μελανίνη. Επίσης, η μελανίνη έχει μεγάλη απορρόφηση στο φάσμα UV-VIS ενώ στην εγγύς υπέρυθρη περιοχή (700 nm έως 1400 nm), τα λιπίδια, το νερό και η γλυκόζη είναι τα κύρια συστατικά που απορροφούν.

#### 2.5 Κατηγορίες ΦΜ

Η φωτοακουστική μικροσκοπία χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: την φωτοακουστική μικροσκοπία οπτικής ή ακουστικής ανάλυσης. Ανάλογα με το ποιο είναι οι στόχοι και οι

ανάγκες του εκάστοτε πειράματος χρησιμοποιείται η κατηγορία με τα καταλληλότερα χαρακτηριστικά.

Πιο συγκεκριμένα, στην φωτοακουστική μικροσκοπία οπτικής ανάλυσης (OR-PAM) επιτυγχάνεται πολύ καλή εστίαση της δέσμης, πολύ στενότερης από την εστίαση του προκύπτοντος κύματος. Ως αποτέλεσμα του περιορισμού της περιοχής διέγερσης, εξασφαλίζεται υψηλή ανάλυση (~1 μm) αλλά παράλληλα το βάθος απεικόνισης είναι μικρό (~1mm) καθώς η δέσμη γρήγορα χάνει την εστίαση της εξαιτίας της έντονης σκέδασης του φωτός από το δείγμα. Η πλευρική ανάλυση της OR-PAM δίδεται από την παρακάτω σχέση,

$$R_{L,OR} = 0.51 \frac{\lambda_o}{NA_o},$$

όπου  $\lambda_o$  είναι το οπτικό μήκος κύματος, και  $NA_o$  είναι το αριθμητικό άνοιγμα του οπτικού φακού εστίασης. Η σταθερά 0.51 προκύπτει από το FWHM της έντασης του φωτός στην περιοχή της οπτικής εστίασης.<sup>[15]</sup> Για την βελτιστοποίηση της πλευρικής ανάλυσης λοιπόν, απαιτείται η όσο το δυνατόν αύξηση του αριθμητικού ανοίγματος  $NA_o$  και μείωση του μήκους κύματος  $\lambda_o$ . Ανάλογα με την εφαρμογή που προορίζεται, υπάρχει η OR-PAM πρώτης γενιάς (διέλευσης), η OR-PAM δεύτερης γενιάς (ανάκλασης) ενώ υπάρχει και η OR-PAM διπλού φωτισμού. Μάλιστα, όταν το εξεταζόμενο δείγμα είναι παχύ, αποκλείεται η χρήση OR-PAM διέλευσης λόγω του προαναφερθέντος μικρού βάθους απεικόνισης και προτιμάται η OR-PAM ανάκλασης.

Σε αντίθεση με την OR-PAM, στην φωτοακουστική μικροσκοπία ακουστικής ανάλυσης (AR-PAM), η εστίαση του ανιχνευόμενου κύματος είναι πολύ στενότερη της εστίασης της αρχικής δέσμης. Η ανάλυση που επιτυγχάνεται στην συγκεκριμένη κατηγορία, είναι κατά συνέπεια πολύ χαμηλότερη της OR-PAM (~25 μm) αλλά το βάθος απεικόνισης φτάνει μέχρι και τα 4 mm. Η πλευρική ανάλυση της AR-PAM δίδεται από τη σχέση,

$$R_{L,AR} = 0.71 \frac{\lambda_A}{NA_A} = 0.71 \frac{v_a}{NA_A f_A},$$

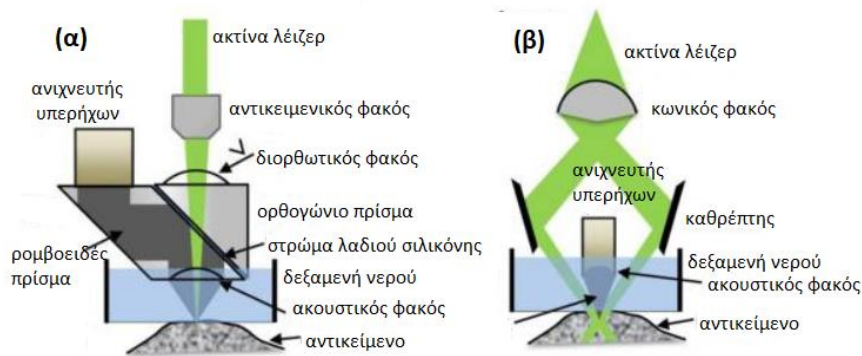
όπου το  $NA_A$  είναι το αριθμητικό άνοιγμα του υπερηχητικού μετατροπέα,  $v_a$  είναι η ταχύτητα του ήχου στο μέσο και  $\lambda_A$  και  $f_A$  είναι το κεντρικό μήκος κύματος και η αντίστοιχη συχνότητα του φωτοακουστικού σήματος, αντίστοιχα<sup>[15]</sup>. Η σταθερά 0.71 αντικατοπτρίζει το FWHM του ακουστικού εστιακού σημείου σε όρους ακουστικού πλάτους. Η τιμή της  $R_{L,AR}$  μπορεί, λοιπόν να προσαρμοστεί μεταβάλλοντας τις τιμές του  $NA_A$  και της  $f_A$ . Στη AR-PAM, τα εξεταζόμενα δείγματα φέρουν μεγαλύτερα πάχη λόγω της δυνατότητας λήψης εικόνας από μεγάλα βάθη και κυρίως χρησιμοποιείται η AR-PAM ανάκλασης.

Όσον αφορά την αξονική ανάλυση, η εξίσωση που δίνει την τιμή της στην OR-PAM και στην AR-PAM είναι ίδια,

$$R_{A,OR/AR} = 0.88 \frac{v_A}{\Delta f_A}$$

και βασίζεται στην υπόθεση ότι η φωτοακουστική απόκριση σε ένα σημείο ακολουθεί ένα γκαουσιανό προφίλ κατανομής συχνότητας. Το  $\Delta f_A$  είναι το εύρος ζώνης φωτοακουστικού σήματος το οποίο μπορεί να προσεγγιστεί ως το εύρος ζώνης ανίχνευσης του υπερηχητικού μετατροπέα και συχνά είναι ανάλογο με την κεντρική του συχνότητα  $f_A$ .

Εν τέλει, η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των AR-PAM και OR-PAM είναι ότι στην πρώτη περιορίζουμε την περιοχή ανίχνευσης ενώ στην δεύτερη την περιοχή διέγερσης. Στην OR-PAM, η πλευρική ανάλυση καθορίζεται από την εστία του φωτός ενώ στην AR-PAM από την εστία του ανιχνευτή υπερήχων. Και στις δύο όμως, η αξονική ανάλυση εξαρτάται από το εύρος συχνότητας του ανιχνευτή.

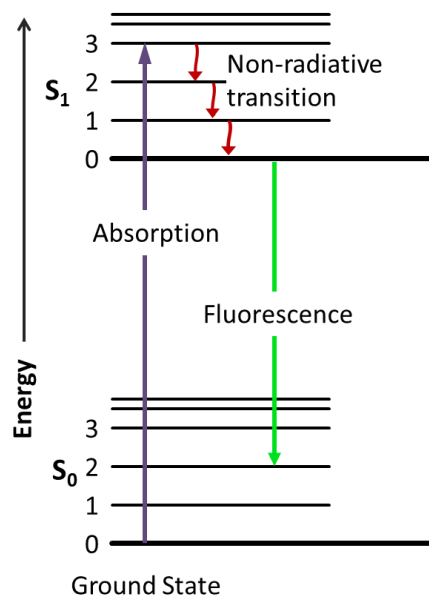


Εικόνα 4.(α) Φωτοακουστική μικροσκοπία οπτικής ανάλυσης δεύτερης γενιάς (G2-OR-PAM), όπου η πλευρική ανάλυση καθορίζεται από το οπτικό όριο περίθλασης. (β) Φωτοακουστική μικροσκοπία ακουστικής ανάλυσης (AR-PAM), όπου η πλευρική ανάλυση καθορίζεται από το ακουστικό όριο περίθλασης.[14]

## Κεφάλαιο 3: Μικροσκοπία φθορισμού

### 3.1 Φθορισμός

Ο φθορισμός είναι ένα οπτικό φαινόμενο κατά το οποίο εκπέμπεται φως από ένα μόριο το οποίο έχει απορροφήσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Συνήθως, τα εκπεμπόμενα φωτόνια φέρουν μικρότερη ενέργεια, άρα μεγαλύτερο μήκος κύματος, από την αρχική ακτινοβολία (Μετατόπιση Stokes) καθώς στο χρονικό μεσοδιάστημα της διέγερσης-αποδιέγερσης του ηλεκτρονίου συμβαίνουν κάποιες μη ακτινοβολητικές μεταβάσεις μεταξύ των δονητικών επιπέδων της διεγερμένης ηλεκτρονιακής στάθμης και έτσι χάνεται ενέργεια, η οποία παίρνει την μορφή θερμότητας.



Εικόνα 5. Διάγραμμα Jablonski που περιλαμβάνει την διαδικασία της απορρόφησης, της μη ακτινοβολητικής μετάβασης και την διαδικασία του φθορισμού.[16]

Μετά την διέγερση των μορίων, η επανεκπομπή γίνεται περίπου μετά από  $10^{-8}$  s και εξαιτίας του τόσο μικρού χρόνου, η διαδικασία του φθορισμού, σε αντίθεση με τον φωσφορισμό, σταματάει κατευθείαν μετά την αφαίρεση της πηγής διέγερσης.<sup>[17],[18]</sup>

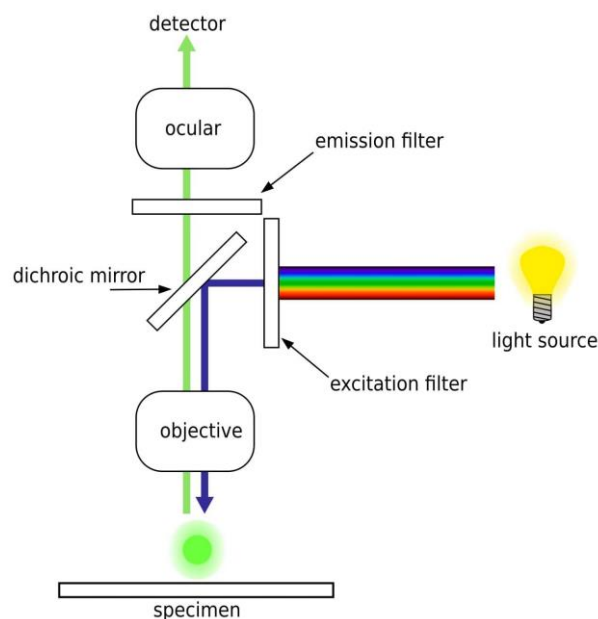
### 3.2 Αυτοφθορισμός

Αυτοφθορισμός είναι η φυσική εκπομπή φωτός στο UV-VIS μετά την ακτινοβόληση βιολογικών δομών. Οι ουσίες στις οποίες οφείλεται το φαινόμενο του αυτοφθορισμού ονομάζονται φθοροφόρα και κάποιες από αυτές είναι το κολλαγόνο, η λιποφουσκίνη, η χλωροφύλλη, το NADH. Ο αυτοφθορισμός είναι λοιπόν, ο φθορισμός φυσικών ουσιών και σε μερικές περιπτώσεις, ο αυτοφθορισμός μπορεί να φωτίσει τις δομές ενδιαφέροντος ή να χρησιμεύσει ως χρήσιμος διαγνωστικός δείκτης. Παράλληλα όμως, μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα στην απεικόνιση διότι δύναται να υπερσκιάσει ή να συγχυθεί με τον φθορισμό τεχνητών φθοροφόρων που έχουν προστεθεί για την σήμανση συγκεκριμένων δομών.<sup>[19]</sup> Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν έγινε χρήση ιχνηθετών καθώς στα λέπια των ψαριών υπάρχει κολλαγόνο<sup>[20]</sup>, το οποίο όπως προαναφέρθηκε, ανήκει στα φθοροφόρα και επαρκεί για τη σκιαγράφηση της δομής του λεπιού μέσω απεικόνισης αυτοφθορισμού.

### 3.3 Μικροσκόπιο Φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μια τεχνική απεικόνισης που χρησιμοποιείται ευρέως για την υψηλή απεικονιστική αντίθεση και επιλεκτικότητα που προσφέρει. Η προαναφερθείσα αντίθεση και επιλεκτικότητα επιτυγχάνεται και ενισχύεται με τη προσθήκη φθοροφόρων στο εκάστοτε δείγμα για την σήμανση των δομών ενδιαφέροντος. Στον βιολογικό τομέα, η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για την μελέτη των δομών και των λειτουργιών του κυττάρου καθώς και για τον εντοπισμό μακρομοριών (π.χ. πρωτεΐνες).

Ο τρόπος λειτουργίας ενός τυπικού μικροσκοπίου φθορισμού ευρέος πεδίου είναι ο εξής: αρχικά, μία πηγή φωτός, συνήθως λαμπτήρας υδραργύρου ή ξένου<sup>[21]</sup>, εκπέμπει πολυχρωματική ακτινοβολία, η οποία στην συνέχεια διέρχεται μέσα από ένα φίλτρο διέγερσης. Το φίλτρο αυτό, επιτρέπει την διέλευση των μηκών κυμάτων, που θα χρησιμεύσουν για την διέγερση του δείγματος και αποκόπτει τα υπόλοιπα. Στη συνέχεια, η ακτινοβολία ανακλάται από ένα διχροϊκό καθρέφτη, ο οποίος είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε να ανακλά το φως κάτω από ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και ταυτόχρονα να επιτρέπει την διέλευση φωτός πάνω από αυτό το συγκεκριμένο μήκος κύματος. Διαχωρίζει με αυτόν τον τρόπο το φως διέγερσης από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία φθορισμού. Μετά την ανάκλαση της ακτινοβολίας από τον διχροϊκό καθρέφτη, η ίδια προσπίπτει πάνω στο δείγμα αφού πρώτα εστιαστεί από έναν αντικειμενικό φακό, διεγείρονται οι φθοροφόρες ουσίες και εκπέμπεται ακτινοβολία φθορισμού, η οποία διέρχεται από τον διχροϊκό και ανιχνεύεται.<sup>[22]</sup>



Εικόνα 6. Δομή ενός τυπικού μικροσκοπίου ευρέος πεδίου με τις πορείες των δέσμεων διέγερσης (μπλε γραμμή) και εκπομπής (πράσινη γραμμή).[23]

Στην μικροσκοπία φθορισμού ευρέος πεδίου, η πλευρική ανάλυση της τελικής εικόνας δίνεται από τη σχέση,

$$R_{xy} \approx 0.61\lambda/NA,$$

όπου  $\lambda$  είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης και  $NA$  είναι το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού. Σε βέλτιστες συνθήκες, δηλαδή υψηλή τιμή  $NA$  και μικρό μήκος κύματος, δύναται να επιτευχθεί θεωρητικά ανάλυση  $\sim 200$  nm<sup>[24]</sup>. Από την παραπάνω σχέση καθίσταται σαφές ότι οι αντικειμενικοί φακοί είναι τα πιο σημαντικά εξαρτήματα του συστήματος σχηματισμού εικόνας του μικροσκοπίου γιατί από αυτούς εξαρτάται η τελική πλευρική ανάλυση.

### **3.4 Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού Σάρωσης Laser**

Πολλές φορές παρατηρείται ότι οι εικόνες απεικόνισης δειγμάτων με την μικροσκοπία φθορισμού ευρέος πεδίου είναι θολές. Η χαμηλή ποιότητα των εικόνων αυτών προέρχεται από φθορισμό εκτός του εστιακού επιπέδου. Πιο συγκεκριμένα, μετά την πρόσπτωση της ακτινοβολίας στο δείγμα, τα φωτόνια φθορισμού που ανιχνεύονται προέρχονται τόσο από περιοχές του δείγματος που βρίσκονται εντός εστιακού επιπέδου αλλά και από περιοχές εκτός του εστιακού επιπέδου.

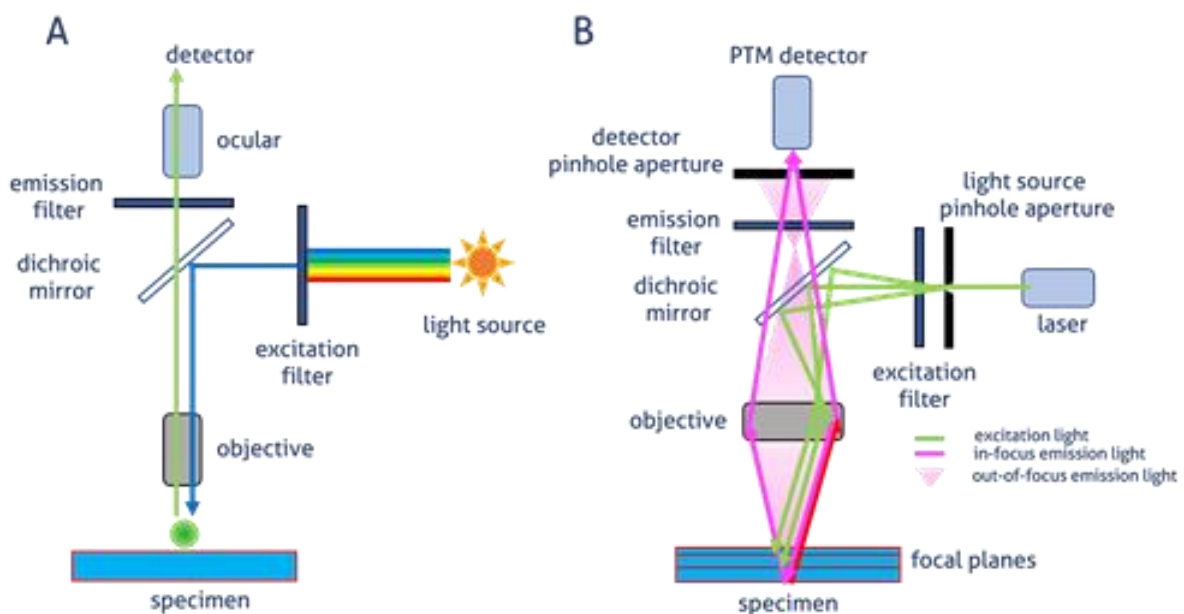
Κατά την προσπάθεια αφαίρεσης του φθορισμού εκτός εστιακού επιπέδου αναπτύχθηκε το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Η δομή και η λειτουργία του έχουν πολλά κοινά στοιχεία με το μικροσκόπιο φθορισμού ευρέος πεδίου, πράγμα αναμενόμενο καθώς η δημιουργία του πρώτου στηρίχθηκε στο δεύτερο, με κάποιες τροποποιήσεις και προσθήκες όμως για την διόρθωση του προβλήματος της θολότητας.

Για την απεικόνιση μέσω ενός συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού χρησιμοποιούνται συνήθως laser ως πηγή διέγερσης, για αυτό και η τεχνική ονομάζεται συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού σάρωσης laser. Τα laser αυτά είναι συνήθως αργού ή αργού-κρυπτού και παρέχουν σχεδόν μονοχρωματική ακτινοβολία με χαμηλή απόκλιση και υψηλή μέση φωτεινότητα.<sup>[21]</sup> Η ακτινοβολία αυτή προσπίπτει στο διχροϊκό κάτοπτρο και εστιάζεται στο δείγμα με την βοήθεια ενός αντικειμενικού φακού. Ο προκύπτων φθορισμός διέρχεται μέσα από τον διχροϊκό καθρέφτη, εστιάζεται μέσω ενός δεύτερου αντικειμενικού φακού και περνάει μέσα από μια οπή, η οποία είναι τοποθετημένη σε απόσταση ίση με την εστιακή απόσταση του αντικειμενικού. Ο ρόλος της οπής είναι να φιλτράρει τον φθορισμό με τέτοιο τρόπο, ώστε να περνάει μόνο αυτός που προέρχεται από το εστιακό επίπεδο του δείγματος και να αποκόπτεται αποτελεσματικά το εναπομένον κομμάτι που ευθύνεται για την θολότητα των τελικών εικόνων. Στη συνέχεια, ο φθορισμός του εστιακού επιπέδου ανιχνεύεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή και παίρνει την μορφή σήματος, το οποίο είναι ανάλογο με την ένταση του



φωτός από το δείγμα. Για να σχηματιστεί εικόνα με το συνεστιακό μικροσκόπιο πρέπει να σαρωθεί το δείγμα σημείο προς σημείο συνήθως μέσω γαλβανομετρικών καθρεπτών.

Με τις παραπάνω προσθήκες και τροποποιήσεις στην διάταξη του απλού μικροσκοπίου φθορισμού, η συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού σάρωσης laser έχει γίνει μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού, παρέχοντας τρισδιάστατες εικόνες σε μελέτες βιολογικών δειγμάτων. Η δυνατότητα γρήγορης απεικόνισης δυναμικών διεργασιών καθώς και η υψηλή ανάλυση των τελικών εικόνων την καθιστούν εύχρηστο εργαλείο για μεγάλο φάσμα μελετών.<sup>[25]</sup>



Εικόνα 7. Σύγκριση της δομής ενός τυπικού μικροσκοπίου ευρέος πεδίου (A) και ενός συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωση laser (B). Πέρα από τα βασικά στοιχεία του κάθε μικροσκοπίου, περιλαμβάνονται επιπλέον οι πορείες των δέσεων διέγερσης και εκπομπής.<sup>[26]</sup>

#### **Κεφάλαιο 4: Υβριδική μικροσκοπία**

Τα τελευταία χρόνια, η φωτοακουστική μικροσκοπία εμφανίζεται ολοένα και περισσότερο ως κομμάτι υβριδικών συστημάτων απεικόνισης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ένα υβριδικό σύστημα απεικόνισης μπορεί να παρέχει περαιτέρω πληροφορία για μια δομή ενδιαφέροντος συγκριτικά με την πληροφορία που θα έδινε κάθε τεχνική απεικόνισης ξεχωριστά.

Η φωτοακουστική μικροσκοπία λοιπόν, συνδυάζεται με διάφορες άλλες τεχνικές. Αρχικά, συχνά χρησιμοποιούνται υβριδικά συστήματα μικροσκοπίας φθορισμού και φωτοακουστικής απεικόνισης. Σε δύο έρευνες, η μία με κέντρο μελέτης τις χρωστικές σε φυτικούς ιστούς<sup>[12]</sup> και η δεύτερη την σκιαγράφιση του ακτινωτού μυ<sup>[27]</sup>, παρατηρήθηκε ότι το παραπάνω υβριδικό σύστημα παρείχε πολύ πιο λεπτομερή αποτελέσματα και μάλιστα τα δύο σήματα των τεχνικών παρουσίαζαν έντονη αλληλοσυμπληρωματικότητα μεταξύ τους, ενώ σε άλλη έρευνα η χρήση του ίδιου συστήματος σε δείγματα οφθαλμικών όγκων οδήγησε στην εύρεση ενός τρόπου ταυτοποίησης μελανωμάτων μέσω της συσχέτισης των δύο σημάτων<sup>[28]</sup>. Μια άλλη μορφή υβριδικού συστήματος απεικόνισης είναι ο συνδυασμός της φωτοακουστικής μικροσκοπίας με τον υπέρηχο. Στον κλάδο της βιομικροσκοπίας, θεωρείται ότι αυτή η υβριδική τεχνική θα μπορούσε να καταστεί χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη των μικροαγγείων καθώς σε έρευνα όπου χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω σύστημα για την απεικόνιση ενός ανθρώπινου δαχτύλου, επιτεύχθηκε για άλλη μια φορά αλληλοσυμπληρωματικότητα των δύο σημάτων, με την φωτοακουστική μικροσκοπία να τονίζει δομές (μικρά αγγεία) που ο υπέρηχος δεν δύναται να απεικονίσει<sup>[29]</sup>. Σε μια άλλη μελέτη μάλιστα όπου χρησιμοποίησαν το παραπάνω σύστημα απεικόνισης σε zebrafish, παρατήρησαν και πάλι την αλληλοσυμπληρωματικότητα των δύο σημάτων στην τελική, υβριδική εικόνα<sup>[30]</sup>. Επιπλέον, η φωτοακουστικά-καθοδηγούμενη φασματοσκοπία Raman είναι μια άλλη υβριδική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γρήγορες μετρήσεις Raman με ακριβή εντοπισμό του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, η άνευ ιχθυετών απεικόνιση μορίων σε βαθείς ιστούς με μεγάλη χωρική ανάλυση θεωρείται μια μεγάλη πρόκληση στην οπτική απεικόνιση διότι πρέπει με κάποιο τρόπο να υπερνικηθεί η μεγάλη οπτική σκέδαση στους ιστούς και παράλληλα, να επιτευχθεί ακριβής εντοπισμός των μορίων δίχως την χρήση εξωτερικών ιχθυετών. Συνδυάζοντας λοιπόν την εξαναγκασμένη διέγερση Raman με την φωτοακουστική ανίχνευση, μπορούμε να επιτύχουμε τον παραπάνω στόχο.<sup>[31]</sup>

Επομένως, ο συνδυασμός δύο διαφορετικών τεχνικών απεικόνισης μπορεί να βελτιώσει και να εξελίξει τις δυνατότητες στην απεικόνιση, προσφέροντας τελικές, υβριδικές εικόνες με μεγάλη λεπτομέρεια δομών και απαλλαγμένες από προβλήματα που φέρουν οι τεχνικές ξεχωριστά.

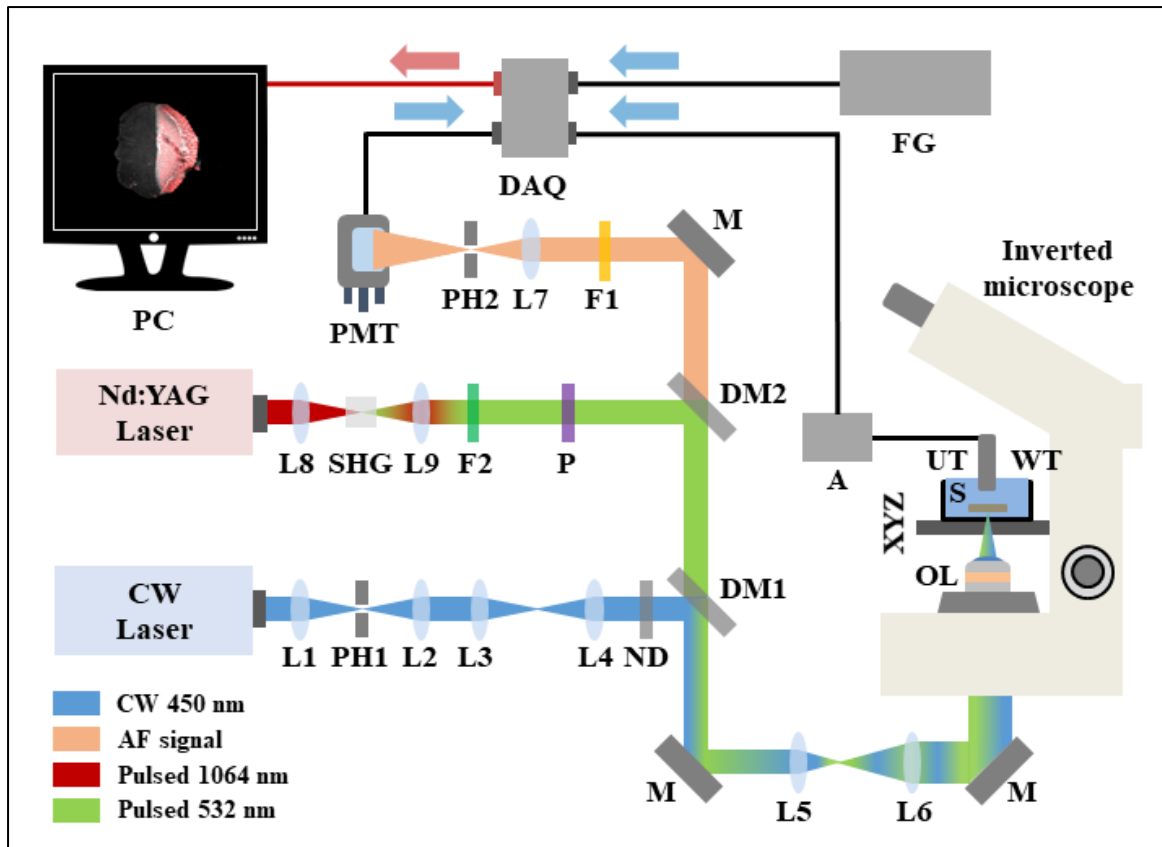
## ***Κεφάλαιο 5: Υλικά και Μέθοδοι***

### ***5.1 Πειραματική Διάταξη***

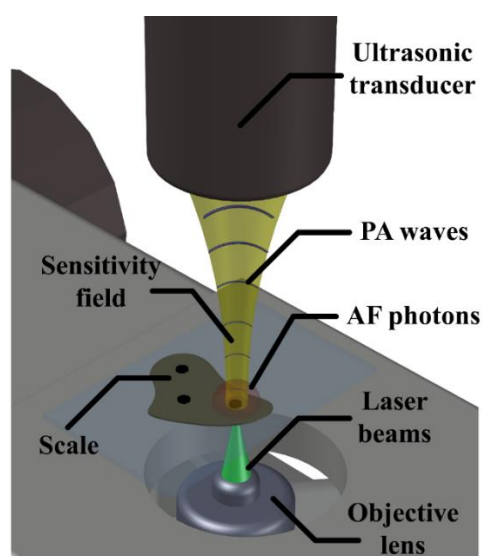
Όπως έχει αναφερθεί, στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε υβριδική μικροσκοπία, ο συνδυασμός δηλαδή δύο διαφορετικών μεθόδων απεικόνισης και κατά συνέπεια απαιτούνται δύο διαφορετικά laser, ένα για την φωτοακουστική μικροσκοπία και ένα για την απεικόνιση μέσω αυτοφθορισμού.

Για την απεικόνιση μέσω αυτοφθορισμού, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης ένα διοδικό λέιζερ συνεχούς κύματος (CP450, Thorlabs, Newton, NJ, USA; ισχύς εξόδου 4.5 mW), το οποίο εκπέμπει στα 450 nm. Λόγω του ελλειπτικού σχήματος της δέσμης, έγινε χρήση ενός συστήματος δύο φακών (L1 και L2) και μίας οπής για να φιλτραριστεί και να βελτιωθεί η ποιότητά της. Έπειτα, η δέσμη ευθυγραμμίστηκε από τον φακό L4 και διήλθε μέσα από ένα ουδέτερης πυκνότητας φίλτρο, το οποίο ελαττώνει την αρχική ένταση της ακτινοβολίας για να αποφευχθεί η φωτοκαταστροφή του λειπιού. Στη συνέχεια, η δέσμη ανακλάστηκε από έναν Iongrass διχροϊκό καθρέφτη, έπειτα από έναν καθρέφτη και οδηγήθηκε σε ένα κατάλληλα τροποποιημένο, ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο, αφού πρώτα υπέστη μεγέθυνση από ένα τηλεσκόπιο (L5 και L6). Ένας αντικειμενικός φακός εστίασε τη δέσμη στο δείγμα λειπιού, το οποίο βρίσκεται στο κάτω μέρος μιας οπτικά διαφανούς δεξαμενής νερού. Η δεξαμενή αυτή, βρίσκεται τοποθετημένη σε ένα τρισδιάστατο σύστημα κίνησης το οποίο αποτελείται από ένα μηχανοκίνητο stage XY (8MTF75LS05, Standa, Vilinious, Lithuania), και ένα χειροκίνητο stage Z. Μετά την πρόσπτωση της δέσμης, ένα μέρος της οπισθοσκεδαζόμενης ακτινοβολίας φθορισμού συλλέχθηκε από τον αντικειμενικό, διαδόθηκε μέσα από δύο διχροϊκούς καθρέφτες (DM1 και DM2) φέροντας πλέον μεγαλύτερο μήκος κύματος και ανακλάστηκε από έναν καθρέφτη. Ένα φίλτρο υψηλών μηκών κύματος (LP03-532RU-25, Semrock, Inc., Rochester, NY, USA; μήκος κύματος άκρου: 532nm) τοποθετήθηκε για να αποκόψει την απλώς ανακλώμενη ακτινοβολία και να απομονώσει τον εστιασμένο εκπεμπόμενο αυτοφθορισμό, ο οποίος στη συνέχεια διήλθε μέσα από μία οπή διαμέτρου 50μm για να απορριφθεί το εισερχόμενο φως εκτός του εστιακού επιπέδου και τελικά ανιχνεύθηκε από έναν PMT (H6780-20, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan). Τα παραγόμενα σήματα καταγράφηκαν από μια κάρτα απόκτησης δεδομένων (DAQ) (PCIe-9852, ADLINK, Taipei, Taiwan; ρυθμός δειγματοληψίας 200M/s; εύρος ζώνης: 90 MHz) και αποθηκεύτηκαν σε έναν υπολογιστή λαμβάνοντας το μέσο όρο 20 μετρήσεων για βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο (SNR).

Όσον αφορά τη φωτοακουστική απεικόνιση, χρησιμοποιήθηκε ένα Nd:YAG laser, μεταβλητού ρυθμού επανάληψης παλμών, το οποίο εκπέμπει στα 1064nm (QIR-1064-200-S, CrystalLaser LC, Reno, NV, USA; ενέργεια παλμού: 29.4  $\mu$ J, διάρκεια παλμού: 10ns, επιλεγμένος ρυθμός επανάληψης: 5kHz). Η εξερχόμενη δέσμη εστιάστηκε σε ένα κρύσταλλο δεύτερης αρμονικής τριβορικού λιθίου (Castech Inc, Fuzhou, China), ο οποίος μετέτρεψε ένα μέρος της ακτινοβολίας σε ακτινοβολία με μισό μήκος κύματος (532 nm). Στη συνέχεια, η δέσμη ευθυγραμμίστηκε από τον φακό L9 και διήλθε μέσα από ένα φίλτρο διέλευσης ζώνης (FF01-531/40-25, Semorck, Rochester, NY, USA), όπου και απορρίφθηκε η εναπομένουσα υπέρυθη ακτινοβολία ενώ με την χρήση ενός πολωτή, εξασθενήθηκε στον επιθυμητό βαθμό. Έπειτα, η δέσμη ανακλάστηκε από τον διχροϊκό καθρέφτη (DM2), διήλθε μέσα από τον δεύτερο διχροϊκό (DM1) και το τηλεσκόπιο του συστήματος και εστιάστηκε μέσω του αντικειμενικού φακού στο δείγμα λεπιού. Τα φωτοακουστικά κύματα που παράχθηκαν μετά την πρόσπτωση της δέσμης ανιχνεύθηκαν από έναν υπερηχητικό μετατροπέα με κεντρική συχνότητα στα 20 MHz, ο οποίος ήταν σφαιρικά εστιασμένος (V373-SU, Olympus, Tokyo, Japan; εύρος ζώνης: 13-33MHz, εστιακή απόσταση: 32mm). Η λειτουργία του μετατροπέα στηρίζεται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, στην ιδιότητα δηλαδή κάποιων υλικών να παράγουν ηλεκτρική τάση όταν δεχτούν κάποια πίεση (εν προκειμένω τα υπερηχητικά κύματα). Ο ανιχνευτής βυθίστηκε σε θέση ομοαξονική και συνεστιακή με την οπτική εστία ενώ η δεξαμενή μέσα στην οποία τοποθετήθηκε ο ανιχνευτής, είναι γεμάτη με απιονισμένο νερό, καθώς αυτό, σε σύγκριση με τον αέρα, συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη διάδοση και ανίχνευση των φωτοακουστικών κυμάτων. Τα παραγόμενα σήματα ενισχύθηκαν από έναν ενισχυτή RF χαμηλού θορύβου (TB-414-8A+, Mini-Circuits, Camberley, England; κέρδος: 31dB), και τελικά καταγράφηκαν από την κάρτα απόκτησης δεδομένων, η οποία είχε συγχρονιστεί με το σήμα ενεργοποίησης λέιζερ. Ο τρόπος με τον οποίο σαρώθηκε το δείγμα είναι με την χρήση μηχανοκίνητων stages XY και η επεξεργασία των δεδομένων καθώς και ο συγχρονισμός και συγχώνευση των εικόνων έγινε με την βοήθεια ενός script στην MATLAB και του ImageJ.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση του υβριδικού συστήματος απεικόνισης. Συντμήσεις: L, φακός; PH, οπή; ND, φίλτρα πυκνότητας; DM, διχροϊκός φακός; M, καθρέφτης; OL, αντικειμενικός φακός; WT, δεξαμενή νερού; XYZ, τρισδιάστατο σύστημα κίνησης; UT, υπερηχητικός μετατροπέας; A, ενισχυτής; DAQ, κάρτα καταγραφής δεδομένων; PMT, φωτοπολλαπλασιαστής; F1, φίλτρο διέλευσης υψηλών μηκών κύματος; P, Πολωτής; F2, Φίλτρο διέλευσης ζώνης; SHG, κρύσταλλος παραγωγής δεύτερης αρμονικής; PC, υπολογιστής καταγραφής.



Εικόνα 9. Τρισδιάστατη αναπαράσταση της διαδικασίας σάρωσης ενός δείγματος λεπτού από τις δύο δέσμες και της επακόλουθης απόκρισης του δείγματος στην ακτινοβολή του.

## **5.2 Προετοιμασία δειγμάτων**

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από άγριο φαγκρί, λαβράκι, τσιπούρα αλλά και δύο κατηγορίες τσιπουρών ιχθυοτροφείου, στη μία από τις οποίες είχε δοθεί τροφή με αντιμελανικές ιδιότητες. Στα δείγματα, αφού αφαιρέθηκαν από το εκάστοτε ψάρι, έγινε μονιμοποίηση σε διάλυμα 4% φορμόλης, εν συνέχεια πλύση και τέλος τοποθετήθηκαν μέσα σε φιαλίδια με διάλυμα αιθανόλης 70% και έπειτα σε ψυγείο για λόγους συντήρησης. Όταν έφτασε η ώρα της ακτινοβόλησης, αφαιρέθηκαν από τα φιαλίδια και εναποτέθηκαν στο κάτω μέρος της οπτικά διαφανούς δεξαμενής νερού και στη συνέχεια προστέθηκε ένα στρώμα τζελ υπερήχων προκειμένου να αποφευχθεί η μετατόπιση του δείγματος κατά τη σάρωση και η άμεση επαφή του λεπιού με το απιονισμένο νερό.

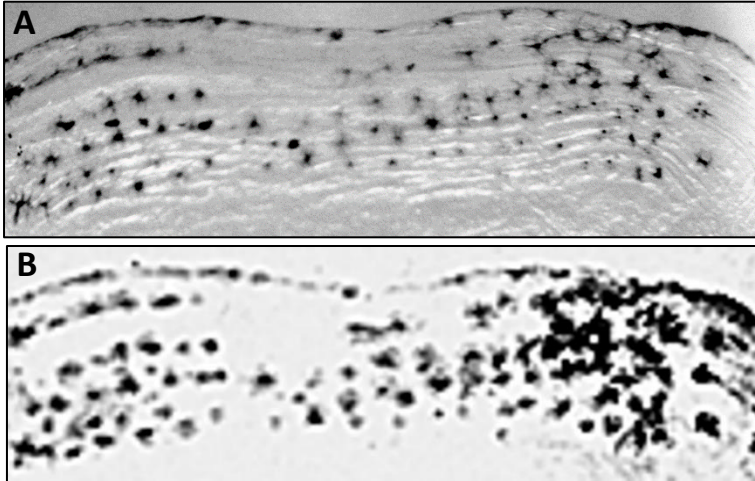
## **5.3 Πειραματική διαδικασία**

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, τοποθετήσαμε την οπτικά διαφανή δεξαμενή νερού στο μηχανοκίνητο σύστημα κίνησης και προσθέσαμε απιονισμένο νερό μέχρι να βυθιστεί η άκρη του μετατροπέα. Στην συνέχεια, εστίασαμε το δείγμα ως προς τη δέσμη φωτός και ρυθμίσαμε τη θέση του μετατροπέα ώστε να πάρουμε το μέγιστο φωτοακουστικό σήμα. Πάντα, προτού απεικονίσουμε το λέπι με ανάλυση 400x400 pixels, πραγματοποιούσαμε μια προεπισκόπηση του δείγματος για να επιβεβαιώσουμε την εστίαση.

Συνολικά απεικονίσαμε 340 δείγματα λεπιών, από τα οποία τα 100 ανήκαν σε λαβράκια θαλάσσης, 100 σε φαγκριά θαλάσσης, 100 σε τσιπούρες θαλάσσης και τα υπόλοιπα 40 σε τσιπούρες ιχθυοτροφείου. Οι τελικές εικόνες ήταν όλες 400x400 pixels με μέγεθος pixel 20 μm εκτός από την κατηγορία των λαβρακιών όπου εκεί το μέγεθος pixel ήταν 15 μm. Ο μέσος χρόνος για τη σάρωση όλου του λεπιού ήταν περίπου 17 λεπτά (20 κυματομορφές κατά μέσο όρο).

## **5.4 Ταυτοποίηση μελανοκυττάρων**

Προτού προβούμε στην οποιαδήποτε επεξεργασία και ανάλυση της μελανίνης, έπρεπε να επιβεβαιώσουμε ότι το φωτοακουστικό σήμα των εικόνων ήταν αποτέλεσμα της απορρόφησης της ακτινοβολίας από την μελανίνη. Για αυτό λοιπόν απεικονίσαμε με φωτοακουστική μικροσκοπία ένα λέπι τσιπούρας και στη συνέχεια πήραμε την εικόνα του ίδιου λεπιού με την βοήθεια ενός στερεοσκοπίου. Γνωρίζοντας ότι οι σκούρες περιοχές στην εικόνα στερεοσκοπίου αντιστοιχούν σε μελανοκύτταρα και αντιστοιχίζοντας αυτές στην εικόνα φωτοακουστικής απεικόνισης, ταυτοποιήσαμε την προέλευση του φωτοακουστικού σήματος.



Εικόνα 10. Στην πάνω εικόνα A αναπαρίσταται η εικόνα στερεοσκοπίου που αντιστοιχεί σε περιοχή λεπιού τσιπούρας, ενώ στην εικόνα B απεικονίζεται η ίδια περιοχή αλλά με την μέθοδο της φωτοακουστικής μικροσκοπίας. Οι σκούρες περιοχές και στις δύο αντιστοιχούν σε μελανοκύτταρα.

### 5.5 Επεξεργασία εικόνων

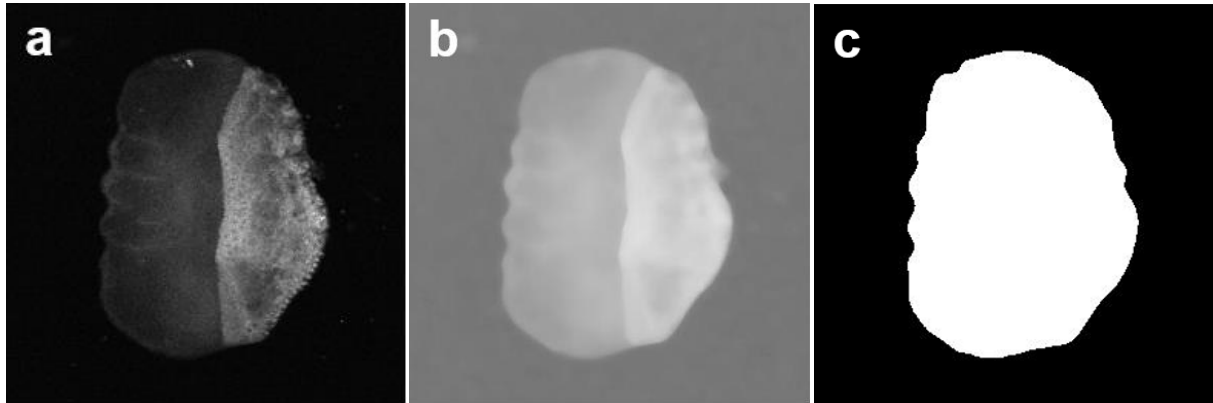
Για την επεξεργασία της περιοχής του λεπιού κατέστη αναγκαία η εύρεση ενός τρόπου με τον οποίο θα μπορούμε να διαχωρίζουμε αποτελεσματικά την περιοχή του λεπιού από το περιβάλλον υποβάθρο. Αρχικά λοιπόν, σε κάθε εικόνα έλαβε χώρα μια προ-επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο διαμέσου (median filter) για να αποκοπουν ανεπιθύμητα έντονα σήματα εκτός του λεπιού και στη συνέχεια, γάμα διόρθωση (gamma correction), η ύψωση δηλαδή των τιμών όλων των φωτεινότητων εις την 1/5. Μετά από αυτή την μικρή επεξεργασία, έγινε χρήση του αλγορίθμου ομαδοποίησης k- μέσων.

Η ομαδοποίηση k- μέσων είναι μία μέθοδος με την οποία διαχωρίζονται n δεδομένα σε k ομάδες, με το κάθε δεδομένο  $p_i$  να ανήκει στην ομάδα ή καλύτερα, στην συστάδα με τον κοντινότερο μέσο.<sup>[26]</sup> Με λίγα λόγια, τα βήματα που ακολουθεί ο αλγόριθμος για την δημιουργία των k συστάδων είναι τα εξής:

1. Διαλέγει τυχαία από τα δεδομένα k αρχικούς μέσους.
2. Δημιουργεί τις k συστάδες, ομαδοποιώντας τους k μέσους με τα κοντινότερά τους δεδομένα.
3. Βρίσκει το κεντροειδές κάθε συστάδας και το ορίζει ως το καινούριο μέσο.
4. Επανομαδοποιεί το νέο μέσο με τα κοντινότερα δεδομένα του.
5. Επαναλαμβάνει το βήμα 3 και 4 μέχρι ο ορισμός νέου μέσου και η επακόλουθη ομαδοποίηση δεν προσθέσουν νέα δεδομένα στην συστάδα.

Στο πείραμα μας, ο αριθμός των συστάδων που δημιούργησε ο αλγόριθμος είναι 2. Η μια περιλαμβάνει τις φωτεινότητες του υποβάθρου και η δεύτερη τις φωτεινότητες από την

δομή του λεπιού. Με τον αλγόριθμο αυτόν λοιπόν, μπορέσαμε να αυτοματοποιήσουμε την διαδικασία διαχωρισμού της περιοχής του λεπιού από το υπόβαθρο ώστε να προχωρήσουμε στην ανάλυση και επεξεργασία των σημάτων της δομής ενδιαφέροντος μας.



Εικόνα 11. Απεικόνιση αυτοφθορισμού λεπιού τσιπούρας. (α) Η εικόνα δίχως κάποια επεξεργασία. (β) Η εικόνα μετά από μια προ-επεξεργασία (Median Filter, gamma correction). (c) Δημιουργίας 'μάσκας' μέσω του αλγορίθμου ομαδοποίησης k- μέσων για τον διαχωρισμό της περιοχής του λεπιού από το περιβάλλον υπόβαθρο.

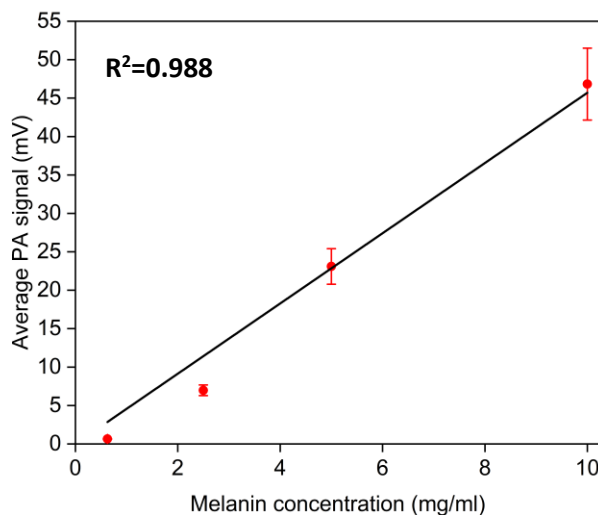
Για την εξαγωγή χρήσιμων μεγεθών που αφορούν το λέπι όπως η ποσότητα μελανίνης στην επιφάνεια του λεπιού, η επιφάνεια του λεπιού που επικαλύπτεται από μελανίνη ή το ποσοστό επικάλυψης του λεπιού από μελανίνη, χρησιμοποιήθηκε ένα script στην MATLAB. Μια βασική παράμετρος που έπρεπε να ορίσουμε πριν προχωρήσουμε στην εφαρμογή του προγράμματος πάνω στις μετρήσεις, ήταν το κατώφλι σήματος μελανίνης. Έπρεπε λοιπόν, να θέσουμε μια ελάχιστη τιμή σήματος κάτω από την οποία θα αποκοπτόταν κάθε σήμα, ώστε να απορρίψουμε όσο το δυνατόν περισσότερο θόρυβο και να κρατήσουμε το μέγιστο φωτοακουστικό σήμα. Μετά από κάποιες δοκιμές τιμών, θεωρήσαμε εύλογη τιμή τα 0.15V, τα οποία και ορίσαμε ως κατώφλι του σήματος.

### **5.6 Γράφημα συσχέτισης φωτοακουστικού σήματος με συγκέντρωση μελανίνης**

Αρχικά, μας δόθηκαν 4 πρότυπα δείγματα μελάνι σουπιάς μέσα σε τζελ αгарόζης 2% w/v, το καθένα από τα οποία έφερε διαφορετικές συγκεντρώσεις μελανίνης. Απεικονίζοντας τα δείγματα αυτά με φωτοακουστική μικροσκοπία, φτιάξαμε ένα γράφημα συσχέτισης του φωτοακουστικού σήματος με συγκεντρώσεις μελανίνης. Στο γράφημα της εικόνας 10 διαφαίνεται η γραμμική σχέση ανάμεσα στα δύο μεγέθη ενώ τα error bars των σημάτων προκύπτουν από την τυπική αβεβαιότητα στην ενέργεια παλμού του laser και είναι το  $\pm 10\%$  της τιμής. Μπορούμε λοιπόν, τιμές Volt φωτοακουστικού σήματος να τις μεταφράσουμε σε απόλυτες τιμές συγκέντρωσης και σκοπός μας με αυτό το γράφημα είναι να δείξουμε ότι στην



έρευνα αυτή όχι μόνο μπορούμε να εντοπίσουμε τα μελανοφόρα κύτταρα αλλά να λάβουμε πληροφορίες και για την ποσότητά τους.

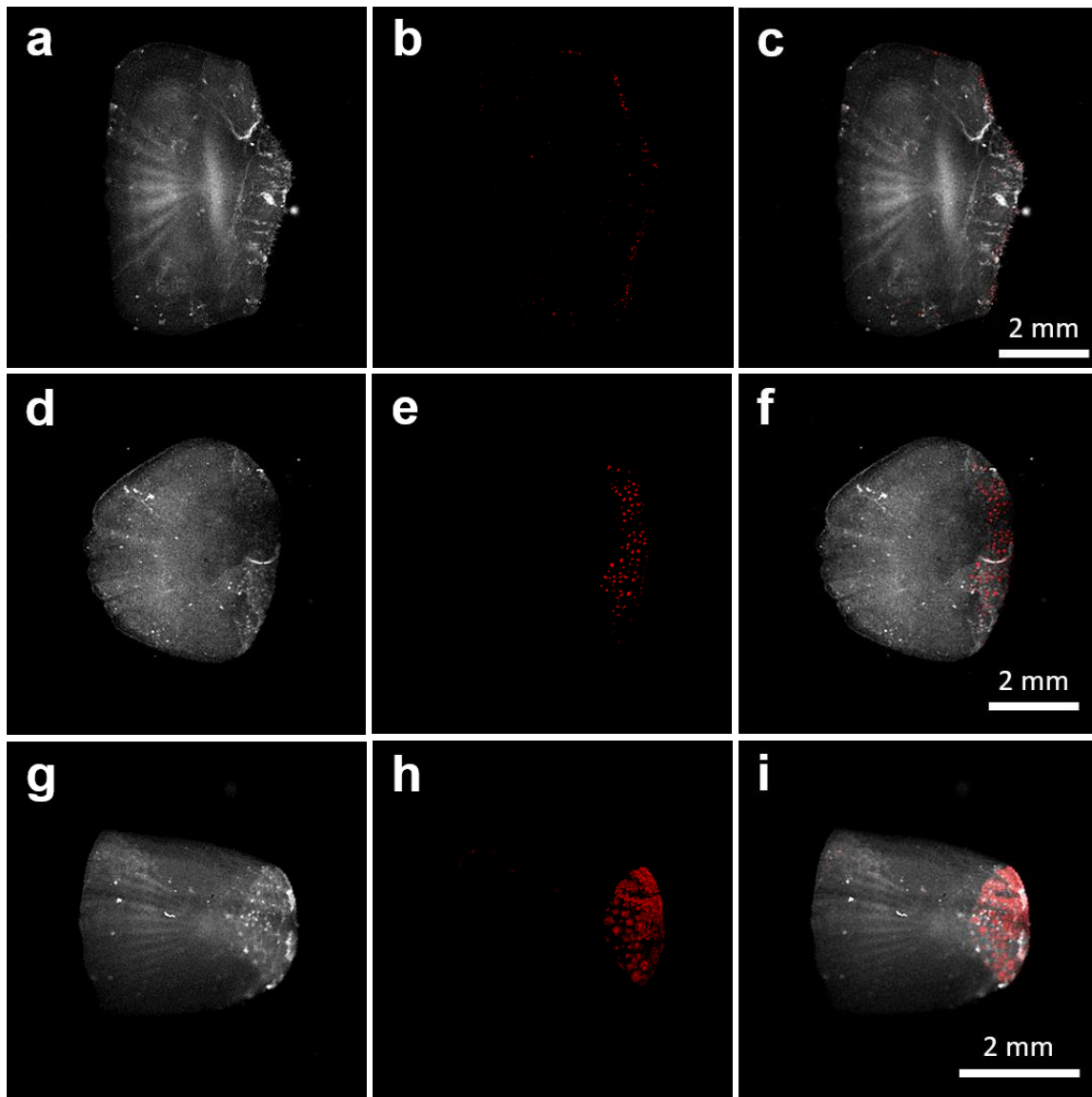


Εικόνα 12. Γράφημα συσχέτισης φωτοακουστικού σήματος με συγκέντρωση μελανίνης.

## ***Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα***

### ***6.1 Σύγκριση των τριών διαφορετικών ειδών ψαριών***

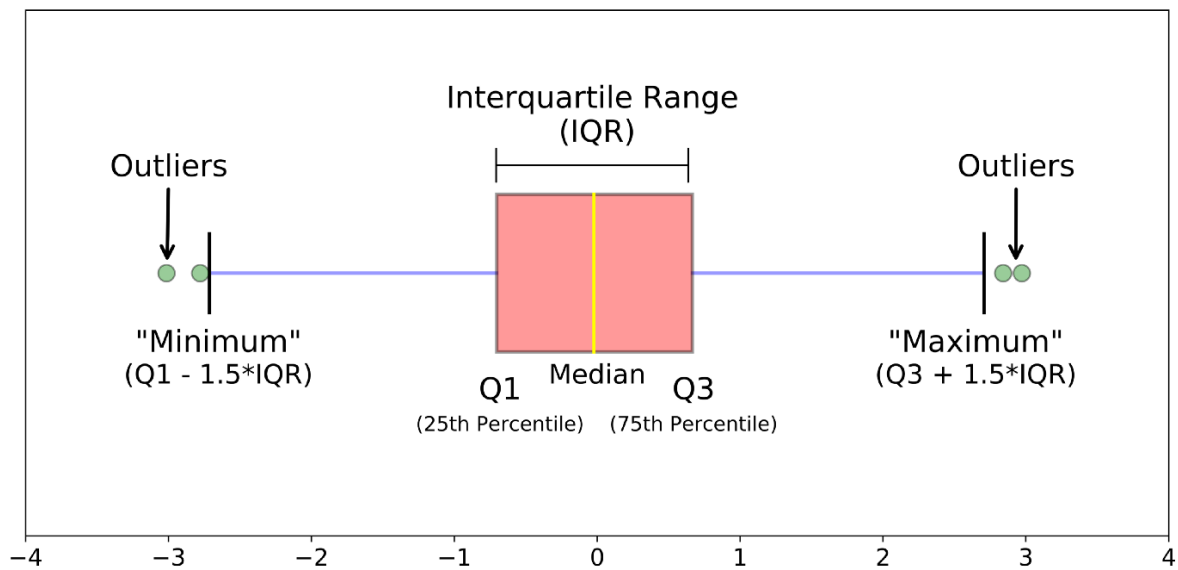
Αρχικά, παρατηρώντας τις επιμέρους εικόνες της εικόνας 11, μπορούμε να εξαγάγουμε πληροφορίες για τα 3 είδη τουλάχιστον σε ποιοτικό επίπεδο. Συγκρίνοντας λοιπόν τις εικόνες 11 (b),(e),(h), τα φωτοακουστικά σήματα της κάθε κατηγορίας ψαριών δηλαδή, επισημαίνουμε διαφορές τόσο στην ένταση των σημάτων όσο και στην κατανομή της μελανίνης στην επιφάνεια του λεπιού. Στην περίπτωση του λαβρακιού, η μελανίνη εμφανίζεται να είναι διασκορπισμένη σε μεγάλη επιφάνεια της επιφάνειας του λεπιού, δίνοντας παράλληλα και έντονο σήμα. Αντιθέτως στην περίπτωση της τσιπούρας, η χρωστική εμφανίζεται συσσωρευμένη σε σημεία ενώ στην περίπτωση του φαγκριού, λαμβάνουμε φωτοακουστικό σήμα σχετικά μικρής έντασης σε ακόμη μικρότερη επιφάνεια συγκριτικά με τις άλλες δύο κατηγορίες.



Εικόνα 13. Υβριδική απεικόνιση 3 δειγμάτων λεπιών που ανήκαν σε διαφορετικά είδη. (α) Εικόνα αυτοφθορισμού δείγματος λεπιού από φαγκρί. (β) Φωτοακουστική απεικόνιση του ίδιου λεπιού. (γ) Υβριδική εικόνα συγχώνευσης των δύο απεικονιστικών τεχνικών. (δ) Εικόνα αυτοφθορισμού δείγματος λεπιού από τσιπούρα θαλάσσης. (ε) Φωτοακουστική απεικόνιση του λεπιού τσιπούρας. (φ) Συνδυασμός των δυο σημάτων. (γ) Εικόνα αυτοφθορισμού δείγματος λεπιού από λαβράκι. (η) Αντίστοιχο φωτοακουστικό σήμα από το λέπι λαβρακιού. (ι) Υβριδική εικόνα συγχώνευσης των δύο σημάτων.

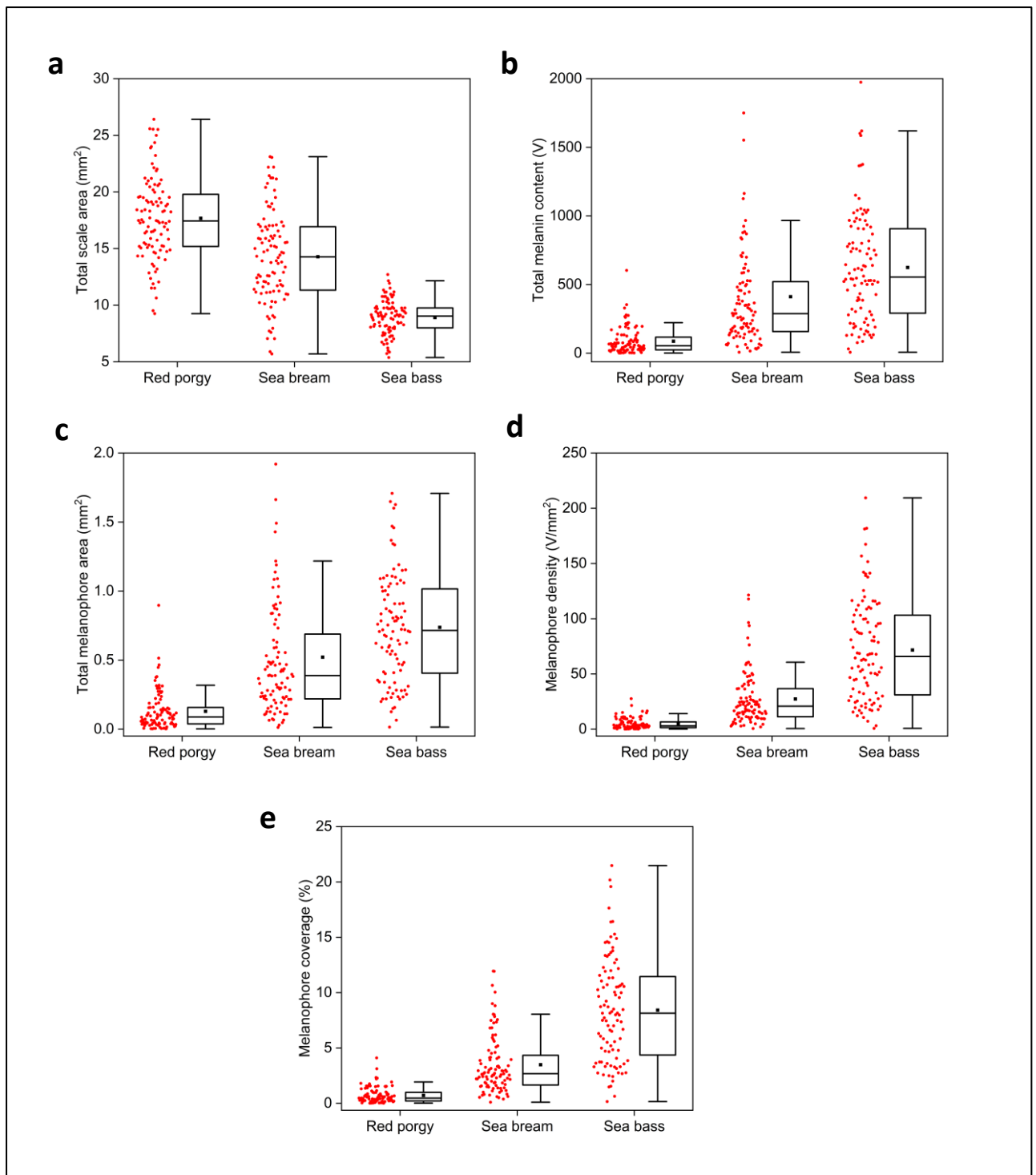
Έχοντας πραγματοποιήσει την επεξεργασία δεδομένων που εξηγήσαμε στο κεφάλαιο 5 στις μετρήσεις μας, προχωρήσαμε στην δημιουργία κάποιων box plots. Το box plot είναι μια μορφή γραφήματος με την οποία παρουσιάζουμε πέντε μέτρα μιας κατανομής ομαδοποιημένων δεδομένων. Οι 5 αυτές τιμές είναι η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή, το πρώτο και το τρίτο τεταρτημόριο και ο διάμεσος. Πολλές φορές στα γραφήματα αυτά περιλαμβάνεται

και ο μέσος όρος με μία τελεία. Γενικά τα box plots είναι χρήσιμα διαγράμματα όταν θέλουμε να συγκρίνουμε συνεχείς κατανομές διαφορετικών πληθυσμών<sup>[32]</sup>.



Εικόνα 14. Τα βασικά μέρη που απαρτίζουν ένα box plot.[33]

Στην εικόνα 13 παρατηρούμε τα 5 διαφορετικά box plots που κατασκευάσαμε για τις 3 κατηγορίες ψαριών. Το 13a box plot αναπαριστά την κατανομή των εμβαδών των λεπιών της κάθε κατηγορίας ψαριών, με κάθε κόκκινη τελεία να αντιστοιχεί στην τιμή του εμβαδού ενός λεπιού. Το 13b box plot μπορεί να αποτελέσει δείκτης της συνολικής ποσότητας μελανίνης και η τιμή κάθε τελείας στο γράφημα υπολογίστηκε με τον εξής τρόπο: στην περιοχή που καθορίστηκε ως επιφάνεια του λεπιού, αθροίστηκαν όλες οι τιμές του φωτοακουστικού σήματος που ξεπερνούν τη τιμή κατωφλίου (0.15V). Το box plot 13c αναπαριστά την κατανομή των τιμών της συνολικής περιοχής που καταλαμβάνουν τα μελανοφόρα στο λέπι και συνιστά εναλλακτικό δείκτη για την ποσότητα της μελανίνης ενώ το box plot 13d αποτελεί δείκτης της πυκνότητας μελανοφόρων στο λέπι. Τέλος, το box plot 13e αναπαριστά την κατανομή του ποσοστού επικάλυψης του λεπιού από μελανοφόρα και είναι δείκτης της πυκνότητας μελανίνης. Καταλήγουμε λοιπόν, με δύο δείκτες για την ποσότητα και δύο δείκτες για την πυκνότητα μελανίνης. Συγκρίνοντας τις κατανομές των τριών κατηγοριών σε κάθε box plot, επιβεβαιώνουμε μάλιστα και τις διαφορές που παρατηρήσαμε σε ποιοτικό επίπεδο. Παρατηρούμε, λοιπόν ότι τόσο στην συνολική ποσότητα μελανίνης όσο και στην περιοχή επικάλυψης του λεπιού από μελανοφόρα, το λαβράκι εμφανίζει πολύ μεγαλύτερες τιμές κατά μέσο όρο από τις δύο άλλες κατηγορίες.



Εικόνα 15. Box plots των μεγεθών που υπολογίσαμε μέσω του script στη MATLAB με πληθυσμό κατανομής 100 δείγματα για κάθε κατηγορία ψαριών. (a) Box plot του εμβαδού του λεπιού για τις 3 κατηγορίες ψαριών. (b) Box plot της συνολικής ποσότητας μελανίνης για τα 3 είδη. (c) Box plot της συνολικής επιφάνειας επικάλυψης του λεπιού από μελανίνη. (d) Box plot της πυκνότητας μελανοφόρων στις 3 κατηγορίες. (e) Box plot του ποσοστού επικάλυψης της επιφάνειας του λεπιού από μελανίνη για τα 3 είδη ψαριών.

Έχοντας εφαρμόσει το MATLAB script και στις 300 μετρήσεις μας, κατασκευάσαμε τον πίνακα 1. Παρατηρούμε ότι οι διαφορές που επισημίναμε σε ποιοτικό επίπεδο επιβεβαιώνονται και από τον πίνακα. Πιο συγκεκριμένα, τα λαβράκια παρουσιάζουν την

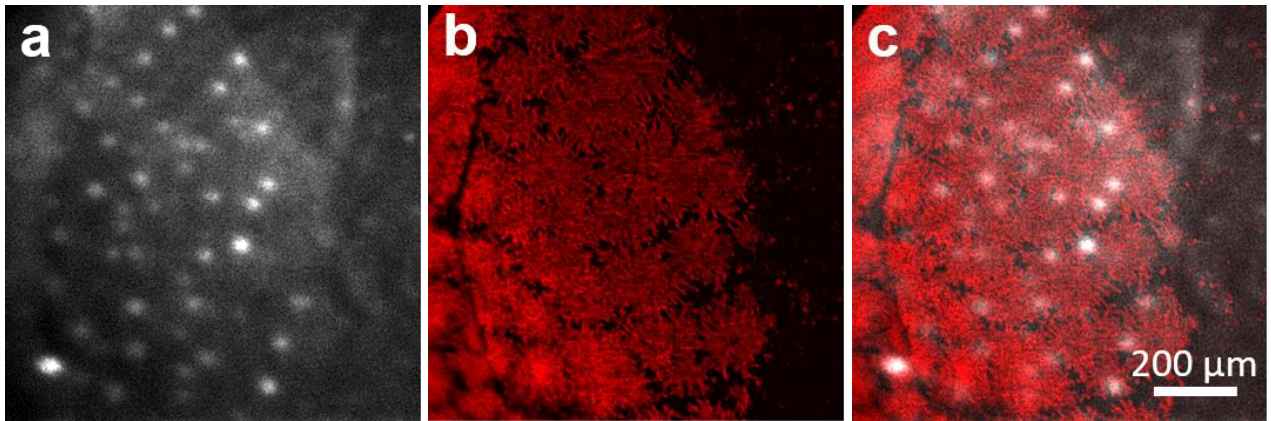
μεγαλύτερη συνολική ποσότητα μελανίνης και το μεγαλύτερο ποσοστό επικάλυψης του λεπιού από την χρωστική αυτή. Μάλιστα, το μεγάλο ποσοστό αυτό ενισχύεται και από το μικρή επιφάνεια των λεπιών της κατηγορίας των λαβρακιών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη. Μετά το λαβράκι, επόμενο στην ιεραρχία ως προς την ποσότητα μελανίνης έρχεται η τσιπούρα θαλάσσης με μισό περίπου ποσοστό επικάλυψης και τέλος, τις χαμηλότερες τιμές φέρουν τα λέπια φαγκριού.

**Πίνακας 1**

Είδος ψαριού	Επιφάνεια λεπιού(mm <sup>2</sup> )	Συνολική ποσότητα μελανίνης(V)	Επιφάνεια επικάλυψης μελανίνης (mm <sup>2</sup> )	Πυκνότητα Μελανίνης (V/mm <sup>2</sup> )	Ποσοστό επικάλυψης (%)
<b>Φαγκρί</b>	17.67 (±0.36)	86.83 (±9.63)	0.129 (±0.014)	4.83 (±0.50)	0.718 (±0.071)
<b>Τσιπούρα θαλάσσης</b>	14.28 (±0.40)	411.48 (±42.50)	0.521 (±0.047)	27.32 (±2.38)	3.486 (±0.262)
<b>Λαβράκι θαλάσσης</b>	8.91 (±0.15)	624.36 (±39.86)	0.737 (±0.042)	71.60 (±4.57)	8.419 (±0.468)

*Όλες οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p=0.001$ .*

Όπως προαναφέρθηκε στην θεωρία, ο χρωματισμός των ψαριών εμφανίζει διαφοροποιήσεις από είδος σε είδος και αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Καθίσταται λοιπόν, πολύ δύσκολο να αποφανθούμε ποια/ποιες ήταν οι παράμετροι οι οποίες όρισαν στον μεγαλύτερο βαθμό το χρωματισμό των τριών ειδών που μελετήσαμε και επέφεραν τις διαφορές που παρατηρήσαμε. Πιθανές παράμετροι που μπορεί να συντέλεσαν στις διαφοροποιήσεις είναι τα φυλετικά χαρακτηριστικά, το οικοσύστημα μέσα στο οποίο ζει το κάθε ψάρι, ο βαθμός έκθεσης στην ακτινοβολία UV ή αλλιώς, το βάθος που ζει το κάθε είδος, κλπ. Αν και τα βάθη ζωής σε μεγάλο βαθμό συμπίπτουν, σε γενικές γραμμές τα λαβράκια ζούνε σε βάθη 10-100 μέτρα<sup>[34]</sup>, οι τσιπούρες σε 1-150 μέτρα<sup>[35]</sup> ενώ τα φαγκριά μπορούν να προσεγγίσουν βάθη μέχρι και 250 μέτρα<sup>[36]</sup>. Οπότε είναι πιθανή η διαφοροποίηση εξαιτίας διαφορετικών βαθών.



Εικόνα 16. Υβριδική απεικόνιση δείγματος λεπιού από λαβράκι διαστάσεων  $1 \times 1 \text{ mm}^2$ . (α) Εικόνα αυτοφθορισμού του λεπιού, όπου τα σημεία με μεγάλο σήμα αντιστοιχούν σε ξανθοφόρα κύτταρα. (β) Φωτοακουστική απεικόνιση του δείγματος, όπου στα μελανοφόρα διακρίνονται οι αποφύσεις (αποτέλεσμα της κατανομής των μελανοσωμάτων στα μελανοκύτταρα) (γ) Υβριδική εικόνα συγχώνευσης των δυο απεικονιστικών τεχνικών.

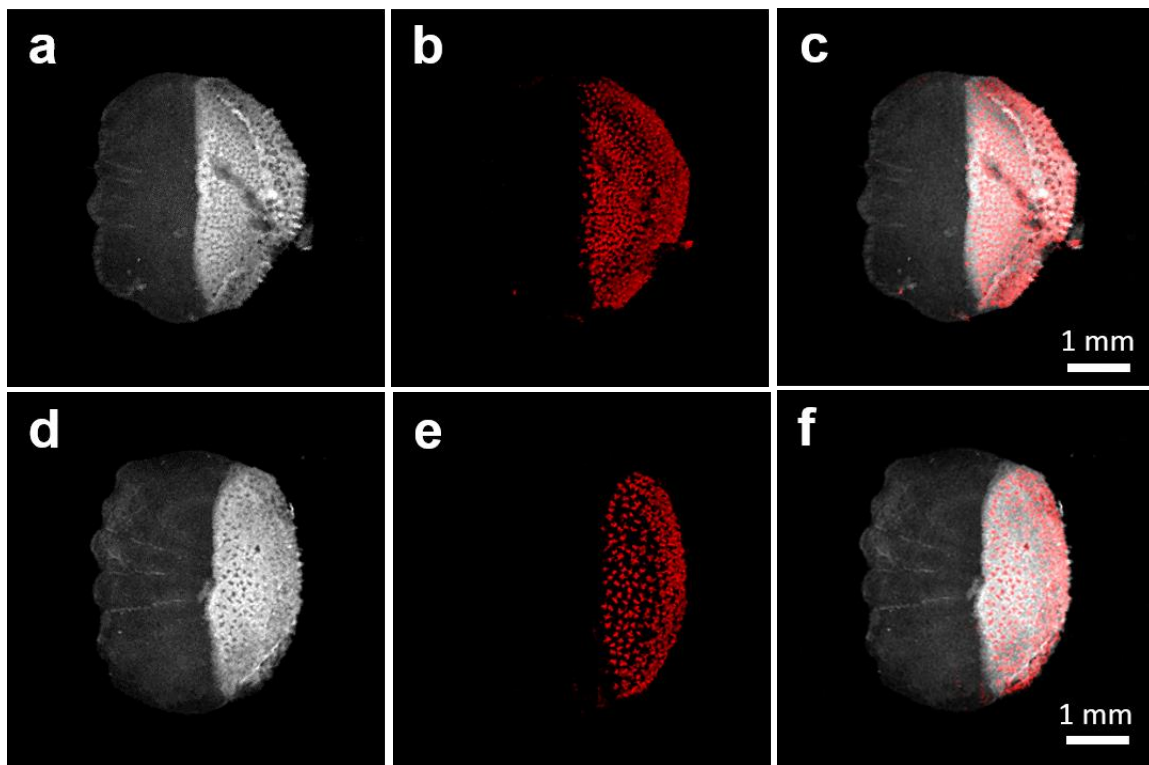
Απεικονίζοντας μια πολύ μικρή περιοχή ( $1 \times 1 \text{ mm}^2$ ) ενός λεπιού από λαβράκι, παρατηρήσαμε στην εικόνα 11b μια πολύ ενδιαφέρουσα λειτουργία των μελανοκυττάρων. Στην εικόνα αυτή, διακρίνονται γύρω από κάθε μελανοκύτταρο κάποιες αποφύσεις, οι οποίες δίνουν μη αμελητέο φωτοακουστικό σήμα. Αυτές είναι αποτέλεσμα της δυνατότητας των μελανοσωμάτων να κινούνται μέσα στο μελανοκύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, εμείς εδώ παρατηρούμε την φάση κατά την οποία τα μελανοσώματα είναι διασκορπισμένα στην περιφέρεια του μελανοκυττάρου, δίνοντας του αυτό το ιδιαίτερο σχήμα. Συγκρίνοντας τις εικόνες 12a και 12b, βλέπουμε ότι κάθε τεχνική απεικόνισης μας προσφέρει πληροφορία για διαφορετικές δομές, οπότε συνδυάζοντας αυτές καταλήγουμε με μία πολύ πιο λεπτομερή υβριδική εικόνα.

## 6.2 Σύγκριση ομοειδών ψαριών με διατροφικές διαφοροποιήσεις

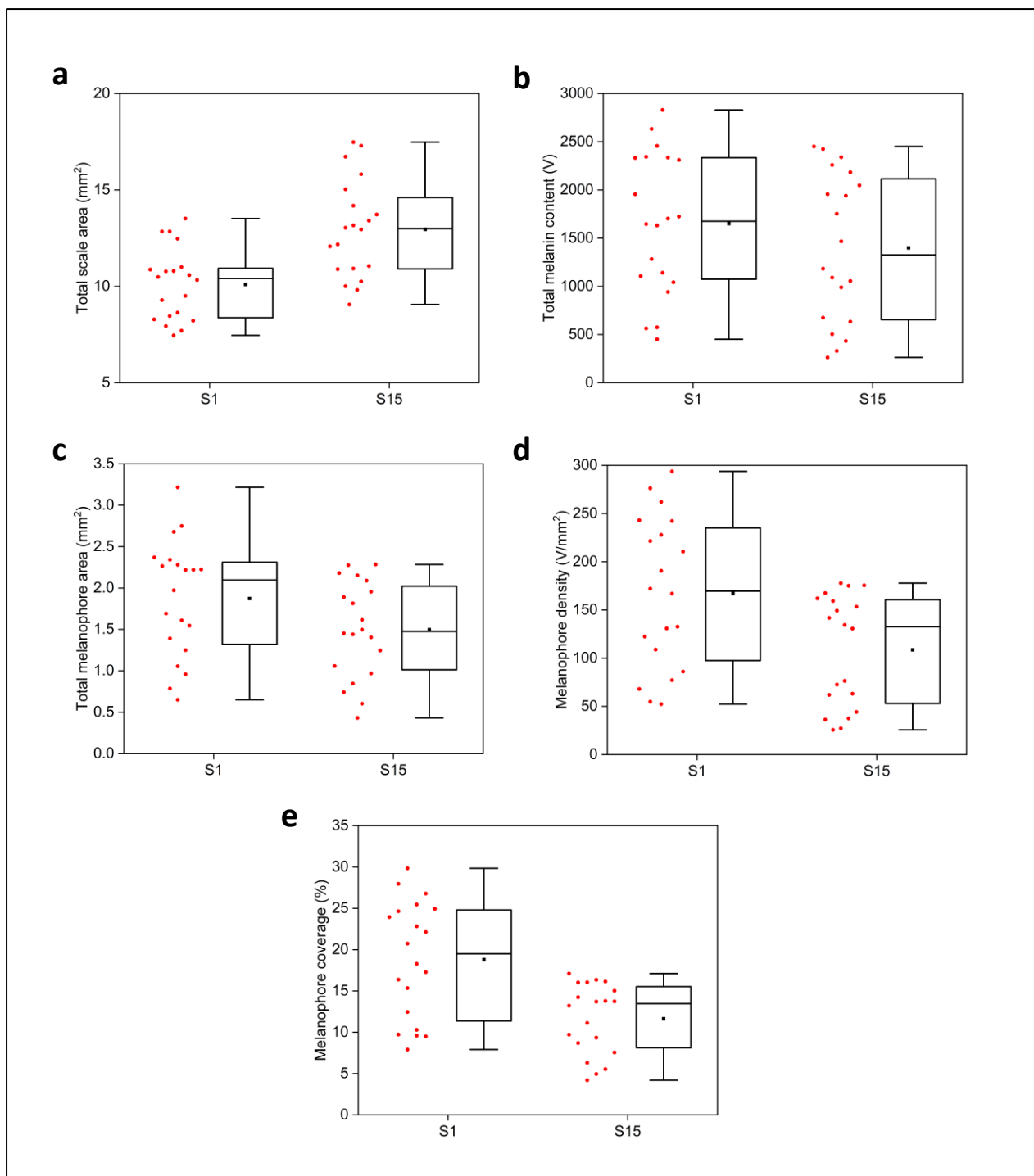
Σε αυτό το κομμάτι του πειράματος, απεικονίσαμε δείγματα λεπιών από δύο ομάδες (S1 και S15) τσιπουρών ιχθυοτροφείου. Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων είναι ότι στη μία (S15) από αυτές, στα ψάρια δόθηκε τροφή με αντιμελανικές ιδιότητες. Εξαιτίας του γεγονότος ότι πρόκειται ακόμα για εμπιστευτική έρευνα, δεν μπορούμε να παρέχουμε πληροφορίες σχετικά με την πηγή του αντιμελανικού παράγοντα, οπότε θα αναφερόμαστε σε αυτόν ως «φυσικό εκχύλισμα M».

Χωρίς να προβούμε σε κάποια ποσοτικοποίηση, συγκρίνοντας τις εικόνες 12b και 12e παρατηρούμε διαφορές. Η μελανίνη, στα λέπια της ομάδας ψαριών που δόθηκε το φυσικό εκχύλισμα M (Εικόνα 12e), φαίνεται να συσσωρεύεται σε κάποιες περιοχές σε αντίθεση με

την κατανομή της μελανίνης στην άλλη ομάδα (Εικόνα 12b), όπου βλέπουμε την μελανίνη να έχει επικαλύψει μια μεγαλύτερη επιφάνεια του λεπιού. Τουλάχιστον σε ποιοτικό επίπεδο, δεν παρατηρούμε κάποια έντονη διαφορά ανάμεσα στις εντάσεις του φωτοακουστικού σήματος σε κάθε περίπτωση. Παράλληλα, κατασκευάσαμε και πάλι 5 box plots, αναπαριστώντας τις κατανομές των μεγεθών που περιγράψαμε και στις 3 κατηγορίες ψαριών. Οι κατανομές σε γενικές γραμμές δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους, με εξαίρεση το box plot 18e, όπου τα ποσοστά επικάλυψης της S1 εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές από την ομάδα S15.



Εικόνα 17. Υβριδική απεικόνιση δύο δειγμάτων λεπιών από διαφορετικές ομάδες (S1 και S15) τσίπουρων ιχθυοτροφείου, με την μία ομάδα (S15) να έχει τραφεί με φυσικό εκχύλισμα M που φέρει αντιμελανικές ιδιότητες (d,e,f). (a) Εικόνα αυτοφθορισμού λεπιού από τσιπούρα ιχθυοτροφείου ομάδας A. (b) Φωτοακουστική απεικόνιση του ίδιου λεπιού. (c) Υβριδική απεικόνιση με την συγχώνευση των δύο τεχνικών. (d) Εικόνα αυτοφθορισμού λεπιού από τσιπούρα ιχθυοτροφείου ομάδας S15. (e) Φωτοακουστική εικόνα του ίδιου λεπιού. (f) Υβριδική εικόνα του φωτοακουστικού σήματος και σήματος αυτοφθορισμού.



Εικόνα 18. . Box plots των μεγεθών που υπολογίσαμε μέσω του script με πληθυσμό κατανομής 20 δείγματα τσιπουρών ιχθυοτροφείου για κάθε ομάδα (S1 και S15), όπου στην ομάδα S15 δόθηκε φυσικό εκχύλισμα M με αντιμελανικές ιδιότητες. (a) Box plot του εμβαδού του λειπού για τις 2 κατηγορίες ψαριών. (b) Box plot της συνολικής ποσότητας μελανίνης για τις 2 ομάδες. (c) Box plot της συνολικής επιφάνειας επικάλυψης του λειπού από μελανίνη. (d) Box plot της πυκνότητας μελανοφόρων στις 2 κατηγορίες. (e) Box plot του ποσοστού επικάλυψης της επιφάνειας του λειπού από μελανίνη για τις 2 ομάδες ψαριών.

Προχωρώντας την επεξεργασία σε ποσοτικό επίπεδο, παρατηρούμε στο πίνακα 2 ότι οι συνολικές ποσότητες μελανίνης μεταξύ των δύο ομάδων δεν διαφέρουν σημαντικά. Αντιθέτως, τα ποσοστά επικάλυψης της επιφάνειας του λειπού από μελανίνη εμφανίζουν



διαφοροποιήσεις στατιστικά σημαντικές, με την ομάδα S15 να εμφανίζει αρκετά μικρότερο ποσοστό. Παράλληλα, πρέπει να λάβουμε υπόψιν μας όμως, ότι αν και τα δύο λέπια προέρχονται από το ίδιο είδος ψαριού, εμφάνισαν μια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα εμβαδά των επιφανειών τους, γεγονός που επηρέασε τις τελικές τιμές των ποσοστών επικάλυψης. Με μετριοπάθεια λοιπόν, εφόσον δεν συγκρίνουμε ομάδες ισομεγεθών λεπιών, μπορούμε να πούμε ότι ο αντιμελανικός παράγοντας επέφερε αλλαγές στην κατανομή της μελανίνης αλλά όχι τόσο στην ποσότητα της.

**Πίνακας 2**

Είδος ψαριού	Επιφάνεια λεπιού (mm <sup>2</sup> )**	Συνολική ποσότητα μελανίνης (V)	Επιφάνεια επικάλυψης μελανίνης (mm <sup>2</sup> )	Πυκνότητα Μελανίνης (V/mm <sup>2</sup> )*	Ποσοστό επικάλυψης (%)**
<b>S1</b>	10.10 (±0.41)	1650.12 (±164.60)	1.873 (±0.157)	166.98 (±17.45)	18.797 (±1.580)
<b>S15</b>	12.95 (±0.57)	1398.65 (±172.12)	1.497 (±0.130)	108.53 (±12.88)	11.639 (±0.954)

\*Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p=0.05$ .

\*\*Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές με  $p=0.001$ .

## Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα

Η μελανίνη ,ως βασική χρωστική ουσία για το χρωματισμό του δέρματος, έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σε πολλές μελέτες, αφού η ίδια έχει ποικίλες λειτουργίες στον οργανισμό όπως η φωτοπροστασία, η καλύτερη αντιμετώπιση παθογόνων, η ρύθμιση της θερμοκρασίας του οργανισμού κλπ. Σε αυτήν την έρευνα, χρησιμοποιήσαμε ένα υβριδικό σύστημα απεικόνισης, το οποίο συνδυάζει δύο τεχνικές, την μικροσκοπία αυτοφθορισμού και την φωτοακουστική απεικόνιση. Σκοπός του πειράματος ήταν να αναπτύξουμε έναν καινοτόμο τρόπο ποσοτικοποίησης της μελανίνης στα λέπια διάφορων ειδών ψαριών, αφού η χρωστική αυτή μπορεί να αποτελέσει δείκτη της υγείας και ευζωίας του οργανισμού. Μάλιστα, η ανάπτυξη μιας τέτοια μεθόδου έχει εφαρμογές σε διάφορους κλάδους της βιολογίας, όπως η ιχθυοκαλλιέργεια, όπου σε καλλιεργούμενα είδη όπως το φαγκρί εμφανίζονται συχνά

προβλήματα υπερμελάνωσης. Ένα τέτοιο πρόβλημα όμως ενδιαφέρει στενά τους ιχθυοκαλλιεργητές, αφού το χρώμα της σάρκας και του δέρματος του ψαριού θεωρούνται βασικά κριτήρια για την ποιότητα του.

Αρχικά λοιπόν, απεικονίσαμε δείγματα λεπιών που προέρχονταν από τρία διαφορετικά είδη ψαριών θαλάσσης: λαβράκι, τσιπούρα και φαγκρί. Με την βοήθεια ενός script στην MATLAB εξαγάγαμε διάφορα χρήσιμα μεγέθη σχετιζόμενα με την ποσότητα μελανίνης στο λέπι. Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι τα λέπια από λαβράκι εμφάνισαν τα μεγαλύτερα φωτοακουστικά σήματα και το μεγαλύτερο ποσοστό επικάλυψης της επιφάνειας του λεπιού από μελανίνη, με τις τσιπούρες θαλάσσης να έρχονται δεύτερες και τελευταία τα φαγκριά. Η απόδοση των διαφορών αυτών σε κάποιο συγκεκριμένο παράγοντα συνιστά παρακινδυνευμένη παραδοχή, καθώς ο χρωματισμός των ψαριών αποτελεί ένα περίπλοκο και πολυπαραμετρικό φαινόμενο. Κάποιες από τις παραμέτρους που συνέβαλλαν στις διαφοροποιήσεις θα μπορούσε να είναι τα φυλετικά χαρακτηριστικά, ο βαθμός έκθεσης στην ακτινοβολία UV, το ενδιαίτημα κλπ.

Στη συνέχεια, απεικονίσαμε δείγματα λεπιών που προέρχονταν από δύο διαφορετικές ομάδες (S1 και S15) τσιπουρών ιχθυοτροφείου, όπου στην ομάδα S15 είχε δοθεί φυσικό εκχύλισμα M με αντιμελανικές ιδιότητες. Αφού υπολογίσαμε τα ίδια μεγέθη και για αυτές τις ομάδες, παρατηρήσαμε ότι ενώ και στις δύο οι συνολικές ποσότητες μελανίνης ήταν παρόμοιες, εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορά τα ποσοστά επικάλυψης της επιφάνειας από την μελανίνη. Παράλληλα όμως, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά και τα εμβαδά της επιφάνειας των λεπιών, αν και ανήκουν στο ίδιο είδος. Παρόλου λοιπόν που δεν συγκρίνουμε ισομεγέθη λέπια, με μετριοπάθεια επισημαίνουμε ότι ο αντιμελανικός παράγοντας επέφερε αλλαγές στην κατανομή της μελανίνης και όχι τόσο στην ποσότητα της.

Μετά την απεικόνιση των λεπιών, προχωρήσαμε στην φωτοακουστική απεικόνιση διαφορετικών συγκεντρώσεων πρότυπων δειγμάτων μελανιού σουπιάς σε τζελ αгарόζης 2%. Με τις μετρήσεις αυτές, κατασκευάσαμε ένα γράφημα συσχέτισης του φωτοακουστικού σήματος με συγκεντρώσεις μελανίνης με το οποίο μπορούμε να μεταφράζουμε το φωτοακουστικό σήμα της μελανίνης από Volt σε απόλυτες τιμές συγκεντρώσεων.

Παράλληλα με την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, επιτεύχθηκε μέσω νευρωνικών δικτύων η κατηγοριοποίηση τυχαίων λεπιών που ανήκαν σε μία από τις κατηγορίες που μελετήσαμε. Δίνοντας δηλαδή μια τυχαία εικόνα λεπιού στον υπολογιστή, παίρνουμε σαν έξοδο την κατηγορία στην οποία ανήκει το λέπι αυτό. Αποδείχθηκε λοιπόν, η εφαρμοσιμότητα της παραπάνω μεθόδου, αφού ο υπολογιστής δύναται να εκπαιδευτεί ως προς

την αναγνώριση λεπιών και ως μια μελλοντική απόπειρα, θα άξιζε η συλλογή μεγάλων βάσεων δεδομένων για την βελτίωση και εξέλιξη των δυνατοτήτων του παραπάνω πρότζεκτ.

Μια μελλοντική εφαρμογή της μεθόδου ποσοτικοποίησης της μελανίνης που παρουσιάσαμε, θα μπορούσε να είναι σε περιβάλλοντα ιχθυοκαλλιέργειας, όπου με ένα φορητό σύστημα υβριδικής απεικόνισης, ο ιχθυοκαλλιεργητής θα μπορεί ανά πάσα στιγμή να ελέγξει τα επίπεδα μελανίνης στα ψάρια που εκτρέφει και να λάβει πληροφορίες για την υγεία τους. Επίσης, έχοντας διαθέσιμη μια αξιόπιστη τεχνική για την ποσοτικοποίηση της μελανίνης, μπορούν να διευκολυνθούν και να εντατικοποιηθούν οι έρευνες σχετικά με τις λειτουργίες της χρωστική αυτής σε έναν οργανισμό.

Τέλος, η τεχνική που χρησιμοποιήσαμε στην έρευνα αυτή επιδέχεται βελτιώσεις τόσο ως προς την ταχύτητα σάρωσης όσο και ως προς την ανάλυση της. Όσον αφορά την ανάλυση, δύναται να πετύχουμε υψηλότερες αναλύσεις με το ήδη υπάρχον σύστημα απεικόνισης αλλά αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα να γίνει η διαδικασία πολύ πιο χρονοβόρα ενώ αναφορικά με την ταχύτητα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλοι τρόποι σάρωσης όπως γαλβανομετρικοί καθρέφτες ή ο συνδυασμός γαλβανομετρικών με το σύστημα των stages που εκμεταλλευτήκαμε εδώ. Επιπλέον, χρήσιμη θα ήταν η δυνατότητα πολυφασματικής απεικόνισης τόσο στον φθορισμό όσο και στην φωτοακουστική μικροσκοπία για την διέγερση διαφορετικών φθοροφόρων και χρωμοφόρων και επομένως την λήψη μεγαλύτερου όγκου χρήσιμης πληροφορίας.

## Βιβλιογραφία

- [1] “Scale.” *Encyclopædia Britannica*, Encyclopædia Britannica, Inc., [www.britannica.com/science/scale-zoology](http://www.britannica.com/science/scale-zoology).
- [2] “Dermis.” *Wikipedia*, Wikimedia Foundation, 9 Jan. 2021, [en.wikipedia.org/wiki/Dermis](https://en.wikipedia.org/wiki/Dermis).
- [3] “Fish Colouration.” *FishScience*, 19 June 2019, [www.fishscience.co.uk/faq/fish-colouration/](http://www.fishscience.co.uk/faq/fish-colouration/).
- [4] “Ένδιαίτημα.” *Wikipedia*, Wikimedia Foundation, 30 July 2020, [el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CE%BD%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%AF%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B1](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CE%BD%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%AF%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B1).

- [5] Pavlidis, Michalis, et al. “Environmental Control of Skin Colour in the Red Porgy, *Pagrus Pagrus*.” *Aquaculture Research*, vol. 39, no. 8, 2008, pp. 837–849., doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01937.x.
- [6] Aspengren, S., et al. “Different Strategies for Color Change.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 2, 2008, pp. 187–191., doi:10.1007/s00018-008-8541-0.
- [7] “Melanosome.” *Wikipedia*, Wikimedia Foundation, 9 Jan. 2021, en.wikipedia.org/wiki/Melanosome.
- [8] Roulin, Alexandre. “Melanin-Based Colour Polymorphism Responding to Climate Change.” *Global Change Biology*, vol. 20, no. 11, 2014, pp. 3344–3350., doi:10.1111/gcb.12594.
- [9] Kittilsen, Silje, et al. “Pigments, Parasites and Personality: Towards a Unifying Role for Steroid Hormones?” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0034281.
- [10] Côte, J., et al. “Melanin-Based Coloration and Host–Parasite Interactions under Global Change.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 285, no. 1879, 2018, p. 20180285., doi:10.1098/rspb.2018.0285.
- [11] Tserevelakis, George. “Photoacoustic Tomography.” pc4b.gr/pdf/biol-403dem/05-pat.pdf.
- [12] Tserevelakis, George J., et al. “Hybrid Photoacoustic and Optical Imaging of Pigments in Vegetative Tissues.” *Journal of Microscopy*, vol. 263, no. 3, 2016, pp. 300–306., doi:10.1111/jmi.12396.
- [13] “The PAC Time-Window.” *Molecular Energetics Group*, molenergetics.fc.ul.pt/PAC\_0055.html.
- [14] Tserevelakis, George. “Photoacoustic Microscopy.” pc4b.gr/pdf/biol-403dem/10-fotoakoustikh-mikroskopia.pdf.
- [15] Yao, Junjie, and Lihong V. Wang. “Photoacoustic Microscopy.” *Laser & Photonics Reviews*, vol. 7, no. 5, 2013, pp. 758–778., doi:10.1002/lpor.201200060.
- [16] “Jablonski Diagram.” *Wikipedia*, Wikimedia Foundation, 25 May 2020, en.wikipedia.org/wiki/Jablonski\_diagram.
- [17] “Fluorescence.” *Encyclopædia Britannica*, Encyclopædia Britannica, Inc., 24 Mar. 2017, [www.britannica.com/science/fluorescence](http://www.britannica.com/science/fluorescence)
- [18] Hegyi, J., and V. Hegyi. “New Developments in Fluorescence Diagnostics.” *Imaging in Dermatology*, 2016, pp. 89–94., doi:10.1016/b978-0-12-802838-4.00009-1.
- [19] Fred Rost, “Fluorescence Microscopy, Applications”, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*, 2017, pp. 627-631, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00147-3>.

- [20] Zhang, Fengxiang, et al. “Preparation and Characterisation of Collagen from Freshwater Fish Scales.” *Food and Nutrition Sciences*, vol. 02, no. 08, 2011, pp. 818–823., doi:10.4236/fns.2011.28112.
- [21] Spring, Kenneth R., and Michael W. Davidson. “Introduction to Fluorescence Microscopy.” *Nikon's MicroscopyU*, [www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy](http://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy).
- [22] Tserevelakis, George. “Fluorescence Microscopy”, [pc4b.gr/pdf/biol-403dem/07-mikroskopia-ftorismou-1](http://pc4b.gr/pdf/biol-403dem/07-mikroskopia-ftorismou-1).
- [23] Majtner, Tomas. “Texture-Based Image Description in Fluorescence Microscopy.” Dec. 2015.
- [24] Combs, Christian A., and Hari Shroff. “Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods.” *Current Protocols in Neuroscience*, vol. 79, no. 1, 2017, doi:10.1002/cpns.29.
- [25] Bayguinov, Peter O., et al. “Modern Laser Scanning Confocal Microscopy.” *Current Protocols in Cytometry*, vol. 85, no. 1, 2018, doi:10.1002/cpcy.39.
- [26] “IF Imaging: Widefield versus Confocal Microscopy.” *Proteintech Group*, [www.ptglab.com/news/blog/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy/](http://www.ptglab.com/news/blog/if-imaging-widefield-versus-confocal-microscopy/).
- [27] Tserevelakis, George J., et al. “Delineating the Anatomy of the Ciliary Body Using Hybrid Optical and Photoacoustic Imaging.” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 22, no. 6, 2017, p. 060501., doi:10.1117/1.jbo.22.6.060501.
- [28] Tserevelakis, George J, et al. “Hybrid Autofluorescence and Photoacoustic Label-Free Microscopy for the Investigation and Identification of Malignancies in Ocular Biopsies.” *Optics Letters*, vol. 45, no. 20, 2020, pp. 5748–5751., doi:10.1364/OL.403435.
- [29] Harrison, Tyler, et al. “Combined Photoacoustic and Ultrasound Biomicroscopy.” *Optics Express*, vol. 17, no. 24, 2009, p. 22041., doi:10.1364/oe.17.022041.
- [30] Nuster, R., Schmitner, N., Wurzinger, G., Gratt, S., Salvenmoser, W., Meyer, D., & Paltauf, G. “Hybrid Photoacoustic and Ultrasound Section Imaging with Optical Ultrasound Detection.” *Journal of Biophotonics*, vol. 6, no. 6-7, 2013, pp. 549–559., doi:10.1002/jbio.201200223.
- [31] “K-Means Clustering.” *Wikipedia*, Wikimedia Foundation, 4 Jan. 2021, [en.wikipedia.org/wiki/K-means\\_clustering](https://en.wikipedia.org/wiki/K-means_clustering).
- [32] “Θηκόγραμμα.” *Wikipedia*, Wikimedia Foundation, 4 Feb. 2021, [el.wikipedia.org/wiki/%CE%98%CE%B7%CE%BA%CF%8C%CE%B3%CF%81%CE%B1%CE%BC%CE%BC%CE%B1](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%98%CE%B7%CE%BA%CF%8C%CE%B3%CF%81%CE%B1%CE%BC%CE%BC%CE%B1).

- [33] Galarnyk, Michael. "Understanding Boxplots." *Medium*, Towards Data Science, 6 July 2020, [towardsdatascience.com/understanding-boxplots-5e2df7bcbd51](https://towardsdatascience.com/understanding-boxplots-5e2df7bcbd51).
- [34] "Dicentrarchus Labrax Summary Page." *FishBase*, [www.fishbase.se/summary/dicentrarchus-labrax.html](http://www.fishbase.se/summary/dicentrarchus-labrax.html).
- [35] "Sparus Aurata Summary Page." *FishBase*, [www.fishbase.se/summary/Sparus-aurata.html](http://www.fishbase.se/summary/Sparus-aurata.html).
- [36] "Pagrus Pagrus Summary Page." *FishBase*, [www.fishbase.se/summary/Pagrus-pagrus.html](http://www.fishbase.se/summary/Pagrus-pagrus.html).