



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΟΡΓΟΥΛΗΣ

**ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Γ. ΚΑΡΑΝΤΖΟΥΛΗΣ
Ιατρός

ΑΘΗΝΑ 2014

Αφιερώνεται στον Ι.Στ.Παπαδόπουλο

ο οποίος είναι ο εμπνευστής της παρούσας διατριβής
διέθεσε το υλικό για την πραγματοποίησή της
υπήρξε ο δάσκαλός μου στα πρώτα βήματα στη Ιατρική
και επηρέασε σε μείζονα βαθμό ό,τι έχω γίνει
ως άνθρωπος και ως γιατρός.

ΕΘΝΙΚΟΝ ὡ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
 ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
 ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
 ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΕΘΑΙ
 ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ·
 ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
 ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΣΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
 ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡΕΣΙ· ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
 ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΘΗΣΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
 ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΠΡΟΪΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
 ΑΠΑΞΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
 ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
 ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΕΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
 ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
 ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ· ΕΠΙΔΡΑΨΗΣ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ.
 ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙ-
 ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
 ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΡΙΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
 ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥΤΕΜΕΩ
 ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
 ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
 ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
 ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
 ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
 ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
 ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
 ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
 ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
 ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
 ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ·
 ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΡΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΙ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΣΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΕΩΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΚΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΚΤΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΔΟΞΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ, ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΚΙΑΝ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΩ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣΑΥΤΩΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΗΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΙΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΡΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ, ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΩΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΩΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΩΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΔΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΩΣ ΕΙΣΔΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

- **Ημερομηνία υποβολής αίτησης διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών 12/01/2007**
- **Η 3μελής συμβουλευτική επιτροπή ορίστηκε στις 22/05/2007**
- **Το πρωτόκολλο της διατριβής, υπογεγραμμένο από την 3μελή επιτροπή, υποβλήθηκε στις 10/10/2007**
- **Η 7μελής εξεταστική επιτροπή ορίστηκε στις 14/01/2014**
- **Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής δεν συνεπάγεται αποδοχή εκ μέρους της Ιατρικής Σχολής του περιεχομένου της διατριβής.**

Μέλη 3-μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- **Παναγιώτης Παπαγγελόπουλος**, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Μυρσίνη Κουλούκουσα**, Αναπλ. Καθηγήτρια Ιστολογίας (επιβλέπουσα) Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Χάρις Λιάπη**, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Μέλη 7-μελούς Εξεταστικής Επιτροπής

- **Παναγιώτης Παπαγγελόπουλος**, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Βασίλειος Γοργούλης**, Καθηγητής Ιστολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Παναγιώτης Μέγας**, Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών
- **Μυρσίνη Κουλούκουσα**, Αναπλ. Καθηγήτρια Ιστολογίας (επιβλέπουσα) Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Χάρις Λιάπη**, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Ανδρέας Λάζαρης**, Αναπλ. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
- **Ιωάννης Στ. Παπαδόπουλος**, τ. Αναπλ. Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, συγκεκριμένα την **Αναπλ. Καθηγήτρια Κα Ασπασία Κυρούδη-Βούλγαρη**, η οποία επέβλεψε το μεγαλύτερο μέρος της διατριβής έως τη συνταξιοδότησή της το 2010, την **Αναπλ. Καθηγήτρια Κα Μυρσίνη Κουλούκουσα** η οποία ανέλαβε την επίβλεψη από 2011 έως την ολοκλήρωση της διατριβής, τον **Καθηγητή Κο Παναγιώτη Παπαγγελόπουλο** για την υποστήριξή του σε όλο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής, καθώς και την **Αναπλ. Καθηγήτρια Κα Χάρις Λιάπη** όχι μόνο για τη συμμετοχή της στη συγκεκριμένη διατριβή αλλά και για όλη τη συμβολή της στην προσωπική μου επιστημονική και προσωπική πορεία από τα φοιτητικά χρόνια.
- Ευχαριστώ την **Αναπλ. Καθηγήτρια Κα Ελένη Πέτρου-Παπαδάκη** για την ευγενική παραχώρηση χώρου στο Εργαστήριο Ανατομίας του Παν. Πατρών, όπου πραγματοποιήθηκε ένα μέρος των πειραμάτων.
- Ευχαριστώ τον **Καθηγητή Κο Γιώργο Ηλιάδη** για την σάρωση ενός αριθμού δειγμάτων στο μηχάνημα microCT του Εργαστηρίου Βιοϋλικών της Οδοντιατρικής Σχολής του Παν. Αθηνών, τα οποία εν συνεχεία συγκρίθηκαν με την παρούσα μέθοδο.
- Τέλος, ευχαριστώ από βάθους καρδιάς τον **τ. Αναπλ. Καθηγητή Κο Ιωάννη Στ. Παπαδόπουλο**, ο οποίος διέθεσε το υλικό των μηνιαίων κεφαλών με το οποίο πραγματοποιήθηκε η διατριβή από το προσωπικό του αρχείο ως Επιμελητής στην Ορθοπεδική Κλινική του Νοσ. Ευαγγελισμός, υπήρξε ο εμπνευστής της παρούσας διατριβής, υπήρξε ο δάσκαλός μου στα πρώτα μου βήματα στην Ιατρική ως φοιτητής, και επηρέασε σε μείζονα βαθμό την προσωπικότητά μου και την αντίληψή μου για την άσκηση της Ιατρικής

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα	Βασίλειος Καραντζούλης του Γεωργίου
Ημερομηνία Γέννησης:	7 Απριλίου 1977
Τόπος Γέννησης:	Αθήνα
Οικογενειακή κατάσταση:	Έγγαμος, πατέρας 2 τέκνων
Διεύθυνση (Ελλ):	Ηρ. Πολυτεχνείου 34, Γέρακας 15344, Αττική
Διεύθυνση (Γερμ):	Forststr. 144, Stuttgart 70193
Τηλέφωνο:	Ελλάδα: 2106611888 Γερμανία: +4971195899777
Κινητό τηλέφωνο:	Ελλάδα: 6945229715 Γερμανία: +4915254033270
E-mail:	vkarantz@gmx.net

Εκπαίδευση

Ιουν. 1995	Απολυτήριο Λυκείου από το Γενικό Λύκειο Γέρακα Αττικής, με το βαθμό «Άριστα 20,0»
Ιουλ. 1995	Γενικές (Πανελλήνιες) Εισαγωγικές Εξετάσεις (4ος στη σειρά επιτυχίας)
Σεπτ. 1995	Έναρξη σπουδών στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών
Μαρ. 2002	Πτυχίο Ιατρικής. Πρωτεύσας στο έτος αποφοίτησης με το βαθμό «Άριστα» (Μ.Ο. = 8,97)
Νοε 2012	Ιατρική Ειδικότητα Ορθοπαιδικής

Επαγγελματική εμπειρία

Τρέχουσα Θέση Μάιος 2012 –	Facharzt Wirbelsäulenzentrum, Diakonie Klinikum, Stuttgart Γερμανίας (Διευθ: Dr. med. F. Vazifehdan)
Ιουλ. 2011 – Μάιος 2012	Assistenzarzt St. Willibrordspital, Emmerich Γερμανίας (Διευθ: Dr. med. M. Theis)
Ιαν 2007 – Ιουλ. 2011	Ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών – Ρίο (Διευθ: Καθ. Η. Παναγιωτόπουλος)

Ιουν 2006 – Νοε 2006	Τμήμα Διεγχειρητικής Νευροφυσιολογικής Παρακολούθησης, εταιρεία MART
Οκτ. 2005 – Απρ. 2006	Εσωτερικός βοηθός στην Α' Ορθοπαιδική του 251 Γεν. Νοσοκομείου Αεροπορίας (Διευθ. Ασμχος Δρ. Δ. Μπούρλος)
Νοε. 2003 – Σεπ. 2004	Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής στη Χειρουργική Κλινική του Γεν. Νοσοκομείου Παίδων Πεντέλης (Διευθ. Δρ. Γ. Βάος)
Ιουλ. 2002 – Ιουλ. 2003	Υπηρεσία Υπαίθρου στο Π. Ι. Αγ. Λαυρεντίου Μαγνησίας
Απρ. 2002 – Ιουλ. 2002	Τρίμηνη Άσκηση στο Παθολογικό, Καρδιολογικό και Χειρουργικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Βόλου «Αχιλλοπούλειο»

Λοιπή κλινική εμπειρία

Νοε 2009	Visiting fellow, Spinal Unit, Queen's Medical Centre, Nottingham (Cons. B. Boszczyk)
Νοε 2004 – Μαί. 2005	Εθελοντική εργασία στο Ανοιχτό Πολυϊατρείο της μη κυβερνητικής οργάνωσης «Γιατροί του Κόσμου»
Οκτ. – Νοε. 2004	Hospitant, Orthopädische Klinik, Johanna-Etienne Krankenhaus, Neuss (διευθ.: Prof. Dr. med. J. Jerosch)
Αυγ. 1998	Επισκέπτης φοιτητής Klinik für die Technische Orthopädie und Rehabilitation, Universität Münster, διευθ.: Prof. Dr. Med. H. H. Wetz). Πρόγραμμα clerkship IFMSA - HELMSIC
Αυγ. 2001	Επισκέπτης φοιτητής στην Orthopädische Klinik, Universität Würzburg (διευθ.: Prof. Dr. Med. J. Eulert). Πρόγραμμα clerkship IFMSA - HELMSIC
Ιουλ. – Αυγ. 1997	Εθελοντική άσκηση στα Εξωτερικά Ιατρεία και ΤΕΠ στο Γεν. Νομαρχιακό Νοσοκομείο Κω.

Διακρίσεις - Υποτροφίες

1995	Υποτροφία ΙΚΥ για την επίδοση στις Εισαγωγικές Εξετάσεις (4 ^{ος} στη σειρά εισαγωγής με την πρώτη φορά)
1995 - 1996	Υποτροφία ΙΚΥ για την επίδοση στο 1 ^ο έτος σπουδών
1996 - 1997	Υποτροφία ΙΚΥ για την επίδοση στο 2 ^ο έτος σπουδών
1998 - 1999	Υποτροφία ΙΚΥ για την επίδοση στο 4 ^ο έτος σπουδών
1995 - 2002	Υποτροφία από το Ίδρυμα «Ιωάννου Σπ. Λάτση», καθ' όλο το διάστημα προπτυχιακών σπουδών

Ξένες Γλώσσες

- Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English (University of Cambridge), βαθμός "A"
- Γερμανικά: Mittelstufenprüfung (Goethe Institut), βαθμός „sehr gut“
- Ισπανικά

Γνώσεις υπολογιστών

- Microsoft Word, Excel, Access, Powerpoint
- Προγραμματισμός Java, Visual Basic, C++ (βασικές γνώσεις)

Δημοσιεύσεις

- **Karantzoulis V.**, Liapi C, Papagelopoulos P . LARGE SCALE BONE MINERAL HISTOMORPHOMETRY - REPORT OF A SIMPLIFIED TECHNIQUE.Histopathology. 2012 61(6):1174-82.
- **Karantzoulis V.**, Papadopoulos J. St. RELIABILITY OF INFORMATION REGARDING ADVERSE REACTIONS IN PACKAGE CIRCULARS. The Pharmacologist. 2002 44(2), Suppl. 1: 32.2

Ανακοινώσεις σε ελληνικές ημερίδες και συνέδρια

- ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΜΕΝΗ ΜΕΤΑΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΡΕΥΣΗ ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ (KUMMEL'S DISEASE): ΜΙΑ ΣΠΑΝΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗ ΟΝΤΟΤΗΤΑ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ
Χ. Γεωργίου, Χ. Ντονάδος, **B. Καραντζούλης**, Π. Ζουμπούλης, Π. Τσαούσης, Χ. Ματζάρογλου.
37^ο Συνέδριο Σπονδυλικής Στήλης. Πύλος, Μάιος 2010
- ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΜΕΝΗ ΜΕΤΑΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΡΕΥΣΗ ΣΠΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ (KUMMEL'S DISEASE): ΜΙΑ ΣΠΑΝΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗ ΟΝΤΟΤΗΤΑ. Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ
Χ. Γεωργίου, Χ. Ντονάδος, **B. Καραντζούλης**, Π. Ζουμπούλης, Π. Τσαούσης, Χ. Ματζάρογλου.
37^ο Συνέδριο Σπονδυλικής Στήλης. Πύλος, Μάιος 2010
- ΚΥΦΟΠΛΑΣΤΙΚΗ ΜΕ ΕΚΠΤΥΣΣΟΜΕΝΟ ΚΛΩΒΟ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (OSSEOFIX)
Α. Χατζηαντωνίου, **B. Καραντζούλης**, Χ. Ματζάρογλου, Π. Δημακόπουλος, Π. Ζουμπούλης
65^ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη, Οκτώβριος 2009
- Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΣΗΠΤΙΚΩΝ ΨΕΥΔΑΡΘΡΩΣΕΩΝ ΚΝΗΜΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΔΟΜΥΕΛΙΚΗ ΗΛΩΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ILIZAROV
B. Καραντζούλης, Η. Παναγιωτόπουλος, Α. Καλλιβωκάς, Ν. Σφήκας, Π. Μέγας, Π. Δημακόπουλος
3^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Διατατικής Ιστογένεσης. Πάτρα, Σεπτέμβριος 2009
- ΠΡΩΤΟ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΟ ΕΞΑΡΘΡΗΜΑ ΩΜΟΥ: ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΗ Ή ΠΡΩΙΜΗ ΑΡΘΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ;
Ε. Αθανασέλης, Α. Χατζηαντωνίου, **B. Καραντζούλης**, Ι. Γκλιάτης, Π. Δημακόπουλος
4^ο Συνέδριο του Τμήματος Ωμου-Αγκώνος της ΕΕΧΟΤ. Αθήνα Ιούνιος 2009
- Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΣΗΠΤΙΚΗΣ ΨΕΥΔΑΡΘΡΩΣΗΣ ΚΝΗΜΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΔΟΜΥΕΛΙΚΗ ΗΛΩΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ILIZAROV.
B. Καραντζούλης, Α. Σαρίδης, Ε. Φωτεινόπουλος, Δ. Τρούσας, Π. Μέγας
64^ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο. Αθήνα, Οκτώβριος 2008
- Η ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΣΣ
Π. Ζουμπούλης, **B. Καραντζούλης**, Ε. Φωτεινόπουλος, Δ. Τρούσας, Π. Δημακόπουλος
64^ο Πανελλήνιο Ορθοπαιδικό Συνέδριο, Αθήνα, Οκτώβριος 2008
- Η ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΣΣ – ΠΡΩΙΜΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Π. Ζουμπούλης, **B. Καραντζούλης**, Ε. Φωτεινόπουλος, Η. Λαμπίρης
1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Σπονδυλικής Στήλης. Αθήνα, Σεπτέμβριος 2007
- Η ΑΝΥΠΑΡΞΙΑ ΣΥΝΕΠΟΥΣ ΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΑΜΕΑ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΛΕΙΣ
Ι. Στ. Παπαδόπουλος, Β. Γιουβρή, **B. Καραντζούλης**.
30^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα Μάιος 2004
- ΠΟΣΟ ΑΣΦΑΛΕΙΣ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΚΑΤΟΙΚΙΕΣ ΤΩΝ ΤΣΙΓΓΑΝΩΝ;
Μ. Παπαναστασίου, Μ. Τσάφου, Α. Λορέντζου, Κ. Ντάλιου, **B. Καραντζούλης**, Β. Γιουβρή, Ι. Στ. Παπαδόπουλος
30^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα Μάιος 2004

- ΠΤΩΣΕΙΣ ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΩΝ : ΣΠΙΤΙ, ΔΡΟΜΟΣ, ΠΕΖΟΔΡΟΜΙΑ
B. Καραντζούλης.
Ιατροκοινωνική Ημερίδα με θέμα «Οι πτώσεις των ηλικιωμένων, ένας παραγνωρισμένος κίνδυνος», Πάτρα, Φεβρουάριος 2004.
- ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΤΥΧΗΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΧΟΛΙΚΑ ΣΥΓΚΡΟΤΗΜΑΤΑ: ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ, ΔΗΜΟΣΙΩΝ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ, ΤΟΠΙΚΗΣ ΑΥΤΟΔΙΟΙΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΠΙΚΗΣ ΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΑΧΑΪΑΣ
Τ. Γρηγόρη, **B. Καραντζούλης**, Σ. Ουρανή, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγωγής Υγείας, Αθήνα Δεκέμβριος 2002
- ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΕΣ ΑΝΩΤΕΡΟΥ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΑΠΟ ΛΗΨΗ ΜΣΑΦ (εισήγηση και poster).
B. Καραντζούλης, Δ. Κρεντήρης, Δ. Πέτρου, Ε. Ζουμπούλη-Βαφειάδη, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
27^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα Μάιος 2001
- ΕΡΕΥΝΑ ΑΝΑΓΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΙΔΙΚΕΣ ΑΝΑΓΚΕΣ
Μ. Στάθη, Τ. Γρηγόρη, **B. Καραντζούλης**, Β. Τσιαβός, Κ. Χαμάκου, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προαγωγής και Αγωγής Υγείας, Αθήνα Δεκέμβριος 1998
- ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΡΟΧΑΙΩΝ ΑΤΥΧΗΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΣΧΟΛΕΙΑ: ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΥΤΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΜΑΘΗΤΩΝ
Κ. Χαμάκου, Τ. Γρηγόρη, **B. Καραντζούλης**, Μ. Στάθη, Β. Τσιαβός, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Προαγωγής και Αγωγής Υγείας, Αθήνα Δεκέμβριος 1998
- ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΑΣΦΑΛΙΣΜΕΝΟΥΣ ΤΟΥ ΟΓΑ ΣΤΟ ΝΟΜΟ ΤΡΙΚΑΛΩΝ.
Ε. Βαλκανιώτη, **B. Καραντζούλης**, Χ. Λιάπη, Γ. Παπαδόπουλος, Ι. Στ. Παπαδόπουλος
6^ο Συμπόσιο Φυσιολογικής και Φυσιοθεραπείας, Αργοστόλι Σεπτέμβριος 1998
- ΕΡΕΥΝΑ ΑΝΑΓΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ
Μ. Στάθη, Τ. Γρηγόρη, **B. Καραντζούλης**, Β. Τσιαβός, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
6^ο Συμπόσιο Φυσιολογικής και Φυσιοθεραπείας, Αργοστόλι Σεπτέμβριος 1998
- ΤΡΟΧΑΙΑ ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ: ΠΡΟΤΑΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΕ ΤΟΠΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΩΝ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΩΝ (εισήγηση και poster)
Δ. Κρεντήρης, **B. Καραντζούλης**, Ν. Τζανακάκης, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
24^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα Μάιος 1998
- ΕΛΛΕΙΨΕΙΣ ΣΟΒΑΡΩΝ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΕΝΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΙΣ ΕΣΩΚΛΕΙΣΤΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ
Π. Αντωνοπούλου, Σ. Αντωνοπούλου, Ν. Δημητρός, Ν. Καραγιαννάκος, **B. Καραντζούλης**, Π. Κατσουλιέρη, Β. Κυρίμη, Σ. Κοντού, Π. Ξυλαρδιστός, Π. Παυλάκης, Μ. Στάθη, Κ. Στιβακτάκης. Ε. Φραγκιαδάκη, Χ. Λιάπη, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
24^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα Μάιος 1998
- ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΕΠΗΡΕΑΣΟΥΝ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΔΗΓΗΣΗΣ.
B. Καραντζούλης, Τ. Γρηγόρη, Μ. Στάθη, Β. Τσιαβός, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
24^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα Μάιος 1998
- ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΡΑΓΜΟΙ.
Τ. Γρηγόρη, **B. Καραντζούλης**, Μ. Στάθη, Β. Τσιαβός.
1^ο Πανελλαδικό Ιατροκοινωνικό Συνέδριο του Πανελληνίου Συνδέσμου Παραπληγικών & Κινητικά Αναπήρων, Αθήνα Οκτώβριος 1997

Ανακοινώσεις σε διεθνείς ημερίδες και συνέδρια

- RELIABILITY OF INFORMATION REGARDING ADVERSE REACTIONS IN PACKAGE CIRCULARS (poster).
V. Karantzoulis, J. St. Papadopoulos
14th World Congress of Pharmacology, San Francisco, July 2002 (Abstract No 32.2 in: The Pharmacologist, Vol 44, No2 Supplement 1, 2002)
- DOCUMENTATION OF DISCREPANCIES CONCERNING ADVERSE REACTIONS IN EUROPEAN CIRCULARS
V. Karantzoulis, J. St. Papadopoulos.
Meeting of G10 Group (High Level Group on innovation and provision of medicines – EUROPEAN COMMISSION). Theme of the meeting: “Information to Consumers”, Luxemburg, December 2001 (Η ομιλία δημοσιεύτηκε στο: Activity Report 1999-2002 of Pharmaceutical Expert Group of *Association International de la Mutualite (AIM)*, Brussels 2002)
- TRAFFIC ACCIDENTS IN GREECE BEYOND NUMBERS
J. Papadopoulos, **V. Karantzoulis**
43th Annual Meeting of the International Spinal Cord Society (ISCoS), Athens, September 2004

Μελέτες – Εισηγήσεις

- ΜΕΛΕΤΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΣΤΟ ΑΙΓΙΟ (2007)
Η Παναγιωτόπουλος, Μ. Σταυρόπουλος, Ν. Στεφανόπουλος, **Β. Καραντζούλης**, Γ. Μαρκοπούλου, Μ. Τζαμούλια, Θ. Λουλούδης
Μελέτη που ανατέθηκε στην παραπάνω ομάδα εργασίας από τη Διεύθυνση Υγειονομικής Περιφέρειας (ΔΥΠΕ) Δυτ. Ελλάδας
- ΕΚΘΕΣΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΣΧΟΛΙΚΩΝ ΣΥΓΚΡΟΤΗΜΑΤΩΝ ΑΙΓΙΟΥ-ΠΑΤΡΑΣ (2001)
Ι. Στ. Παπαδόπουλος, Τ. Γρηγόρη, **Β. Καραντζούλης**, Σ. Ουρανή.
Σε συνεργασία με την Τοπική Αυτοδιοίκηση και τη Δ/ση Β'βάθμιας Εκπαίδευσης του Νομού Αχαΐας
- ΤΡΙΜΗΝΗ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΤΥΧΗΜΑΤΩΝ ΠΑΙΔΩΝ ΣΕ ΤΡΙΑ ΜΕΓΑΛΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ (1999)
Β. Καραντζούλης, Γ. Σύρος, Θ. Τασούλης, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από αίτημα του Κέντρου Παιδικού Τραύματος για την αδρή εκτίμηση του φόρτου εφημερίας των νοσοκομείων που αντιμετωπίζουν παιδικά ατυχήματα
- ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΤΑΜΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ ΤΗΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ (1999)
Β. Καραντζούλης, Μ. Στάθη, Κ. Χαμάκου, Γ. Σύρος, Τ. Γρηγόρη, Ε. Φραγκιαδάκη, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
Ποσοτική και ποιοτική μελέτη φαρμακοκατανάλωσης μετά από αίτημα του ΤΥΠΑΤΕ, με σκοπό την ποιοτική βελτίωση της φαρμακοθεραπείας των ασφαλισμένων του

- ΤΡΟΧΑΙΑ ΑΤΥΧΗΜΑΤΑ: ΠΡΟΤΑΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΕ ΤΟΠΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΩΝ ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΩΝ (1998)
Β. Καραντζούλης, Δ. Κρεντήρης, Ν. Τζανακάκης, Ι. Στ. Παπαδόπουλος.
Παράδειγμα εφαρμοσμένης πρόληψης ατυχημάτων σε τμήμα Εθνικής Οδού Θηβών-Λειβαδιάς. Γνωστοποιήθηκε στις τοπικές αστυνομικές αρχές.
- ΜΙΚΡΗ ΕΚΘΕΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΗΜΕΙΩΝ ΠΡΟΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΟ ΓΗΡΟΚΟΜΕΙΟ ΤΗΣ ΚΩ (1997)
Β. Καραντζούλης.
Αφορά προτάσεις χωροταξικής βελτίωσης του γηροκομείου, όπου φιλοξενήθηκα για 1 μήνα το καλοκαίρι 1997. Γνωστοποιήθηκε στις αρμόδιες αρχές του νησιού.

Συμμετοχή στη συγγραφή βιβλίων

- ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΟΔΗΓΗΣΗ. Εκδ. ΤΥΠΑΤΕ, Αθήνα 2001.
Ι. Στ. Παπαδόπουλος, Χ. Λιάπη, **Β. Καραντζούλης**, Στάθη Μ., Τ. Γρηγόρη, Β. Τσιαβός
- ΕΘΝΙΚΟ ΣΥΝΤΑΓΟΛΟΓΙΟ, ΚΕΦ. «ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΟΔΗΓΗΣΗ». Εκδ. ΕΟΦ, Αθήνα 2000 & 2003.
Συμμετείχα στη σύνταξη του κεφαλαίου υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθ. Φαρμακολογίας Παν. Αθηνών Ι. Στ. Παπαδόπουλου. Αποτελεί μια πρακτική περίληψη της ευρύτερης μελέτης που διεξήγαγε η ομάδα εργασίας σχετικά με την επίδραση φαρμάκων στην ικανότητα οδήγησης (βλ. άνω)
- ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΗ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΑ ΣΧΟΛΕΙΑ. Εκδ. ΤΙΤΑΝ, Αθήνα 2002.
Ι. Στ. Παπαδόπουλος, **Β. Καραντζούλης**, Τ. Γρηγόρη, Σ. Ουρανή
Πρακτικός οδηγός εφαρμόσιμης πρόληψης. Αποτελεί τη «φυσική» συνέχεια της έκθεσης για την ασφάλεια των σχολείων (βλ. παρακάτω). Το βιβλίο τιμήθηκε με επίσημη παρουσίαση από τον Πρύτανη του Παν. Αθηνών Καθ. Γ. Μπαμπινιώτη, τον Αντιπρύτανη Καθ. Α. Κουσελίνη καθώς και τον Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής Καθ. Χ. Κίττα (Μάρτιος 2002)
- ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΗ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΑ ΣΧΟΛΕΙΑ. 2η Έκδοση, Εκδ. ΤΙΤΑΝ, Αθήνα 2005.
Ι. Στ. Παπαδόπουλος, Τ. Γρηγόρη, **Β. Καραντζούλης**, Δ. Κρεντήρης, Α. Χαμάκου, Α. Βερυκοκάκη

Μεταφράσεις Ιατρικών βιβλίων

- ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ. Εκδ. Παρισιάνου, Αθήνα 2007
M. J. Mycek, R. A. Harvey, P. C. Champe: Pharmacology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997
Κύριος μεταφραστής, από την Αγγλική γλώσσα
- ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, Εκδ. Παρισιάνου 2005
G. Fülgraff, D. Palm: Pharmakotherapie – Klinische Pharmakologie, 10. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München 2001
Κεφάλαια 6, 32-34, από τη Γερμανική γλώσσα

- ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΟΔΗΓΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, Εκδ. Πασχαλίδη 2005
J. Braun, A. Dormann: Klinikleitfaden Innere Medizin, 8. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München 2001
Κύριος μεταφραστής, από τη Γερμανική γλώσσα
- DAVIDSON'S ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, Εκδ. Παρισιάνου 2005
C. Haslett, E.R. Chilvers, N.A. Boon, N.R. Colledge— Davidson's Principles and Practice of Medicine. Churchill Livingstone, London 2003
Κεφάλαια 1, 20, από την Αγγλική γλώσσα
- ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ. Εκδ. Μαραθιά, Αθήνα 1998
E. H. Ackernecht - A. H. Murken: Geschichte der Medizin, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1992
Κεφάλαια 20-22, από τη Γερμανική γλώσσα
- ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ. Εκδ. Παρισιάνου, Αθήνα 1998
M. J. Mycek, R. A. Harvey, P. C. Champe: Pharmacology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997
Κεφάλαιο 20, από την Αγγλική γλώσσα

Συμμετοχή στη διοργάνωση συνεδρίων – ημερίδων

- 2^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, Αθήνα, Φεβρουάριος 2002
Το επίσημο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακολογίας
- Η ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΕ ΑΣΦΑΛΙΣΤΙΚΑ ΤΑΜΕΙΑ ΥΓΕΙΑΣ, Αθήνα, Νοέμβριος 2001
Η 4^η ιατρική ημερίδα της Ομοσπονδίας Αυτοασφαλιζόμενων Ταμείων Υγείας Ελλάδος (ΟΑΤΥΕ)
- ΣΥΖΗΤΩΝΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ «ΥΓΕΙΑ», Ιατρική Σχολή Αθηνών, Μάιος 2001
Φοιτητική ημερίδα με θέματα προβληματισμού σχετικά με τη Δημόσια Υγεία
- 1^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, Αθήνα, Φεβρουάριος 2000
Το επίσημο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακολογίας
- ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΓΙΑ «ΑΓΝΩΣΤΕΣ» ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΕΣ, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Μάιος 1999
Φοιτητική Ημερίδα,
Ενημερωτική ημερίδα, με προσκεκλημένους ομιλητές ειδικευμένους ιατρούς όπως ιατρούς εργασίας, φυσιάτρους, παιδοψυχιάτρους κ.α.
- ΑΝΑΠΗΡΙΚΟ ΑΜΑΞΙΔΙΟ: ΕΠΙΛΟΓΗ – ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ – ΡΥΘΜΙΣΕΙΣ, Αθήνα Νοέμβριος 1999
Ημερίδα σχετικά με την ορθή συνταγογράφηση/χρήση του αναπηρικού αμαξιδίου, με προσκεκλημένους ομιλητές φυσιάτρους, τεχνικούς κ.α.
- ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ ΠΡΟΣΒΑΣΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΑ ΑΝΑΠΗΡΩΝ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΖΟΔΡΟΜΙΑ ΚΑΙ ΚΤΙΡΙΑ, Αθήνα Μάιος 1997
Ημερίδα για την νομική προστασία των Ατόμων με Ειδικές Ανάγκες, Ερευνητικός Όμιλος Φοιτητών Νομικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	20
1. ΣΤΕΡΕΟΛΟΓΙΑ – ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ – ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑ (ΟΡΙΣΜΟΙ).....	21
1.1 ΣΤΕΡΕΟΛΟΓΙΑ	21
ΟΡΙΣΜΟΣ	21
1.2 ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ.....	22
ΟΡΙΣΜΟΣ	22
1.3 ΟΣΤΙΚΗ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ.....	22
ΟΡΙΣΜΟΣ	22
ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΗΛΩΝ ΠΛΑΚΩΝ	22
1.4 ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑ	24
ΟΡΙΣΜΟΣ	24
1) ΕΓΚΙΒΩΤΙΣΜΟΣ	26
2) ΚΟΠΗ.....	27
3) ΛΕΙΑΝΣΗ.....	27
4) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ	29
2. Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ	30
2.1 ΙΣΤΟΡΙΑ	30
2.2 ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	31
2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΕΡΛΕΠΤΩΝ ΛΕΙΑΣΜΑΤΩΝ	32
2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΛΕΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΟΚΙΜΙΩΝ.....	34
3. ΆΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΗ ΑΦΑΛΑΤΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ	35
3.1 ΛΕΠΤΕΣ ΤΟΜΕΣ ΜΗ ΑΦΑΛΑΤΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ	36
Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα.....	36
3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ	37
Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα.....	37
3.3 ΜΙΚΡΟ-ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ (microCT)	38
Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα.....	39
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
1. ΣΤΟΧΟΣ	42
2. ΥΛΙΚΟ	42
3. Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΗ ΑΦΑΛΑΤΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ	43
3.1 ΚΟΠΗ.....	43
3.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ.....	48
3.3 ΕΓΚΙΒΩΤΙΣΜΟΣ.....	51
3.4 ΛΕΙΑΝΣΗ	53
3.5 ΧΡΩΣΗ.....	57
3.6 ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗ	59
3.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ	60
3.7.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ImageJ	60
3.7.2 ΠΡΟΣΘΕΤΟ ImageJ “Map_BoneMicrostructure”	64
3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΝΑΝΤΙ	
ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΜΕ MicroCT	72
4. ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	75

4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΜΗ-ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΩΝ ΚΕΦΑΛΩΝ ΜΗΡΙΑΙΟΥ	75
4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	75
4.2.1 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΗΣ ΚΕΦΑΛΗΣ (ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ)	76
4.2.2 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΜΗ-ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΗΣ ΚΕΦΑΛΗΣ (ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ).....	77
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	78
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΘΙΕΡΩΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	81
ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	84
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	84
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	85
SUMMARY	86
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΠΡΟΣΘΕΤΟ ImageJ Map_BoneMicrostructure	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	110

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται μια καινούργια μεθοδολογία μελέτης της μικροαρχιτεκτονικής των οστών, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική φιλοσοφία της υλικογραφίας και εφαρμόζει τις αρχές της στερεολογίας στην οστική ιστομορφομετρία.

Έναυσμα για την ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας ήταν η διαπίστωση ότι οι τρέχουσες τεχνικές μελέτης της μικροαρχιτεκτονικής μη αφαλατωμένων οστικών δειγμάτων είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και εν πολλοίς απρόσιτες στο μέσο ερευνητή. Η οστική ιστομορφομετρία θεωρείται ως «προνόμιο» εξειδικευμένων κέντρων μελέτης των οστών. Κατά συνέπεια η μορφολογική μελέτη του οστίτη ιστού σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις παραμένει δυσανάλογα μικρή συγκριτικά με το διαθέσιμο όγκο των οστικών δειγμάτων (π.χ. εκατοντάδες χιλιάδες αρθροπλαστικές ισχίου και γόνατος ετησίως σε παγκόσμια βάση).

Στο γενικό μέρος της διατριβής ορίζονται οι παραπάνω έννοιες (στερεολογία, ιστομορφομετρία, στερεολογία) και ανασκοπούνται οι τρέχουσες μέθοδοι μελέτης μη αφαλατωμένων οστικών δειγμάτων.

Στο ειδικό μέρος γίνεται αναλυτική περιγραφή των σταδίων της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Στο Παράρτημα παρατίθεται ο κώδικας Java του λογισμικού Map_BoneMicrostructure το οποίο αναπτύχθηκε για την ανάλυση εικόνας και εξαγωγή ποσοτικών μετρήσεων από τις διατομές.

Η διατριβή εκπονήθηκε εν μέρει στους χώρους του Εργαστηρίου Πειραματικής Φαρμακολογίας, όπου ο διατρίβων είχε μακροχρόνια παρουσία ως φοιτητής, και εν μέρει σε χώρο που διέθεσε το Εργαστήριο Ανατομίας του Πανεπιστημίου Πατρών κατά το διάστημα που ο διατρίβων ήταν ειδικευόμενος Ορθοπαιδικής στην Ορθοπαιδικής Κλινική του ΠΓΝΠ.

1. ΣΤΕΡΕΟΛΟΓΙΑ – ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ – ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑ (ΟΡΙΣΜΟΙ)

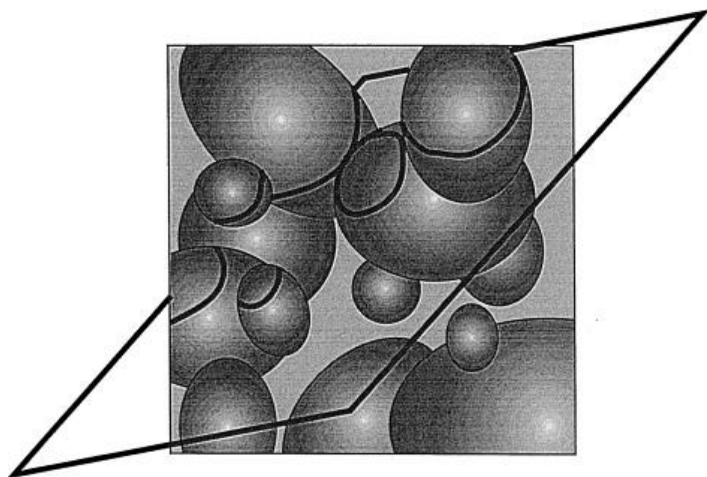
1.1 ΣΤΕΡΕΟΛΟΓΙΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως στερεολογία (stereology) ορίζεται η επιστήμη των γεωμετρικών σχέσεων μεταξύ μιας τρισδιάστατης δομής και των δισδιάστατων εικόνων που προκύπτουν από τυχαίες/αντιπροσωπευτικές διατομές αυτής της δομής. Εναλλακτικός ορισμός είναι η τρισδιάστατη ερμηνεία δισδιάστατων διατομών.

Περιλαμβάνει την πραγματοποίηση ποσοτικών μετρήσεων σε εικόνες διατομής ενός στερεού υλικού, και την εξαγωγή τρισδιάστατων συμπερασμάτων βάσει μαθηματικών μοντέλων. Έτσι για παράδειγμα μπορούμε να υπολογίσουμε την επιφάνεια των πόρων ανά μονάδα όγκου σε ένα πορώδες υλικό, μετρώντας σε δισδιάστατες διατομές τη συνολική περίμετρο των πόρων και πολλαπλασιάζοντας με τον παράγοντα $4/\pi$.

(Εικόνα 1)



Εικόνα 1 Η αρχή της στερεολογίας: εξαγωγή συμπερασμάτων για την τρισδιάστατη δομή στερεών υλικών από τη μελέτη τυχαίων διατομών.

1.2 ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως ιστομορφομετρία (histomorphometry) ορίζεται ως η εξαγωγή ποσοτικών μετρήσεων από εικόνες μικροσκόπησης ιστών. Τυπικά περιλαμβάνει το καθορισμό επιλεγμένων γεωμετρικών περιοχών σε μια ιστολογική εικόνα (σημεία, μήκη, επιφάνειες) και εν συνεχεία πραγματοποίηση μαθηματικών υπολογισμών βάσει αυτών.

Η εφαρμογή της στερεολογίας στους ιστούς έχει δώσει για παράδειγμα τα συμπεράσματα ότι η συνολική επιφάνεια των κυψελίδων είναι ένα γήπεδο τέννις $75\mu^2$ (= [συνολική περίμετρος κυψελίδων ανά μονάδα επιφάνειας ιστολογικής τομής] x $[4/\pi]$ x [μέσος όγκος πνευμόνων]), ή ότι το συνολικό μήκος των αγγείων του σώματος είναι 100,000 χλμ ([πλήθος αγγειακών διατομών ανά μονάδα επιφάνειας ιστολογικής τομής] x $[2]$ x [μέσος όγκος σώματος]).

1.3 ΟΣΤΙΚΗ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως οστική ιστομορφομετρία ορίζεται η ποσοτική εξέταση της μικροαρχιτεκτονικής, ανακατασκευής και μεταβολισμού των οστών. Πρόκειται για την εφαρμογή της στερεολογίας στην ιστολογία των οστών.

ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΩΝ ΠΑΡΑΛΛΗΛΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Η ιστορία της σύγχρονης οστικής ιστομορφομετρίας ξεκινάει στις αρχές της δεκαετίας του 1980, όταν ο Parfitt et al, 1983¹ πρότειναν το γεωμετρικό μοντέλο των παράλληλων πλακών (parallel plates model) για την αρχιτεκτονική των οστικών δοκίδων, και με βάση αυτό περιέγραψαν την εξαγωγή συμπερασμάτων για την τρισδιάστατη οστική δομή από μετρήσεις σε δισδιάστατες διατομές.

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, σε μια ιστολογική τομή μη αφαλατωμένου οστού πραγματοποιούνται ορισμένες πρωτογενείς μετρήσεις όπως π.χ. η συνολική επιφάνεια

και η συνολική περίμετρος των οστικών δοκίδων της διατομής, και στη συνέχεια υπολογίζονται μαθηματικά διάφορες τρισδιάστατες παράμετροι της οστικής μικροαρχιτεκτονικής.

Ακολουθεί μια επιγραμματική παρουσίαση των σημαντικότερων παραμέτρων αυτών, σύμφωνα με την καθιερωμένη ορολογία και συντημήσεις της American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR)^{2,3}:

B.Ar μm^2 (bone area):	εμβαδόν που καταλαμβάνεται από το σύνολο των οστεοδοκίδων (στη διατομή)
T.Ar μm^2 (tissue area):	συνολικό εμβαδόν του ιστού (δηλ. το εμβαδό του οπτικού πεδίου)
B.Pm μm (bone perimeter)	περίμετρος του συνόλου των οστεοδοκίδων (στη διατομή)
BV/TV % (bone volume/total volume)	ποσοστό όγκου ιστού που καταλαμβάνεται από οστεοδοκίδες
Tb.Th. μm (trabecular thickness)	μέσο πάχος οστεοδοκίδων
Tb.Sp. μm (trabecular spacing)	μέση απόσταση μεταξύ οστεοδοκίδων
Tb.N. mm^{-1} (trabecular number)	μέσο πλήθος δοκίδων ανά mm

Οι παραπάνω παράμετροι συνδέονται μεταξύ τους με τις εξής μαθηματικές σχέσεις:

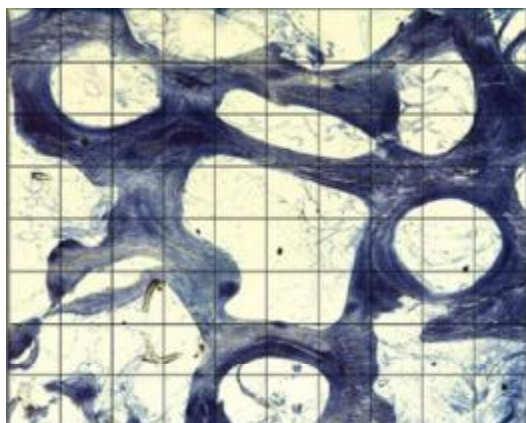
$$BV / TV = \frac{B.Ar.}{T.Ar.}$$

$$Tb.Th. = 2 \times \frac{B.Ar.}{B.Pm.}$$

$$Tb.Sp. = 2 \times \frac{(T.Ar. - B.Ar.)}{B.Pm.}$$

$$B.Pm. = 2 \times (Tb.N. \times T.Ar.)$$

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι εάν μετρηθούν πρωτογενώς 3 παράμετροι, μπορούν να υπολογιστούν όλες οι υπόλοιπες. Οι πρωτογενείς μετρήσεις της οστικής ιστομορφομετρίας αρχικά πραγματοποιούνταν χειροκίνητα, χρησιμοποιώντας κατά τη μικροσκόπηση ένα επιφάκιο πλέγμα (eyepiece) το οποίο διαιρούσε το οπτικό πεδίο σε μικρότερα τετράγωνα (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2 Τυπικό οπτικό πεδίο μικροσκόπησης μη αφαλατωμένου οστικού δείγματος με επιπροβαλλόμενο επιφάκιο πλέγμα. (από Vidal et al, 2012⁴)

Το B.Ar. (bone area) υπολογιζόταν σε κάθε τετραγωνάκι χωριστά, εντός του οποίου η ακανόνιστη οστική δοκίδα αποκτούσε ένα κατά προσέγγιση απλό γεωμετρικό σχήμα (τρίγωνο, ρόμβο κλπ.). Το Tb.N (trabecular number - μέσο πλήθος δοκίδων) υπολογιζόταν μετρώντας πόσες δοκίδες έτεμναν οι κάθετες και οριζόντιες γραμμές. Η B.Pm (bone perimeter) υπολογιζόταν βάσει το τύπου: $B.Pm = 2 \times Tb.N \times T.Ar$. Από τις παραπάνω πρωτογενείς μετρήσεις προέκυπταν μαθηματικά οι υπόλοιπες παράμετροι της οστικής ιστομορφομετρίας.

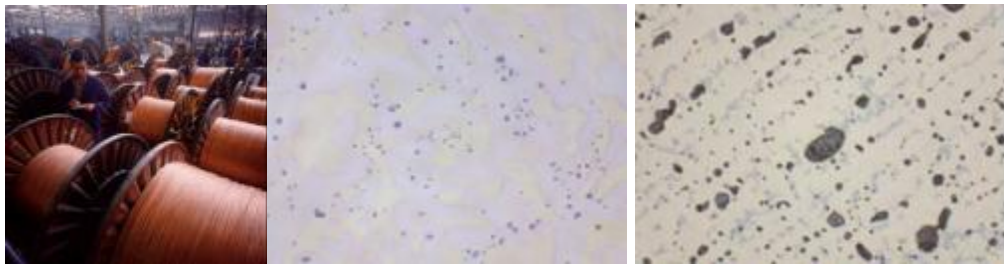
1.4 ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ

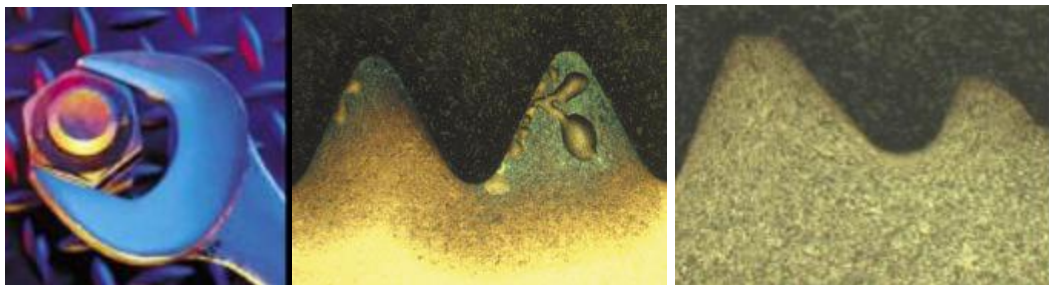
Ως υλικογραφία (materialography) ορίζεται η μεθοδολογία της παρασκευής επιφανειών από ένα στερεό υλικό κατάλληλων για ανάλυση, μέσω των διαδικασιών κοπής, λείανσης και στίλβωσης. Ιστορικά η μέθοδος πρωτοχρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των μετάλλων, και ως εκ τούτου η πρώτη σχετική ορολογία ήταν **μεταλλογραφία (Εικόνες 3,4,5)**. Ωστόσο, η χρήση των αρχών της μεθόδου επεκτάθηκε και σε άλλα στερεά υλικά π.χ. ορυκτά (**Εικόνα 6**), πλαστικά υλικά (**Εικόνα 7**). Η λέξη «υλικογραφία» επινοήθηκε αργότερα ως γενικός όρος των επιμέρους εφαρμογών της (μεταλλογραφία, πετρογραφία, πλαστικογραφία)



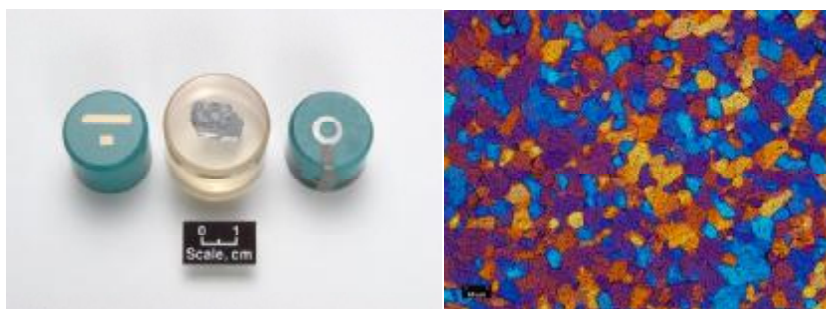
Εικόνα 3 Παράδειγμα μεταλλογραφικής μελέτης της ποιότητας ηλεκτροσυγκόλλησης μετάλλων στη βιομηχανία. Αριστερά μια ιδανική ηλεκτροσυγκόλληση. Στη δεξιά εικόνα ελαττωματική συγκόλληση: παρουσία αλλοιωμένης μεταλλικής μάζας στην ένωση και εγκλείστων αέρος.



Εικόνα 4 Παράδειγμα μεταλλογραφικής μελέτης της κατανομής προσμίξεων μολύβδου σε σύρματα χαλκού.



Εικόνα 5 Παράδειγμα μελέτης της καταπόνησης του σπειράματος βιδών.



Εικόνα 6 Παράδειγμα υλικογραφικής μελέτης στην ορυκτολογία (πετρογραφία), όπου με ειδικές χρώσεις αναδεικνύονται τα διάφορα επιμέρους στοιχεία ενός ορυκτού.



Εικόνα 7 Παράδειγμα υλικογραφικής μελέτης μιας ελαττωματικής παρτίδας μικροηλεκτρονικών chip (πλαστικογραφία), όπου αναδεικνύεται η ύπαρξη μικροσκοπικών ρωγμών στις αγωγίμες συνδέσεις μεταξύ των χάλκινων στοιχείων.

Η στερεολογία είναι επομένως μια θεωρητική-μαθηματική επιστήμη, ενώ η υλικογραφία είναι μια εφαρμοσμένη μεθοδολογία παρασκευής δισδιάστατων εικόνων από στερεά υλικά για την ποιοτική παρατήρηση ή για ποσοτική στερεολογική ανάλυση.

Τα στάδια της υλικογραφίας περιλαμβάνουν:

- 1) Εγκιβωτισμός
- 2) Κοπή
- 3) Λείανση
- 4) Επεξεργασία της επιφάνειας

1) ΕΓΚΙΒΩΤΙΣΜΟΣ

Το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας είναι ο εγκιβωτισμός του δείγματος σε ένα σκληρό πλαστικό υλικό τυποποιημένου, εργονομικού σχήματος και σκληρότητας, ώστε να διευκολύνεται η μετέπειτα διαδικασία της κοπής και λείανσης.

Ως υλικά εγκιβωτισμού έχει χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία πλαστικών πολυμερών: ακρυλικές ρητίνες, πολυ-μεθυλ-μεθακρυλικές ρητίνες (MMA), εποξεικές-ρητίνες, μελαμίνη, βακελίτης κ.α. Η διαδικασία πολυμερισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμό ή ψυχρό περιβάλλον, υπό πίεση ή υπό κενό ή σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα ανάλογα με το υλικό εγκιβωτισμού (**Εικόνα 8**). Κάθε υλικό διαθέτει ειδικά χαρακτηριστικά σκληρότητας, ρίκνωσης, προσκόλλησης. Το υλικό εγκιβωτισμού επιλέγεται ώστε να προσομοιάζει τη σύσταση του δείγματος, με σκοπό να αποφεύγονται κατά το δυνατόν διατμητικές παραμορφώσεις (συμπίεση του μαλακότερου υλικού από το σκληρότερο).



Εικόνα 8. Παράδειγμα συσκευής θερμού εγκιβωτισμού υπό πίεση (αριστερά), συσκευής εγκιβωτισμού υπό κενό αέρος (δεξιά).

2) ΚΟΠΗ

Μετά τον εγκιβωτισμό του δείγματος, ακολουθεί η κατά το δυνατόν ατραυματική κοπή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται πριονοκορδέλλες με λεπτή οδόντωση, ή αδαμαντοτροχοί για πιο ευαίσθητα υλικά (**Εικόνα 9**), κατά κανόνα υπό διαρκή έκπλυση προκειμένου να μειώνεται η θερμική αλλοίωση του δείγματος.

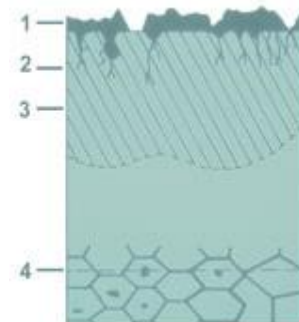


Εικόνα 9 Παράδειγμα σύγχρονης συσκευής κοπής ακριβείας για υλικογραφικές εφαρμογές. Στη δεξιά εικόνα διάφορα βοηθήματα στερέωσης, ανάλογα με τις γεωμετρικές ιδιαιτερότητες του κάθε δείγματος.

3) ΛΕΙΑΝΣΗ

Μετά τη διαδικασία της κοπής προκύπτει μια αδρή επιφάνεια, η οποία εμπεριέχει ρωγμές και παραμόρφωση από το εργαλείο κοπής. Μια επιστημονικά αξιοποιήσιμη επεξεργασία μπορεί ωστόσο να πραγματοποιηθεί μόνο σε βάθος υλικού άθικτου από τις μηχανικές ή θερμικές επιδράσεις (**Εικόνα 10**). Αυτό πραγματοποιείται με τη διαδοχική λείανση της επιφάνειας με λειαντικά χαρτιά σταδιακά μειούμενου κόκκου, έως το κατάλληλο άθικτο βάθος.

Εικόνα 10 Σχηματική παράσταση της συμπεριφοράς ενός σκληρού υλικού μετά την κοπή. Η ζώνη 1 είναι η ανώμαλη επιφάνεια που προκύπτει από τις οδοντώσεις του τροχού ή της κορδέλλας κοπής. Η Ζώνη 2 είναι η επέκταση των ρωγμών εντός της μάζας, και Ζώνη 3 η περιοχή της πλαστικής/θερμικής παραμόρφωσης. Η Ζώνη 4 είναι η επιστημονικά αξιοποιήσιμη άθικτη μάζα, η οποία πρέπει να προσπελαστεί με τη διαδικασία της λείανσης.

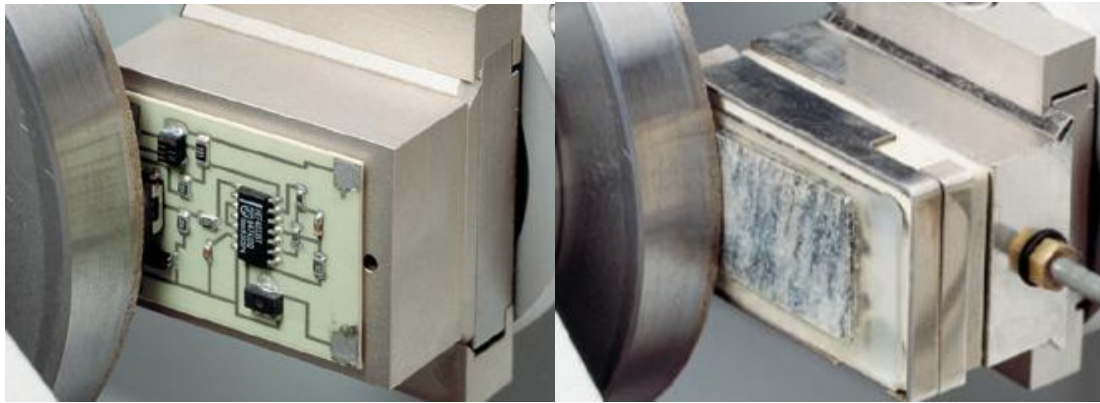


Το συνηθέστερο υλικό λείανσης είναι χαρτιά με κόκκους από καρβίδιο του πυριτίου (SiC). Για επεξεργασία πολύ μεγάλης ακρίβειας ιδίως στη μεταλλογραφία, όπου π.χ. αναζητείται η αποκάλυψη λεπτότατων πόρων, χρησιμοποιούνται διαμαντόχαρτα. Το δείγμα λειάνεται με σταδιακά λεπτότερους κόκκους. Η διαδικασία της λείανσης ολοκληρώνεται με τη «στίλβωση», δηλ. με τη χρήση υφασμάτων που ομαλοποιούν τις ελάχιστες γρατσουνιές της διαδικασίας της λείανσης.

Η διαδικασία της λείανσης μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο αυτοματοποιημένα όσο και χειροκίνητα. Με τις σύγχρονες συσκευές λείανσης, μπορούν να επιτευχθούν λεπτά πάχη δείγματος έως 10μm, τα οποία προσκολλημένα σε αντικειμενοφόρο πλάκα είναι κατάλληλα για οπτική μικροσκόπηση (**Εικόνες 11,12**, βλέπε παρακάτω βιολογικές εφαρμογές της υλικογραφίας)



Εικόνα 11 Παράδειγμα τυπικής συσκευής λείανσης, όπου ρυθμίζονται οι στροφές ανά λεπτό και η δύναμη πίεσης επί της λειαντικής πλάκας. Η λείανση πραγματοποιείται υπό συνεχή έκπλυση. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί λείανση και χειροκίνητα επί περιστρεφόμενου λειαντικού χαρτιού.



Εικόνα 12 Παράδειγμα συσκευής λείανσης μεγαλύτερης ακριβείας, όπου ρυθμίζεται ακριβώς το πάχος της λείανσης (βήμα έως 5μm).

4) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ

Η λεία επιφάνεια που προκύπτει μετά το στάδιο της λείανσης μπορεί εν συνεχεία να μελετηθεί με μία από τις παρακάτω μεθόδους:

- Χημική προσβολή ενός μεταλλικού δοκιμίου με διαβρωτικές ουσίες προς ανάδειξη των διαφορετικών φάσεων στην οπτική μικροσκόπηση
- Χρώση με χρωστικές ουσίες και οπτική μικροσκόπηση, είτε άμεσα επί της επιφάνειας, είτε σε αντικειμενοφόρο πλάκα (πολύ λεπτές τομές)
- Μικροσκόπηση σε πολωμένο φως (υλικά με μη κυβικές κρυσταλλικές δομές)
- Ηλεκτρονική μικροσκόπηση σάρωσης
- Φασματογραφία

2. Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

2.1 ΙΣΤΟΡΙΑ

Η εφαρμογή των αρχών της υλικογραφίας στις βιολογικές επιστήμες χρονολογείται από τις αρχές της δεκαετίας του 1980⁵. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει δυστυχώς μια καθιερωμένη ενιαία ορολογία για την τεχνική. Κατά κανόνα συναντώνται διάφορες περιγραφικές ορολογίες, όπως «sawing-grinding^{5,37,27}», «cutting-grinding^{6,18,25,26,47,21,22}», «(ultr)thin-grinding⁷», «micro-grinding⁴¹», «surface-stained block grinding^{44,45}», «cutting-polishing^{11,29}», «grounding-polishing» «fine-polishing technique³⁰» «ground-sections^{9,32, 33,17}». Η αναφορά στη βιβλιογραφία του όρου «υλικογραφία – materiallography» είναι σχετικά πρόσφατη (2005⁸). Ο λόγος είναι ενδεχομένως ότι ιστορικά προηγήθηκε ως ορολογία η λέξη «μεταλλογραφία», ενώ ο γενικευμένος όρος «υλικογραφία» εισήχθη αργότερα, όταν η μεθοδολογία επεκτάθηκε και σε άλλα υλικά.

Στην παρούσα διατριβή αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ο όρος υλικογραφία, διότι με μία ετυμολογικά εύστοχη λέξη εκφράζεται η μητρική μεθοδολογική αρχή από την οποία προκύπτουν οι επιμέρους εξειδικεύσεις (μεταλλογραφία, πετρογραφία, πλαστικογραφία).

Η μεθοδολογία έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές δημοσιεύσεις ορθοπαιδικής και οδοντιατρικής/γναθοχειρουργικής. (Πίνακας 1)

Δημοσίευση	Υλικό	Επιστημονική κατεύθυνση
Draenert et al 2013 ⁹	Κνήμες σκύλων	Ορθοπαιδική
Saksø et al 2013 ¹⁰	Μηριαίο σκύλων	Ορθοπαιδική
Shon et al 2013 ¹¹	Κνήμες κονίκλων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Iezzi et al 2013 ¹²	Γνάθος ανθρώπου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Oltramari et al 2013 ¹³	Γνάθος χοίρου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Möller et al 2012 ¹⁴	Γνάθος χοίρων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Back et al 2012 ¹⁵	Μηριαίο μυών	Ορθοπαιδική
Shi et al 2012 ¹⁶	Σπονδυλος προβάτων	Ορθοπαιδική
Grandfield et al 2011 ¹⁷	Κνήμη κονίκλων	Ορθοπαιδική
Silva et al 2011 ¹⁸	Οδόντες ανθρώπου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Gutwald et al 2011 ¹⁹	Γνάθος προβάτων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Johansson et al 2011 ²⁰	Κνήμες μυών	Ορθοπαιδική
Yin et al 2011 ²¹	Μηριαίο σκύλων	Ορθοπαιδική
Deguchi et al 2011 ²²	Γνάθος σκύλων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική

Rüger et al 2010 ²³	Μηριαίο κονίκλων	Ορθοπαιδική
De Maetzu et al 2008 ²⁴	Γνάθος σκύλων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Rammelt et al 2007 ²⁵	Κνήμες προβάτων	Ορθοπαιδική
Artzi et al 2006 ²⁶	Γνάθος σκύλων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Alava et al 2005 ⁸	Γνάθος σκύλων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Franchia et al 2005 ²⁷	Κνήμες-Μηριαία προβάτων	Ορθοπαιδική
Hasegawa et al 2005 ²⁸	Σπονδυλος σκύλων	Ορθοπαιδική
Kusakabe et al 2004 ²⁹	Μηριαίο σκύλων	Ορθοπαιδική
De Maetzu et al 2003 ³⁰	Κνήμες μυών	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Zechner et al 2003 ³¹	Γνάθος χοίρου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Zechner et al 2003 ³²	Γνάθος χοίρου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Ivanoff et al 2003 ³³	Γνάθος ανθρώπου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Fajardo et al 2002 ³⁴	Μηριαίο ανθρώπου	Ανθρωπολογία
Nosaka et al 2002 ³⁵	Γνάθος σκύλου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Zaffe et al 2002 ³⁶	Γνάθος ανθρώπου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Klug et al 2001 ³⁷	Γνάθος ανθρώπου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Oda et al 2000 ³⁸	Γνάθος σκύλου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Block et al 2000 ³⁹	Γνάθος σκύλου	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Chappard et al. 1999 ⁴⁰	Μηριαίο προβάτων	Οδοντιατρική/Γναθοχειρουργική
Lind et al 1999 ⁴¹	Βραχιόνιο σκύλων	Ορθοπαιδική
Piattelli et al 1997 ⁴²	Κνήμες κονίκλων	Ορθοπαιδική
Amling et al 1996 ⁴³	Σπόνδυλοι ανθρώπου	Ορθοπαιδική
Hahn et al 1994 ⁴⁴	Σπόνδυλοι ανθρώπου	Ορθοπαιδική
Amling et al 1994 ⁴⁵	Σπόνδυλοι ανθρώπου	Ορθοπαιδική
Odgaard et al 1994 ⁴⁶	Σπόνδυλοι ανθρώπου	Ορθοπαιδική
Søballe K et al 1991 ⁴⁷	Μηριαίο σκύλων	Ορθοπαιδική

Πίνακας 1 Ενδεικτική αναφορά δημοσιεύσεων με χρήση της υλικογραφικής μεθόδου στη μελέτη του οστίτη οστού.

2.2 ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Υπάρχουν πολλές παραλλαγές στην εφαρμογή της μεθοδολογίας της υλικογραφίας, ανάλογα με το προς εξέταση υλικό (π.χ. σπογγώδες οστόν, φλοιώδες οστόν, δόντια, μεγάλα ή μικρά δείγματα) και το διαθέσιμο εξοπλισμό (π.χ. αυτοματοποιημένη ή χειροκίνητη λείανση, ακρίβεια μηχανημάτων στα βήματα κοπής και λείανσης κλπ). Γενικά μπορούν να διαχωριστούν αδρά δύο κατευθύνσεις:

1. **Η μέθοδος των υπέρλεπτων λειασμάτων**, κατά την οποία στόχος είναι η παρασκευή λεπτότατων τομών, κατάλληλων για χρώση και οπτική μικροσκοπήση σε αντικειμενοφόρο πλάκα όπως στην κλασσική ιστολογία.
2. **Η μέθοδος της επιφανειακής χρώσης λειασμένων δοκιμίων**, κατά την οποία πραγματοποιείται επεξεργασία και στερεοσκοπική μικροσκοπήση μιας λειασμένης επιφάνειας σε ογκώδη δοκίμια, τα οποία είναι αρκετά λεπτά για οπτική μικροσκοπήση.

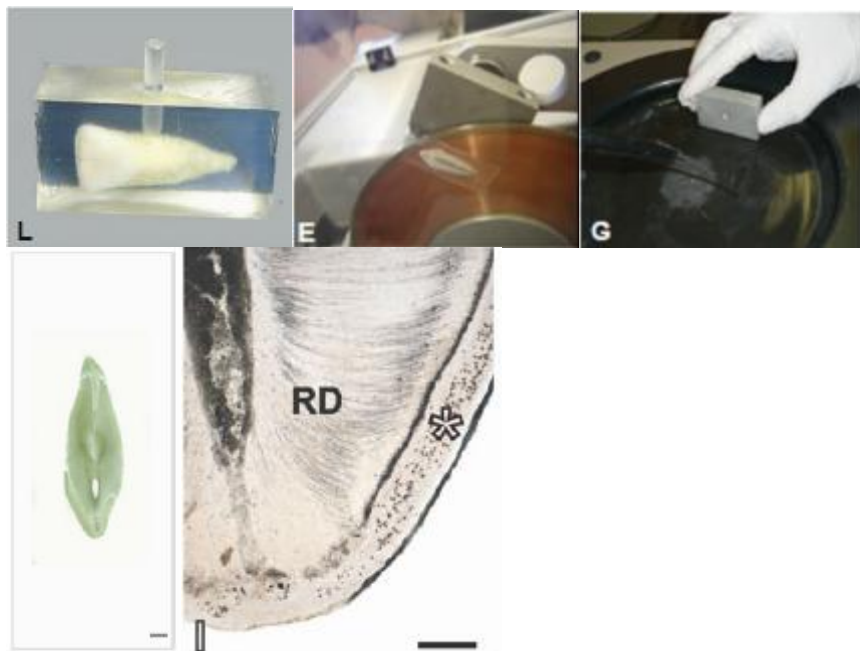
Ακολουθεί η περιγραφή των σχετικών μεθόδων.

2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΕΡΛΕΠΤΩΝ ΛΕΙΑΣΜΑΤΩΝ

Η συνηθέστερη εφαρμογή της υλικογραφίας στην μελέτη μη αφαλατωμένων ιστών είναι η λείανση του δείγματος σε πολύ λεπτά πάχη (υπέρλεπτο λείασμα – ultrathin grinding).

Μια τυπική διαδικασία παρασκευής είναι η εξής: Εάν το αρχικό δείγμα είναι ογκώδες, προηγείται μια αδρή διαίρεση σε εύχρηστους όγκους. Εν συνεχεία εγκιβωτίζεται σε ένα μέσο που μιμείται τη σκληρότητα του οστού, τυπικά πολυμερισμένη μεθυλ-μεθακρυλική (MMA)⁷ ή εποξεική ρητίνη⁴⁸. Ακολουθεί η κατά το δυνατόν ατραυματική κοπή σε λεπτές τομές, π.χ. με διαμαντοτροχό. Η λεπτή τομή προσκολλάται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και υποβάλλεται σε σταδιακή λείανση με μια αυτοματοποιημένη λειαντική μηχανή ή χειροκίνητα έως πάχος 10-200 μm . Ακολουθεί η ιστολογική χρώση με αντιδραστήρια κατάλληλα για τον οστίτη ιστό, όπως αντίδραση κυανού τολουιδίνης, χρώση von Kossa, κλασσική ηωσίνη-αιματοξυλίνη, ανοσοϊστοχημεία (π.χ. αλκαλική φωσφατάση), *in situ* υβριδισμός για ανίχνευση ειδικών νουκλεϊνικών οξέων (π.χ. mRNA οστεοκαλσίνης) κλπ.

Παρακάτω ακολουθεί ένα παράδειγμα βήμα προς βήμα παρασκευής ενός δείγματος μικροσκόπησης οδόντος.



Εικόνα 13 Παράδειγμα υλικογραφικής επεξεργασίας οδόντος με τη μέθοδο των υπέρλεπτων λειασμάτων. Χαρακτηριστικές εικόνες από τα επιμέρους στάδια: εγκιβωτισμός σε παραλληλόγραμο, κοπή σε διαμαντοτροχό ακριβείας, χειροκίνητη λείανση, χρώση, και μικροσκόπηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα (από Silva et al, 2011¹⁸)

Η υλικογραφική επεξεργασία έχει διάφορες τεχνικές παραλλαγές, ανάλογα με την επιθυμητή ακρίβεια πάχους του δείγματος (π.χ. μελέτη κυττάρων), τα διαθέσιμα μηχανήματα (ακρίβεια κοπής και λείανσης) και τις ιδιαιτερότητες του δείγματος (π.χ. παρουσία μεταλλικών εμφυτευμάτων). Παρακάτω ακολουθεί μια παραλλαγή επεξεργασίας ενός οστικού δείγματος με εμφύτευμα *in situ*, χρησιμοποιώντας υβριδικό μηχανήμα ακριβείας κοπής-λείανσης (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14 Υβριδικό μηχανήμα κοπής ακριβείας και λείανσης. Χρώση οστικού δείγματος με εμφύτευμα *in situ* κυανό τολουιδίνης προς οπτική μικροσκόπηση (από Alava et al, 2005⁸)

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου των υπέρλεπτων λειασμάτων είναι η δυνατότητα χειρισμού υλικών οιασδήποτε σκληρότητας, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων με εμφυτεύματα. Ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της βιβλιογραφίας σχετικά με την αλληλεπίδραση εμφυτευμάτων και οστίτη ιστού (π.χ. οστεοενσωμάτωση) έχει βασιστεί σε αυτή τη μέθοδο (βλέπε βιβλιογραφικό Πίνακα 1 άνω). Η δυνατότητα παρασκευής δειγμάτων σε αντικειμενοφόρο πλάκα προς ιστολογική χρώση και μικροσκόπηση δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης παρατήρησης τόσο των εφαιλωμένων/μεταλλικών όσο και των κυτταρικών δομών.

Ταυτόχρονα όμως, η σύνδεση της μεθόδου με την οπτική μικροσκόπηση προκαλεί έναν περιορισμό στο μέγεθος των δοκιμίων, τα οποία δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερα από ό,τι μια αντικειμενοφόρος πλάκα (5 x 2 cm), ενώ το ενεργό οπτικό πεδίο έχει όριο τα 2 x 2 cm. Μεγαλύτερα οστικά δείγματα μπορεί να επεξεργαστούν μόνο κατόπιν κατακερματισμού τους σε μικρότερα μέρη, ή χρησιμοποιώντας αντιπροσωπευτικές δειγματοληψίες

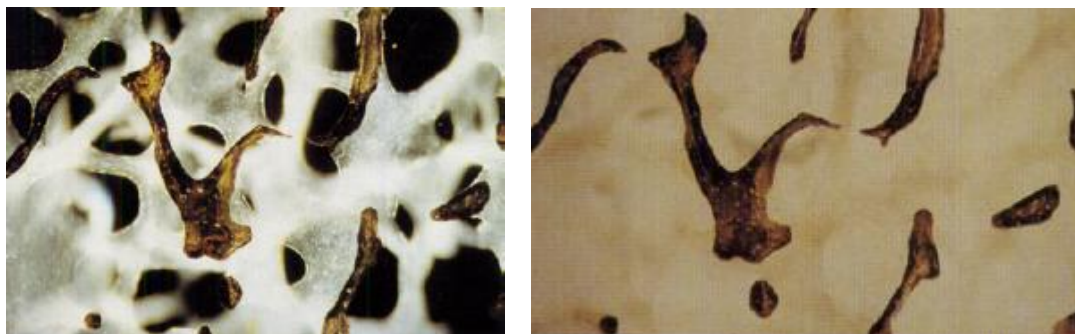
Ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι τα χρονοβόρα στάδια της διαδικασίας. Για παράδειγμα, ο εγκιβωτισμός σε MMA, το οποίο παρέχει και την καλύτερη διαπερατότητα στις ιστολογικές χρώσεις, απαιτεί μια σειρά διαφορετικών διαλυτών για την αφυδάτωση, καθαρισμό και διαπότιση του ιστού, πολύπλοκα μίγματα, ειδικές θερμοκρασίες για κάθε αντιδραστήριο, χρήση κενού αέρος κλπ. Λόγω των τοξικών χημικών, είναι αναγκαία η χρήση απαγωγού αέρος καθώς επίσης η τήρηση αυστηρών προφυλάξεων κατά τη χρήση των υλικών για την προστασία των εργαζομένων. Τυπικά, μπορεί να χρειάζονται από 3-4 ημέρες έως μια εβδομάδα για κάθε βήμα της επεξεργασίας^{7,49}. Οι αυτοματοποιημένες συσκευές ιστολογικής παρασκευής στα παθολογοανατομικά εργαστήρια δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραπάνω πλαστική επεξεργασία.

Η παρασκευή τέτοιων υπέρλεπτων λειάνσεων απαιτεί πέρα από σημαντικό χρόνο, μεγάλη χρηματική δαπάνη και εξειδίκευση του προσωπικού. Το κόστος για το βασικό εξοπλισμό εκτιμάται περίπου €70 000 – 100 000. Για τους λόγους αυτούς, αυτή η τεχνική γενικά θεωρείται «αποκλειστική για ειδικά κέντρα έρευνας του οστού»⁷.

2.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΛΕΙΑΣΜΕΝΩΝ ΔΟΚΙΜΙΩΝ

Οι Hahn et al 1991⁷ περιέγραψαν μια παραλλαγή υλικογραφικής επεξεργασίας μη αφαλατωμένου οστού, κατά την οποία αντί για την παρασκευή υπέρλεπτων λειασμάτων προς οπτική μικροσκόπηση σε αντικειμενοφόρο πλάκα, πραγματοποιείται βαφή κατευθείαν στη λειασμένη επιφάνεια. Η διαδικασία ονομάστηκε «επιφανειακή χρώση λειασμένων δοκιμίων - surface stained block grindings».

Τα δείγματα εγκιβωτίζονται κατά τον ίδιο τρόπο όπως στη τεχνική των υπέρλεπτων λειασμάτων, και λειαινούνται έως πάχος 1-3 mm. Η επιφάνεια στη συνέχεια λειαίνεται, στιλβώνεται, και βάφεται με κυανό τολουιδίνης ή χρώση von Kossa. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε για την ταυτόχρονη δισδιάστατη και τριδιάστατη μελέτη σπογγώδους οστού. Λόγω του πάχους, το δείγμα δεν μπορεί να μικροσκοπηθεί στο σύνηθες οπτικό μικροσκόπιο φωτός, παρά σε στερεολογικό μικροσκόπιο (**Εικόνα 15**).



Εικόνα 15 Παράδειγμα επιφανειακής χρώσης λειασμένων δοκιμίων. Ανάλογα με τον τύπο φωτισμού και την εστίαση στο στερεολογικό μικροσκόπιο, μπορεί να απεικονιστεί τόσο η κεχρωσμένη επιφάνεια διατομής όσο και το υποκείμενο σπογγώδες οστόύν. (από Hahn et al, 1994⁴⁴).

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Τα δείγματα που έχουν παρασκευαστεί με την τεχνική της επιφανειακής χρώσης, δεν έχουν περιορισμό μεγέθους διότι η επιφάνειά τους δεν μικροσκοπείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Ωστόσο, η εξέταση κυτταρικών δομών είναι δύσκολη έως αδύνατη με τη μέθοδο αυτή, και απαιτεί εμπειρία στην χρήση το στερεολογικού μικροσκοπίου. Για την επιτυχία της μεθόδου προϋποτίθεται μεγάλη ακρίβεια στη διαδικασία παρασκευής, δηλ. μια απόλυτα παράλληλη, λεία επιφάνεια, απουσία γρατσουνιών ή παραμορφώσεων. Όπως και η προηγούμενη παραλλαγή της τεχνικής, έχει μεγάλες απαιτήσεις σε κόστος εξοπλισμού, αναλώσιμα, κατανάλωση χρόνου και σε εξειδίκευση του προσωπικού.

3. ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΗ ΑΦΑΛΑΤΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ

Οι τεχνικές που διατίθενται για την μικροσκοπική απεικόνιση του οστίτη ιστού είναι πιθανώς οι πιο δύσκολες από κάθε άλλο ιστό. Η σκληρή δομή του οστού θέτει ιδιαίτερες προκλήσεις στο χειρισμό και την ιστολογική παρασκευή των δειγμάτων. Είναι γεγονός ότι στα περισσότερα κλινικά σενάρια της καθημερινής πράξης, η αφαλάτωση των δειγμάτων και εν συνεχεία οι συνήθεις τομές παραφίνης επαρκούν για να τεθεί μια κλινική διάγνωση π.χ. όγκος, λοίμωξη ή μεταβολική νόσος των οστών⁴⁹. Ωστόσο, η ακριβής μελέτη των μεταβολικών νοσημάτων σε ερευνητικό επίπεδο απαιτεί μια λεπτομερή μορφολογική ανάλυση του οστίτη οστού, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μόνο σε μη αφαλατωμένα παρασκευάσματα⁷.

Οι υλικογραφικές μεθοδολογίες που περιγράφηκαν δεν είναι οι μοναδική δυνατότητα μελέτης του μη εφαιλατωμένου οστού, και μάλιστα δεν είναι καν οι πιο διαδεδομένες. Άλλες καθιερωμένες μέθοδοι μελέτης του μη εφαιλατωμένου οστού είναι οι κάτωθι:

1. Λεπτές τομές μη εφαιλατωμένου οστού
2. Ηλεκτρονική μικροσκόπηση
3. Μικρο-υπολογιστική τομογραφία

3.1 ΛΕΠΤΕΣ ΤΟΜΕΣ ΜΗ ΑΦΑΛΑΤΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ

Το δείγμα εγκιβωτίζεται σε ένα μέσο που μιμείται τη σκληρότητα του οστού, τυπικά με πολυμερισμό μεθυλ-μεθακρυλικής (MMA) ή εποξεικής ρητίνης. Στη συνέχεια παράγονται λεπτές τομές πάχους 5-10 μm με τη βοήθεια ειδικών μικροτόμων εξοπλισμένων με ανθεκτικές λεπίδες βολφραμίου, ή με μεταλλουργικούς αδαμαντοτροχούς. Ακολουθεί κατά τη συνήθη ιστολογική πρακτική η χρώση και μικροσκόπηση του δείγματος.

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Η μέθοδος της παρασκευής λεπτών τομών με μικροτόμο για μικροσκόπηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα, είναι η παλαιότερη τεχνική μελέτης μη εφαιλατωμένων δειγμάτων. Ο μεγαλύτερος όγκος της έως σήμερα βιβλιογραφίας σχετικά με την ιστική ιστομορφομετρία βασίζεται σε αυτή την τεχνική.

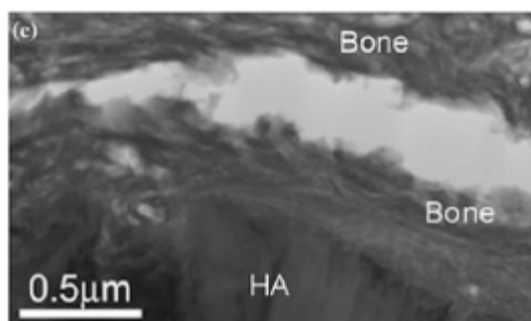
Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα πολύ καλής μελέτης των κυττάρων, καθώς το λεπτό πάχος των τομών (5-10 μm) και η δυνατότητα χρώσης με οποιαδήποτε ιστολογική/ανοσοϊστοχημική μέθοδο επιτρέπει τη μικροσκόπηση όπως στα συνήθη ιστολογικά παρασκευάσματα. Ταυτόχρονα, ισχύει και σε αυτή τη μέθοδο ο προαναφερθείς περιορισμός μεγέθους στις διαστάσεις μιας αντικειμενοφόρου πλάκας/οπτικό πεδίο μικροσκοπίου.

Ο πλαστικός εγκιβωτισμός των δειγμάτων, κατά κανόνα σε MMA, είναι όπως προαναφέρθηκε μια ιδιαίτερα χρονοβόρα και απαιτητική διαδικασία. Όσον αφορά τον εργαστηριακό εξοπλισμό οι συνήθεις μικροτόμοι των παθολογοανατομικών εργαστηρίων είναι ακατάλληλοι για το χειρισμό σκληρών ιστών. Απαιτούνται ειδικοί σκληρομικροτόμοι με ανθεκτικές λεπίδες βολφραμίου. Επιπλέον τα διάφορα στάδια της

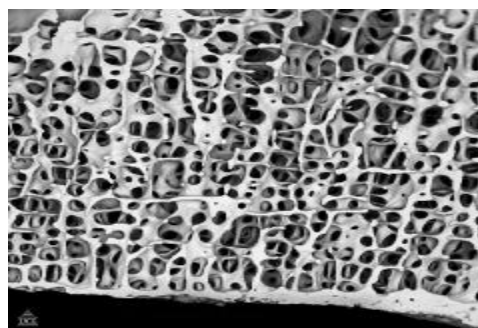
επεξεργασίας των μη αφαλατωμένων δειγμάτων (εγκιβωτισμός σε ρητίνες, κοπή κλπ) δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αυτοματοποιημένες συσκευές όπως με τα συμβατικά ιστολογικά δείγματα.

3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

Τα μη αφαλατωμένα δείγματα μπορούν να εξεταστούν σε ηλεκτρονική μικροσκόπηση διερχόμενης δέσμης (TEM - transmission electron microscopy, βλ. **Εικόνα 16**) ή σε ηλεκτρονική μικροσκόπηση σάρωσης (SEM – scanning electron microscopy, βλ. **Εικόνα 17**).



Εικόνα 16 Παράδειγμα απεικόνισης της διεπαφής οστού – εμφυτεύματος επικαλυμμένου με υδροξυαπατίτη (HA) με ηλεκτρονική μικροσκόπηση διερχόμενης δέσμης (TEM) (από Granfield et al, 2011¹⁷)



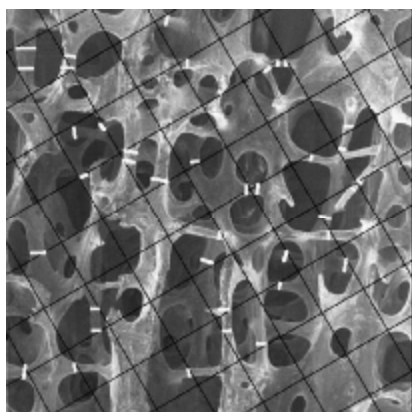
Εικόνα 17 Παράδειγμα μελέτης οστικών δοκίδων με ηλεκτρονική μικροσκόπηση σάρωσης (SEM) (από <http://www.brsoc.org.uk/gallery/index.htm>⁵⁰).

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση προσφέρει τη δυνατότητα μεγάλων μεγεθύνσεων, της τάξης του $\times 10^6$. Από την άλλη, θέτει υψηλές απαιτήσεις σε κόστος αγοράς και συντήρησης του εξοπλισμού, κτιριακές συνθήκες (ειδικός χώρος με θερμο- και ηλεκτρομόνωση), αναλώσιμα και εξειδίκευση προσωπικού.

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση διερχόμενης δέσμης προϋποθέτει την τεχνικά απαιτητική παρασκευή υπέρλεπτων διατομών πάχους 100 nm¹⁷. Η χρήση της στην οστική ιστομορφομετρία περιορίζεται στη μελέτη υπερμικροσκοπικών λεπτομερειών, π.χ. διεπιφάνεια οστού – εμφυτεύματος.

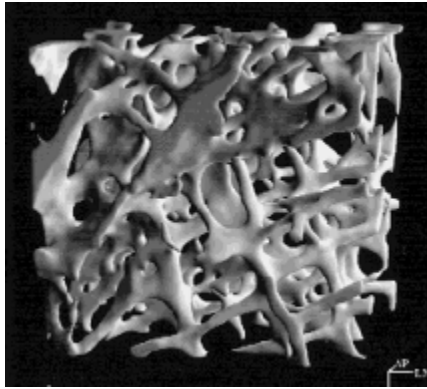
Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση σάρωσης μπορεί να απεικονίζει σε μεγάλη μεγέθυνση επιφάνειες ανεξαρτήτως πάχους διατομή, κατά συνέπεια δεν προϋποθέτει μια τεχνική απαιτητική υπέρλεπτη παρασκευή. Ωστόσο η εικόνα που προκύπτει δεν είναι μια πραγματική διατομή διότι υπάρχει το στοιχείο του βάθους. Αυτό δυσχεραίνει την περαιτέρω ιστομορφομετρική μελέτη. Κατά κανόνα στις εικόνες από SEM ο ερευνητής πρέπει να αναγνωρίζει τις δομές και να πραγματοποιεί μετρήσεις χειροκίνητα⁵¹ (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18. Παράδειγμα οστικής ιστομορφομετρίας σε εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκόπησης σάρωσης. Ο χρήστης πρέπει χειροκίνητα να εντοπίσει στην εικόνα και να μετρήσει τις οστικές δοκίδες (από Vijayanpalan et al 2003⁵¹).

3.3 ΜΙΚΡΟ-ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ (*microCT*)

Ο τομέας της οστικής ιστομορφομετρίας έλαβε νέα πνοή με την εισαγωγή της μικρο-υπολογιστικής τομογραφίας. Η *micro-CT* παράγει μια στοίβα δισδιάστατων τομών του δείγματος, από τις οποίες προκύπτει μια ακριβέστερη τρισδιάστατη ανασύσταση της οστικής δομής, χρησιμοποιώντας ειδικούς μαθηματικούς αλγορίθμους. Τυπικό μέγεθος ογκοστοιχείου (*voxel*) είναι τα 10-40 μm ⁵². Τα τρισδιάστατα ψηφιακά δεδομένα μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω υπολογιστικές μελέτες, όπως π.χ. ανάλυση πεπερασμένων στοιχείων.



Εικόνα 19. Παράδειγμα τρισδιάστατης ανασύστασης βιοψίας λαγόνιας ακρολοφίας (από Hildebrand et al, 1999⁵³).

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Πρόκειται για μια μη καταστροφική τεχνική, η οποία επιτρέπει την εξέταση δειγμάτων ως είναι, χωρίς την ανάγκη διατομής τους ή κάποιας άλλης προεπεξεργασίας. Υπάρχει μεγάλη εξοικονόμηση χρόνου, ενώ το ίδιο, άθικτο, δείγμα μπορεί εν συνεχεία να υποβληθεί σε άλλες επεξεργασίες.

Από την άλλη οι περισσότερες συσκευές microCT δέχονται δοκίμια διαμέτρου το πολύ έως 10-15 mm. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές δοκιμίων και μεγαλύτερου μεγέθους, ωστόσο σε κόστος της ανάλυσης και χρόνου επεξεργασίας (**Εικόνα 20**). Για παράδειγμα, προκειμένου να επιτευχθεί ένα πεδίο 80 mm το μέγεθος των ογκοστοιχείων μειώνεται στα 80μm, ενώ ο απαιτούμενος χρόνος σάρωσης ενός δοκιμίου είναι 3 ημέρες⁵⁴. Όμως, εφόσον το μέσο μέγεθος των οστικών δοκίδων είναι 100-150 μm με διακύμανση 80-220 μm⁵³, μια επιστημονικά αξιοποιήσιμη ανάλυση εικόνας θα πρέπει να έχει ακρίβεια τουλάχιστον 20μm⁵⁵.



Εικόνα 20 Παράδειγμα τρισδιάστατης ανασύστασης των δοκίδων ενός οστεοπορωτικού εγγύς μηριαίου (από Rietbergen et al, 2003⁵⁴). Λόγω του μεγάλου όγκου του δείγματος, η ανάλυση εικόνας είναι αναγκαστικά χαμηλή (μέγεθος ογκοστοιχείου 80 μ m). Κατά συνέπεια προκύπτουν περιοχές κενές δοκίδων, επειδή το ογκοστοιχείο είναι πλέον συγκρίσιμο με την προς εξέταση δομή (δοκίδες πάχους 80-220 μ m⁵³).

Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι η microCT εξ ορισμού μπορεί να απεικονίζει μόνο τα εφαιλατωμένα στοιχεία των ιστών, αποκλείοντας την οποιαδήποτε κυτταρική μελέτη. Επίσης η παρουσία μεταλλικών εμφυτευμάτων προκαλεί ως γνωστό artifacts σε μελέτες υπολογιστικής τομογραφίας.

Το κόστος εξοπλισμού και συντήρησης είναι αρκετά υψηλό, και κατά κανόνα μόνο εξειδικευμένα κέντρα μπορούν να διαθέσουν συσκευές microCT.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΤΟΧΟΣ

Οι παραπάνω περιγραφείσες τεχνικής μελέτης του μη αφαλατωμένου οστού χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος εξοπλισμού και συντήρησης, υψηλές απαιτήσεις σε εξειδίκευση προσωπικού, μεγάλη δαπάνη χρόνου.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η τυποποίηση και τεκμηρίωση μιας ευχερούς και ταχείας εφαρμογής της υλικογραφικής μεθοδολογίας για τη μελέτη της οστικής μικροαρχιτεκτονικής σε μεγάλα δείγματα. Οι αρχές σχεδιασμού στις οποίες στηρίχθηκε η ανάπτυξη της μεθόδου ήταν:

- να χρησιμοποιεί φιλικά προς το χρήστη και ασφαλή αντιδραστήρια
- να έχει μικρές απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό και κτιριακή υποδομή
- να εφαρμόζεται με οικονομικά και εύκολα διαθέσιμα μηχανήματα και αντιδραστήρια
- ελαχιστοποίηση του απαιτούμενου χρόνου
- να μην υπάρχει περιορισμός στο μέγεθος των δειγμάτων (π.χ. μελέτης μιας πλήρους διατομής μηριαίων κεφαλών)
- να μην εξαρτάται από μικροσκόπιο
- να προσφέρει μια ολοκληρωμένη πρόταση μελέτης των δειγμάτων, περιλαμβανομένων των σταδίων ψηφιοποίησης και ανάλυσης εικόνας

Η τεχνική υλικογραφικής οστικής ιστομορφομετρίας που περιγράφεται σχεδιάστηκε ώστε να μελετά τις εφαιλατωμένες οστεοδοκίδες του σπογγώδους οστού, όπως και η micro-CT. Η μελέτη των κυττάρων θα απαιτούσε παρασκευή λεπτών, μικροσκοπίσιμων τομών, κάτι που, όπως έχει εξηγηθεί στο Γενικό Μέρος, είναι μια εξαιρετικά χρονοβόρα και απαιτητική διαδικασία.

2. ΥΛΙΚΟ

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή ήταν μηριαίες κεφαλές από αρθροπλαστικές ισχίου, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Νοσ. Ευαγγελισμού 1975-1983 (αρχειακό υλικό του τ. Αναπλ. Καθ. Ι. Στ. Παπαδόπουλου) λόγω οστεοαρθρίτιδας ή κατάγματος.

Η διενέργεια της διατριβής εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

3. Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΗ ΑΦΑΛΑΤΩΜΕΝΟΥ ΟΣΤΟΥ

Η τεχνική που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Κοπή
2. Καθαρισμός του λίπους
3. Εγκιβωτισμός
4. Λείανση
5. Χρώση
6. Ψηφιοποίηση
7. Ανάλυση εικόνας

3.1 ΚΟΠΗ

Για την κοπή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πριονοκορδέλλα γενικής χρήσης. Επιλέχθηκε μια λεπτή κορδέλλα με πυκνή οδόντωση χαμηλού προφίλ, κατάλληλη για την επεξεργασία μετάλλου. Για τη διευκόλυνση της κοπής χρησιμοποιήθηκε μια ιδιοκατασκευή χαμηλού κόστους, η οποία περιγράφεται παρακάτω με τη βοήθεια χαρακτηριστικών εικόνων.

Μια οριζόντια βάση τροχοθυμίζόμενη σε 2-διευθύνσεις (PROXXON MICRO compound table KT 70) σταθεροποιείται στην επιφάνεια εργασίας μιας πριονοκορδέλλας γενικής χρήσης (Bülle 210mm) με σφιγκτήρες (**Εικόνα 21**).



Ένα ξύλινο μπλοκ σχήματος L κόβεται ώστε να εφαρμόζει ακριβώς στην οριζόντια βάση: θα χρησιμεύσει ως μοντέλο για την παρασκευή ενός στηρίγματος κοπής από ρητίνη (Εικόνα 22).



Παρασκευή ενός καλούπιού σιλικόνης από το παραπάνω μπλοκ. Αρχικά συναρμολογείται ένα πλαίσιο από 4 φύλλα plexiglas σχήματος L, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με σφιγκτήρες. Το ξύλινο μπλοκ τοποθετείται μέσα στο αποσυναρμολογούμενο πλαίσιο, και εγχύεται ένα μίγμα υγρής σιλικόνης 2 συστατικών. **(Εικόνα 23)** Η σιλικόνη στερεοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου εντός 8-18 h. (Τεχνική συμβουλή: το ξύλο επιπλέει μέσα στην παχύρρευστη υγρή σιλικόνη. Για το λόγο αυτό πρώτα εγχύεται σιλικόνη έως λίγα μόνο εκατοστά, αφήνεται να στερεοποιηθεί, και μπλοκ ολοκληρώνεται σε δεύτερο στάδιο η πλήρης κάλυψη του μπλοκ).



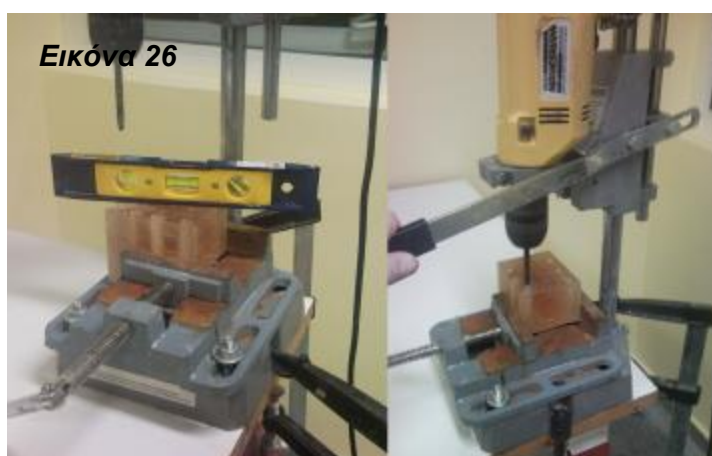
Το καλούπι σιλικόνης ελευθερώνεται από το αποσυναρμολογούμενο πλαίσιο. Αποτελεί το αρνητικό καλούπι του ξύλινου μπλοκ. Το σιλικονούχο καλούπι πληρούται με εποξεική ρητίνη 2-συστατικών (EPOFIX, Struers, Copenhagen, Denmark), η οποία πολυμερίζεται σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς αναθυμιάσεις εντός 12-24 ωρών. **(Εικόνα 24)**



Μετά τη στερεοποίηση της ρητίνης, το καλούπι διαιρείται με μαχαιρίδιο ώστε να ελευθερωθεί το ρητινώδες αντίγραφο. Αυτό θα αποτελέσει το στήριγμα κοπής των οστικών δοκιμίων. **(Εικόνα 25)**



Με ένα κάθετο δρόπανο διανοίγονται κάθετες οπές στο ρητινώδες στήριγμα κοπής, κατά τρόπο ώστε να ταιριάζουν στις εγκοπές της βάσης PROXXON. Στην εικόνα φαίνεται η εξασφάλιση της καθετότητας με αλφαδισμό του μπλοκ στη μέγγενη. **(Εικόνα 26)**



Το στήριγμα κοπής στερεώνεται στην οριζόντια βάση με βίδες, οι οποίες διεκβάλλονται δια των οπών ώστε κεφαλές τους να εφαρμόζουν στις εσοχές της οριζόντιας βάσης PROXXON, ενώ στην κορυφή σφίγγονται με ροδέλλες και παξιμάδια. **(Εικόνα 27)**



Προκειμένου να διευκολυνθεί η ταυτόχρονη επεξεργασία περισσότερων δειγμάτων, κατασκευάστηκε με σιλικόνη μια ελαστική θήκη σιλικόνης με 8 χώρους. Εντός ενός αποσυναρμολογούμενου πλαισίου, τοποθετούνται 8 συμπαγείς κύβοι (συσσκευασίες εμπορίου στις οποίες έχει εγχυθεί γύψος). Στη συνέχεια το πλαίσιο πληρούται με ρευστή σιλικόνη δύο συστατικών. **(Εικόνα 28)**



Η αρνητική μήτρα σιλικόνης που προκύπτει είναι μια εύκαμπτη θήκη 8 χώρων, κατάλληλη για πάρα πολλές χρήσεις σε όλα τα στάδια της διαδικασίας (εγκιβωτισμός σε ρητίνη, κατεργασία οστικών τομών σε διαλύματα, παρασκευή ρητινούχων κύβων για τη λείανση κλπ, βλέπε παράδειγμα στην παράπλευρη **Εικόνα 29**).



Μία (ή περισσότερες) μηριαία κεφαλή ημιεγκιβωτίζεται στη βάση σε ένα στρώμα εποξεικής ρητίνης πάχους 5mm. **(Εικόνα 30)**



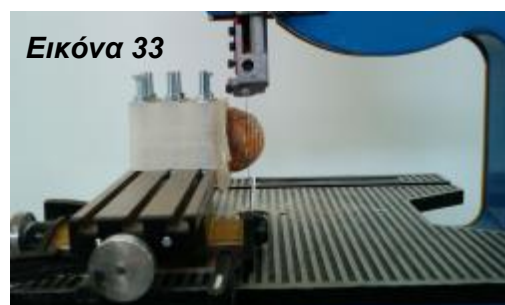
Με τον τρόπο αυτό προκύπτει ένα δοκίμιο ημιεγκιβωτισμένο κατά τη βάση του, είναι κατάλληλο για ασφαλή καθήλωση στο κάθετο στήριγμα κοπής που έχει ήδη κατασκευαστεί. **(Εικόνα 31)**



Οι ρητινώδεις επιφάνειες του ημιεγκιβωτισμένου δοκιμίου και του στηρίγματος κοπής κολλούνται με λίγες σταγόνες κόλλας στιγμής του εμπορίου εντός λίγων λεπτών. **(Εικόνα 32)**



Ο ένας τροχομοχλός της οριζόντιας βάσης PROXXON επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση του πάχους των τομών του οστού, ενώ ο άλλος τροχομοχλός οδηγεί το δείγμα αργά και σταθερά προς την περιονοκορδέλλα. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας κοπής, το δείγμα αποκολλάται από το στήριγμα κοπής οδηγώντας την πριονοκορδέλλα στην ένωση των δύο επιφανειών. **(Εικόνα 33)**



Οι διατομές πρέπει να είναι αρκετά παχιές ώστε να διατηρείται η ακεραιότητα των οστεοδοκίδων στον πυρήνα τους, αλλά όχι τόσο ώστε να δυσχεραίνονται τα μετέπειτα στάδια της απολίπανσης και εγκιβωτισμού. Για τις μηνιαίες κεφαλές που χρησιμοποιήθηκαν, αυτό το βέλτιστο πάχος βρέθηκε να είναι 1,8 mm. Κατά συνέπεια η προώθηση του δείγματος προς την πριονοκορδέλλα πρέπει να τυποποιηθεί έτσι ώστε να προκύπτουν διατομές πάχους 1,8 mm, λαμβάνοντας υπόψη την απώλεια ουσίας από την ίδια τη λεπίδα. Η ενδεχόμενη διαταραχή των επιφανειακών οστεοδοκίδων από τη λεπίδα κοπής δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα εφόσον οι οστεοδοκίδες στον πυρήνα της διατομής παραμένουν ακέραιες.

Με τη διάταξη που περιγράφεται, το συνολικός χρόνος στερέωσης και κοπής μιας μηνιαίας κεφαλής σε 10-15 διατομές λαμβάνει όχι πάνω από 20-30 λεπτά. Η χρήση της θήκης σιλικόνης πολλαπλών κοιλοτήτων επιτρέπει την ταυτόχρονη προετοιμασία πολλών δοκιμίων. Με τη χρήση κόλλας στιγμής ανάμεσα στις ρητινώδεις επιφάνειες του ημιεγκιβωτισμένου οστού και του στηρίγματος κοπής, μπορούν να κόβονται πολλά δοκίμια σειριακά.

3.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Προκειμένου να απομονωθούν οι εφαιλωμένες οστεοδοκίδες, ένα θεμελιώδες βήμα της διαδικασίας είναι η πλήρης αφαίρεση του λίπους του μυελού των οστεοκυψέλων. Ανάμεσα στις πολλές τεχνικές που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (μηχανικός καθαρισμός με jet ύδατος ή αέρα⁵⁶, διάλυμα ακετόνης/αιθανόλης⁵⁷, ενζυμικά απορρυπαντικά⁵⁶, υπεροξείδιο του υδρογόνου⁵⁸, υδροξείδιο του νατρίου⁵¹, υποχλωρίδιο του νατρίου^{56,59}) υιοθετήθηκε η τελευταία τεχνική, επειδή είναι η καταλληλότερη για φορμαλισμένα δείγματα⁵⁶, είναι ασφαλής για το προσωπικό και έχει χαμηλότατο κόστος. Κατόπιν πολλών δοκιμών με διαφορετικές πυκνότητες, χρόνους κατεργασίας και θερμοκρασίες, τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν με την παρακάτω σειρά βημάτων:

1. Κατεργασία του δείγματος σε αραιωμένο διάλυμα οικιακής χλωρίνης 1:10, και στη συνέχεια μηχανικός καθαρισμός του λίπους που αναδύεται στην επιφάνεια.
2. Επανάληψη της διαδικασίας έως ότου να μην αναδύεται λιπώδες υλικό (τυπικά 4-5 επαναλήψεις) **(Εικ)**



Εικόνα 34 Μηχανικός καθαρισμός του αναδυσόμενου λιπώδους υλικού με ατραυματικό αντικείμενο (π.χ. ξύλινη σπάτουλα). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4-5 φορές.

3. Κατεργασία του δείγματος σε αραιωμένο διάλυμα ακετόνης 1:2 επί 8 ώρες.
4. Βρασμός του δείγματος σε διάλυμα οικιακής χλωρίνης αραιωμένο 1:2 επί 2-3 min, με οπτικό έλεγχο της προόδου ανά 30 sec. **(Εικόνα 35)**. Η διαδικασία διακόπτεται εάν παρατηρηθεί καταστροφή οστικών δοκίδων.



Εικόνα 35 Πρόοδος της αφαίρεσης του λίπους από τις οστικές κυψέλες ανά 30sec. Τα δείγματα θα πρέπει να ελέγχονται οπτικά ώστε να μη διακινδυνεύει η ακεραιότητα των οστεοδοκίδων..

5. Ο καθαρισμός του λίπους πραγματοποιείται με συνδυασμό χημικού και μηχανικού στοιχείου. Προκειμένου να επιτυγχάνονται βέλτιστα αποτελέσματα, συνιστάται η τήρηση των παρακάτω οδηγιών:
- Η στάθμη του διαλύματος να είναι τουλάχιστον 2 cm
 - Η βράση να γίνεται σε υψηλή θερμοκρασία ώστε ο βρασμός να είναι έντονος.
 - Επειδή κατά την πρόοδο της επεξεργασίας επέρχεται κορεσμός του διαλύματος, κάθε δείγμα θα πρέπει να επεξεργάζεται σε νέο διάλυμα.
 - Εάν σε κάποια δείγματα η πρόοδος του καθαρισμού δεν είναι ικανοποιητική, συνιστάται η καθήλωση του δείγματος με ένα πλαστικό αντικείμενο στον πυθμένα του βραστήρα (**Εικόνα 36**), όπου η ένταση του βρασμού είναι μεγαλύτερη. (Σημ: να μην χρησιμοποιούνται μεταλλικά αντικείμενα π.χ. λαβίδες διότι οξειδώνονται).



Εικόνα 36 Το δείγμα καθιλώνεται με πλαστικό αντικείμενο στον πυθμένα του βραστήρα, όπου η ένταση του βρασμού είναι μεγαλύτερη.

6. Μετά από την παραπάνω επεξεργασία, συχνά τα δείγματα παραμορφώνονται. Για το λόγο αυτό παραμένουν να στεγνώσουν ανάμεσα σε δύο υαλοπίνακες (**Εικόνα 37**).



Εικόνα 37 Μετά την επεξεργασία καθαρισμού τα δείγματα συνήθως παραμορφώνονται. Προκειμένου να επιπεδωθούν, αφήνονται να στεγνώσουν ανάμεσα σε δύο υαλοπίνακες με βάρος (δεν απεικονίζεται).

Τυχόν υπολειμματικά ίχνη μυελού ανάμεσα στις οστεοδοκίδες γίνονται καλά ανεκτά από τη μέθοδο όπως θα δειχθεί αργότερα στα στάδια του εγκιβωτισμού και βαφής. Για το λόγο αυτό, δεν θα πρέπει να διακινδυνεύεται η ακεραιότητα των οστεοδοκίδων με μια διαδικασία καθαρισμού πέρα από τις ενδεικνυόμενες πυκνότητες και χρόνους κατεργασίας.

Άλλες, ενδεχομένως ηπιότερες μέθοδοι καθαρισμού, όπως π.χ. κατεργασία σε δ/μα ακετόνης-αλκοόλης 50:50 για 24 ώρες, οι οποίες είναι κατάλληλες κυρίως για φρέσκα δείγματα, παρόλο που δεν δοκιμάστηκαν, αναμένεται να είναι επίσης συμβατές με τη λοιπή διαδικασία.

3.3 ΕΓΚΙΒΩΤΙΣΜΟΣ

Το συνηθέστερο μέσο εγκιβωτισμού για μη εφαιλατωμένα δείγματα είναι το μεθυλ-μεθακρυλικό (MMA). Το κύριο πλεονέκτημα είναι η καλή διαπερατότητα των χρωστικών προς τους εγκιβωτισμένους ιστούς⁴⁹. Ωστόσο, η σχετική διαδικασία είναι χρονοβόρα και δυνητικά επικίνδυνη για το προσωπικό λόγω των τοξικών αναθυμιάσεων. Ένα εναλλακτικό μέσο πλαστικού εγκιβωτισμού είναι οι εποξεικές ρητίνες³.

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η διαφανής εποξική ρητίνη ψυχρού πολυμερισμού EPOFIX Resin, Struers, Copenhagen, Denmark, η οποία έχει το πλεονέκτημα της ευχερούς χειροκίνητης παρασκευής χωρίς την ανάγκη μηχανικών αναδευτήρων, χαμηλή τιμή, απουσία τοξικών αναθυμιάσεων, καθώς και μεγάλο εύρος συμβατών θερμοκρασιών. Η παρασκευή της ρητίνης πραγματοποιήθηκε με τις εξής τροποποιήσεις:

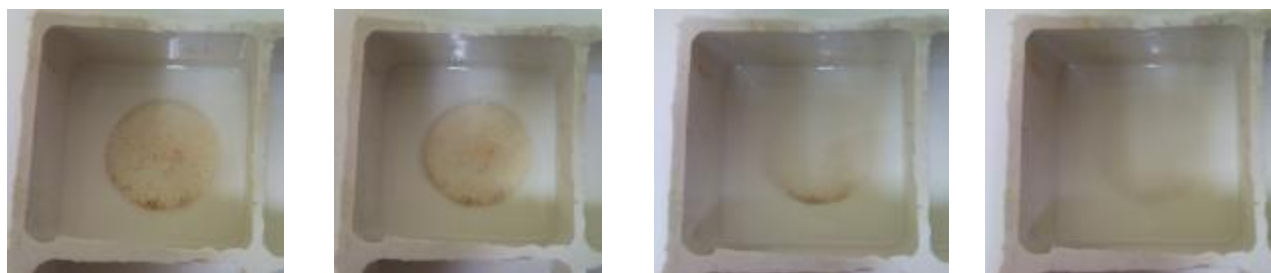
1. Ανάμιξη της ρητίνης με το σκληρυντικό καταλύτη κατά την ενδεικνυόμενη από τον κατασκευαστή αναλογία 15:2.
2. Αραίωση του μίγματος με white-spirit σε αναλογία 5:1. Η παραπάνω αραίωση βρέθηκε ότι ελαττώνει το ιξώδες της ρητίνης χωρίς να επηρεάζει τη διαδικασία πολυμερισμού. ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ο διαλύτης white-spirit πρέπει να προστεθεί και να αναδευτεί μετά την πλήρη παρασκευή του μίγματος ρητίνης (όχι και τα τρία συστατικά μαζί).
3. Προσθήκη 0.25 ml (ή 5 μετρικές σταγόνες) λευκού ελαιοχρώματος του εμπορίου για κάθε 20 ml of αραιωμένης ρητίνης. Καθένα από τα παραπάνω 3 βήματα προϋποθέτει ανάδευση για τουλάχιστον 3-5 min.

Ο λευκός χρωματισμός της ρητίνης εξυπηρετεί δύο σκοπούς: Κατ' αρχήν καταργεί τη φυσική διαφάνεια της ρητίνης EPOfix, διότι ένα το υπόστρωμα είναι διαφανές, η απεικόνιση των επιφανειακών δομών θα συγχέεται με τις υποκείμενες δομές. Επιπλέον, ο λευκός χρωματισμός προσφέρει τη μέγιστη αντίθεση έναντι της μαύρης χρώσης της επιφάνειας που θα ακολουθήσεις (βλέπε ενότητα Χρώση)

Μετά την παρασκευή της αραιωμένης και λευκοχρωματισμένης ρητίνης, ακολουθεί ο εγκιβωτισμός των απολιπασμένων δοκιμίων. Οι περισσότερες διαδικασίες πλαστικού εγκιβωτισμού τυπικά προτείνουν τη χρήση συστήματος κενού ώστε να αποτρέπεται η

παγίδευση φυσαλίδων. Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, επιτεύχθηκαν σταθερά καλά αποτελέσματα επιτυχούς εγκιβωτισμού χωρίς την ανάγκη συσκευής κενού, ακολουθώντας τις παρακάτω αρχές:

1. Έγχυση ενός ρηχού στρώματος ρητίνης σε μία ή περισσότερες κοιλότητες της εύκαμπτης σιλικονούχου θήκης πολλαπλών κοιλοτήτων, όχι υψηλότερου από 2-3 mm. Ιδανικά, η ρητίνη θα πρέπει να είναι μόλις ένα λεπτό φιλμ πάνω από το δείγμα. Όσο υψηλότερο το επίπεδο της ρητίνης, τόσο πιο δύσκολο για τις φυσαλίδες να αναδυθούν στην επιφάνεια.
2. Τα δείγματα αφήνονται να εμβυθιστούν αργά εντός της ρητίνης (μπορεί να χρειαστεί αρκετά λεπτά, **Εικόνα 38**). Η πιθανότητα παγίδευσης φυσαλίδων βρέθηκε ότι είναι μεγαλύτερη εάν η ρητίνη εγχυθεί πάνω στα δείγματα.



Εικόνα 38 Σταδιακή εμβύθιση του δείγματος σε λεπτό στρώμα ρητίνης.

Ο εγκιβωτισμός ολοκληρώνεται σε θερμοκρασία δωματίου εντός 12-24h. Η πρόοδος του πολυμερισμού παρακολουθείται ελέγχοντας τη σκληρότητα με ένα μη τραυματικό εργαλείο.

3.4 ΛΕΙΑΝΣΗ

Η διαδικασία της λείανσης των εγκιβωτισμένων δειγμάτων αυτοματοποιήθηκε με την εξής ιδιοκατασκευή.

Ένα πλαστικό δοχείο τοποθετείται επάνω σε μια ορθογώνια ξύλινη βάση, και στον πυθμένα διανοίγονται 4 οπές δίκην σταυρού. **(Εικόνα 39)**



Το πλαστικό δοχείο καθλώνεται στην ξύλινη βάση με τέσσερις βίδες τύπου αρσενικού ημι-μεντεσέ μίας οπής του χειρουργικού συστήματος Ilizaron (male half-hinge, βλ. ένθετη εικόνα). Ανάμεσα στην ξύλινη βάση και στον πυθμένα παρεμβάλλονται λαστιχένιες ροδέλες προς στεγανοποίηση. **(Εικόνα 40)**



Παρασκευάζεται ένας κύβος ρητίνης σε έναν από τους χώρους της ελαστικής θήκης σιλικόνης. Το κύβος αυτός σταθεροποιείται με 4 οριζόντιες βίδες-παξιμάδια που, διεκβάλλονται από τις κάθετες οπές των τεσσάρων ημιμεντεσέδων. **(Εικόνα 41)**



Το παραπάνω δοχείο στερεώνεται με μέγγενη σε μια κάθετη βάση δράπανου. **(Εικόνα 42)**



Στο δράπανο προσαρμόζεται με μια προέκταση τσωνκ ένας άκαμπτος δίσκος λείανσης διαμέτρου 12 cm τύπου βέλκρο για την ευχερή εναλλαγή διαφορετικών τύπων λειαντικών χαρτιών. Για τις ανάγκες της επεξεργασίας των δειγμάτων χρησιμοποιούνται λειαντικά χαρτιά της μάρκας Bosch με κόκκο 80 και 400 (για την αδρή και λεπτή λείανση αντίστοιχα).

(Εικόνα 43)



Ο κύβος της ρητίνης λειαίνεται με το λειαντικό χαρτί κόκκου 80 για ορισμένα mm, ώστε η άνω επιφάνειά του να είναι απολύτως παράλληλη με το δίσκο λείανσης, διαφορετικά τα δοκίμια θα λειανθούν ασύμμετρα. Το βήμα αυτό πρέπει να επαναλαμβάνεται σε κάθε νέα λείανση ώστε να απομακρύνονται τα υπολείμματα κόλλας από την προηγούμενη λείανση. **(Εικόνα 44)**



Τέσσερις σταγόνες κόλλας στιγμής του εμπορίου ενσταλλάζονται στις γωνίες της εγκιβωτισμένης διατομής, με προσοχή ώστε να μην έρθουν σε επαφή με την οστική ουσία (υπάρχει κίνδυνος θραύσης του λεπτυσμένου δοκιμίου κατά την αποκόλληση μετά το πέρας της λείανσης). **(Εικόνα 45)**



Η εγκιβωτισμένη διατομή αφήνεται να προσκολληθεί στον κύβο ρητίνης με ένα μικρό βάρος επί 20 min. **(Εικόνα 46)**



Το πλαστικό δοχείο πληρούται με νερό παροχής έως να καλυφθεί η επιφάνεια του εγκιβωτισμένου δοκιμίου. Η λείανση πραγματοποιείται σε χαμηλή ταχύτητα, πιέζοντας απαλά το δίσκο πάνω στο δοκίμιο, με διαρκείς κινήσεις εμπρός-πίσω (ο άξονας του κάθετου στηρικτικού του δράπανου πρέπει να είναι χαλαρωμένος).

Η χρήση νερού είναι απαραίτητη ώστε αφενός να μην αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες, αφετέρου να απομακρύνονται διαρκώς τα ξέσματα της ρητίνης. Στην **Εικόνα 47** φαίνεται η ανάδευση του νερού μέσα στο πλαστικό δοχείο καθώς περιστρέφεται ο δίσκος λείανσης (η φωτογραφία έχει ληφθεί με το δίσκο λείανσης εν λειτουργία). Το πλαστικό δοχείο αποτρέπει αποτελεσματικά το πιτσίλισμα του νερού στον περιβάλλοντα χώρο.



Αδρή λείανση: Το εγκιβωτισμένο υλικό λειαινείται σε πρώτη φάση σε χαμηλές στροφές με λειαντικό χαρτί κόκκου 80 έως ότου οι οστικές δοκίμες αναδυθούν στην επιφάνεια. Ο έλεγχος θα πρέπει να γίνεται οπτικά ανά τακτά διαστήματα του 1 min. Ο συνολικός απαιτούμενος χρόνος εξαρτάται από το πάχος ρητίνης πάνω από τη διατομή του οστού, συνήθως 2-3 λεπτά. Ανεξέλεγκτη λείανση μπορεί να προσπεράσει το επίπεδο των 1,8 mm πάχους οστού (**Εικόνα 48**).



Εικόνα 48 Σταδιακή ανάδυση του εγκιβωτισμένου οστού στην επιφάνεια κατά τη λείανση με αδρό κόκκο 80.

Λεπτή λείανση: Ακολουθεί η λεπτή λείανση επί 2 min με το λειαντικό χαρτί κόκκου 400, ώστε να προκύψει μια κατά το δυνατόν λεία επιφάνεια. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο διότι μια τραχεία επιφάνεια είναι επιρρεπής σε σφάλματα χρώσης.

Δεν παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα με τη σειριακή λείανση με χαρτιά σταδιακά λεπτότερου κόκκου, ούτε με τη χρήση κόκκου λεπτότερου των 400. Κατά συνέπεια, υπάρχει μεγάλη εξοικονόμηση χρόνου με μόνο 2 βήματα λείανσης.

Μετά την ολοκλήρωση του κύκλου λείανσης, το νερό αφαιρείται από το πλαστικό δοχείο, και το λεπτυσμένο δοκίμιο αφαιρείται προσεκτικά από την υποκείμενη ρητίνη, αποκολλώντας τις τέσσερις κολλημένες γωνίες με μια εύκαμπτη λεπίδα. Στο σημείο αυτό επαλαμβάνεται η σημασία της προσοχής κατά τη στερέωση του δοκιμίου ώστε η κόλλα να μην περάσει στο χώρο της οστικής ουσίας, διότι υπάρχει κίνδυνος θραύσης του λεπτυσμένου δοκιμίου κατά την αποκόλληση.

Μετά την αποκόλληση κάθε δοκιμίου, η επιφάνεια του μπλοκ ρητίνης πρέπει να νεαροποιηθεί με το χαρτί κόκκου 80 ώστε να αφαιρεθούν τα υπολείμματα της κόλλας. Εάν παραμείνουν υπολείμματα κόλλας, υπάρχει πιθανότητα η επόμενη διατομή να μην λειανθεί ακριβώς παράλληλα.

3.5 ΧΡΩΣΗ

Η βιοχημική βάση της χρώσης είναι η εκλεκτική φωτοχημική αντίδραση του νιτρικού αργύρου με το ασβέστιο των οστών παρουσία φωτός (αρχή χρώσης von Kossa). Για την ακριβή εκλεκτική χρώση των οστικών δοκίδων απαιτείται σχολαστικός καθαρισμός του λειασμένου δοκιμίου από τα υπολείμματα των ξεσμάτων που προέκυψαν κατά τη διαδικασία της λείανσης. Εάν αυτό δεν τηρηθεί προκύπτουν artifacts κατά τη χρώση.

Για το λόγο αυτό τα λειασμένα δοκίμια καθαρίζονται και στις δύο επιφάνειες επί 5 min σε τρεχούμενο νερό με σκόνη οικιακού απορρυπαντικού. Μόνο γάντια επιτρέπεται να αγγίζουν πλέον το δείγμα, διότι το σμήγμα/ιδρώτας των χεριών προκαλούν artifacts χρώσης. **(Εικόνα 49)**



Τα δείγματα κατεργάζονται στη συνέχεια με διάλυμα νιτρικού άργυρου 0,1N και εκτίθενται στο ηλιακό φως επί 2-5 min. Ο απαιτούμενος χρόνος για τη χρώση εξαρτάται από την ένταση της ηλιοφάνειας (μπορεί να κυμαίνεται από 30 sec έως αρκετά λεπτά). Οι φωτογραφίες του δείγματος της **Εικόνας 50** απέχουν μεταξύ τους 30 sec.



Εικόνα 50 Σταδιακή χρώση δείγματος εμβυθισμένου σε δ/μα νιτρικού άργυρου 0,1N, εκτεθειμένου στο ηλιακό φως. Οι διαδοχικές φωτογραφίες απέχουν χρονικά 30 sec μεταξύ τους.

Εναλλακτικά η φωτοχημική μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε κλειστό χώρο με την έκθεση σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

Η παραδοσιακή χρώση von Kossa περιλαμβάνει στη συνέχεια την έκπλυση σε τρεχούμενο νερό και σταθεροποίηση σε διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1N. Παρατηρήθηκε ότι η απλή έκπλυση σε τρεχούμενο νερό αφήνει αρκετά artifacts. Τα artifacts αυτά είναι εντονότερα εάν έχουν παραμείνει υπολείμματα μυελού κατά το στάδιο απολίπανσης, διότι το λίπος διαλύεται και αμαυρώνει την επιφάνεια. **(Εικόνα 51)**



Εικόνα 51

Αυτά τα artifacts μπορούν να αφαιρεθούν σε μεγάλο βαθμό εάν μετά την χρώση στο φως επαναληφθεί η διαδικασία του χειροκίνητου καθαρισμού με απορρυπαντική σκόνη υπό τρεχούμενο νερό. Στην παρακείμενη **Εικόνα 52** είναι σαφής η βελτίωση συγκριτικά με την προηγούμενη.



Εικόνα 52

Μετά το δεύτερο αυτό καθαρισμό, ακολουθεί κανονικά η προβλεπόμενη κατεργασία σε διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1N για 5 min. Τα δείγματα που παρασκευάζονται με τον τρόπο αυτό είναι πλέον ευκρινή σε όλη την επιφάνειά τους **(Εικόνα 53)**.



Εικόνα 53 Τελικό αποτέλεσμα της υλικογραφικής επεξεργασίας μιας πλήρους διατομής μηριαίας κεφαλής

3.6 ΨΗΦΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η κεχρωσμένη επιφάνεια μπορεί εύκολα να σαρωθεί σε έναν οποιοδήποτε σύγχρονο σαρωτή (scanner) από τους ευρέως διαθέσιμους στην αγορά ηλεκτρονικών υπολογιστών. (Εικόνα 54)



Εικόνα 54 Στιγμιότυπο της διαδικασίας ψηφιοποίησης ενός δείγματος σε επιτραπέζιο σαρωτή τύπου see-through vertical scanner HP ScanJet 4670. Για την ψηφιοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας οποιοσδήποτε σύγχρονος σαρωτής που υποστηρίζει ανάλυση τουλάχιστον 4800DPI.

Όσο υψηλότερη είναι η ανάλυση τόσο καλύτερη είναι η ακρίβεια στην απεικόνιση των οστεοδοκίδων, ωστόσο τόσο μεγαλύτερη και η απαιτούμενη υπολογιστική ισχύς και ο απαιτούμενος χρόνος για την περαιτέρω επεξεργασία της εικόνας. Γενικά για τη μελέτη των οστικών δοκίδων, οι οποίες έχουν ένα μέσο πάχος 100-150 μm , η ελάχιστη ανάλυση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20 μm ⁵⁵. Θεωρούμε μια ανάλυση σάρωσης 4800DPI (dots-per-inch), η οποία δίνει ένα μέγεθος εικονοστοιχείου (pixel) 5,29 μm , ως επαρκή για τη συνήθη οστική ιστομορφομετρία.

3.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ

3.7.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ImageJ

Στο Γενικό Μέρος αναφέρθηκε η «παραδοσιακή» μεθοδολογία εξαγωγή ποσοτικών μετρήσεων οστικής ιστομορφομετρίας από τις σαρωμένες εικόνες με το επιφάκιο πλέγμα και τις χειροκίνητες μετρήσεις επί των τετραγωνιδίων (**Εικόνα 2**). Ωστόσο, για τις ανάγκες της σύγχρονης έρευνας, απαιτείται εξειδικευμένο λογισμικό ανάλυσης εικόνας που να αυτοματοποιεί τις μετρήσεις. Κατά κανόνα, τέτοια προγράμματα παρέχονται από τους κατασκευαστές μικροσκοπίων ή υπολογιστικών τομογράφων (π.χ. Leica Quantimet Image Analyser, Osteometrics, SkyScan CTAnalyzer). Μειονεκτήματα αυτών των λογισμικών είναι ότι είναι εμπορικά, καλύπτονται από δικαιώματα χρήσης, και ότι ο κώδικάς τους είναι μυστικός. Αυτό σημαίνει ότι για τον ερευνητή λειτουργούν μάλλον ως «μαύρο κουτί», καθώς δεν είναι γνωστοποιημένος ο αλγόριθμος που χρησιμοποιούν εσωτερικά. Επίσης, παρέχονται ως έτοιμα πακέτα «ως είναι», με συνέπεια να μην μπορεί να εξειδικευτούν στις συγκεκριμένες ανάγκες του κάθε ερευνητικού προβλήματος.

Για τους παραπάνω λόγους αποφασίστηκε να προγραμματιστεί εξ αρχής κώδικας ανάλυσης εικόνας, ο οποίος να εξυπηρετεί ακριβώς τις ανάγκες της οστικής ιστομορφομετρίας σε μεγάλη κλίμακα, δηλ. να επιτρέπει τη χαρτογράφηση των παραμέτρων της μικροαρχιτεκτονικής σε μια μεγάλη επιφάνεια.

Ο πιο πρόσφορος τρόπος για την πραγματοποίηση ενός τέτοιου εγχειρήματος είναι η χρησιμοποίηση ενός ήδη υπάρχοντος προγράμματος ανάλυσης εικόνας, το οποίο να επιτρέπει τον προγραμματισμό προσθέτων (plugins), δηλ. κώδικα ο οποίος χρησιμοποιεί το περιβάλλον χρήσης (interface) και τις εσωτερικές λειτουργίες του μητρικού προγράμματος και πραγματοποιεί ειδικές λειτουργίες που δεν προβλέπονται στην αρχική εφαρμογή. Υπάρχουν διάφορες τέτοιες διαθέσιμες πλατφόρμες λογισμικού, ενδεικτικά αναφέρουμε τις εφαρμογές Adobe Photoshop, Corel Draw, GIMP, ImageJ. Ως βάση για την ανάπτυξη ειδικού λογισμικού για την οστική ιστομορφομετρία, επιλέχθηκε η πλατφόρμα του προγράμματος ImageJ ως πλέον κατάλληλη έναντι άλλων εναλλακτικών. Το ImageJ είναι ένα πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ελεύθερου κώδικα, το οποίο αναπτύχθηκε στο National Institutes of Health των ΗΠΑ. Το ImageJ σχεδιάστηκε

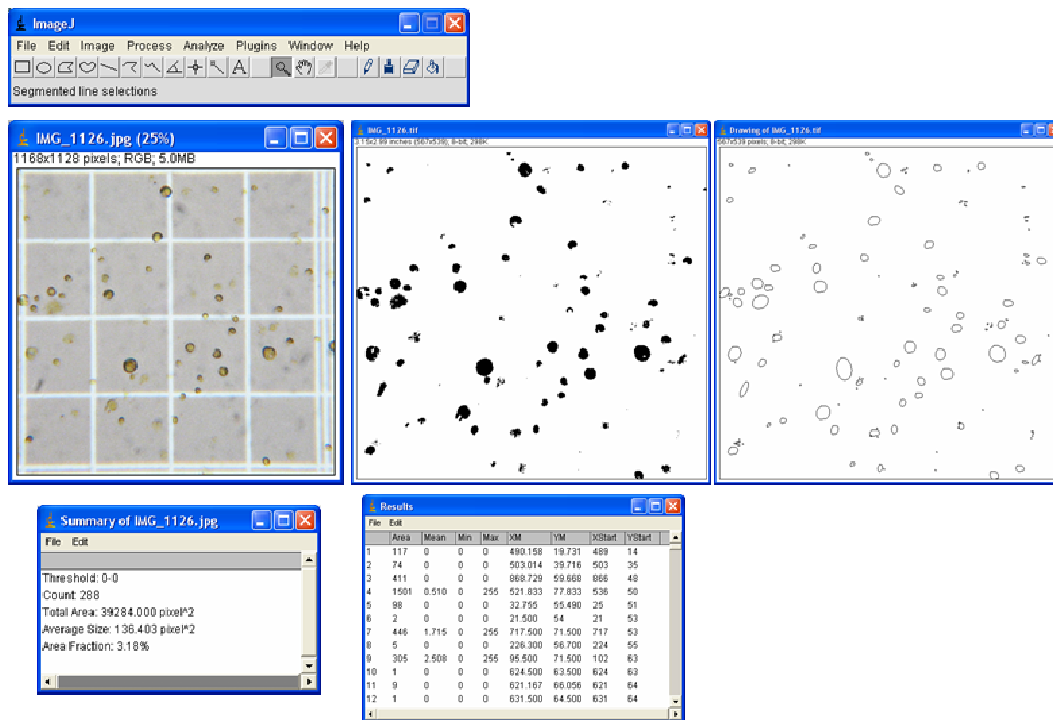
ώστε να προσφέρει τη δυνατότητα επέκτασης με πρόσθετα γραμμένα στη γλώσσα προγραμματισμού Java.

Πλεονεκτήματα του ImageJ έναντι άλλων πλατφόρμων λογισμικού:

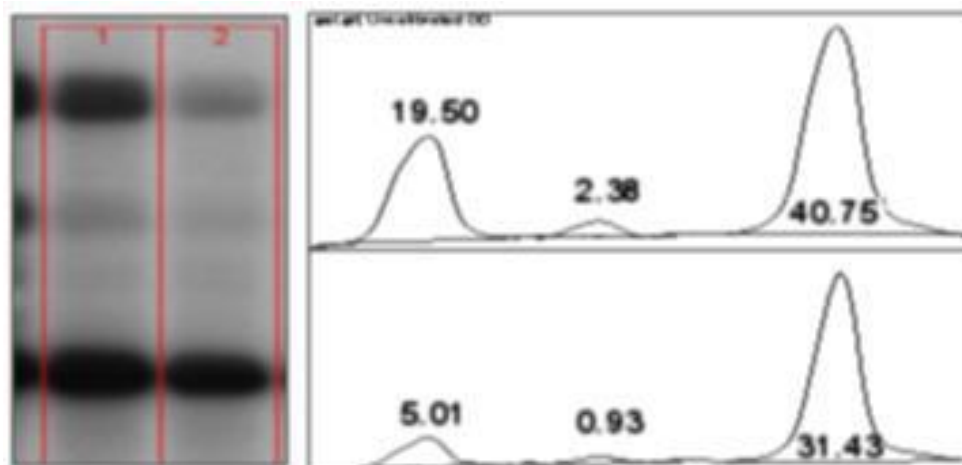
- Ελεύθερο λογισμικό ανοιχτού κώδικα. Το πρόγραμμα παρέχεται δωρεάν. Δεν απαιτείται κανενός είδους άδεια για τη χρήση του και τη δημοσίευση αποτελεσμάτων βασισμένων σε αυτό. Αντίστοιχα εμπορικά προγράμματα στοιχίζουν αρκετές εκατοντάδες έως χιλιάδες ευρώ, με επιπλέον κόστος δικαιωμάτων χρήσης για
- Κάθε ερευνητής έχει το δικαίωμα να κάνει οποιεσδήποτε τροποποιήσεις στο πρόγραμμα, χωρίς παραβίαση πνευματικών δικαιωμάτων.
- Το πρόγραμμα τρέχει σε όλα τα λειτουργικά συστήματα που υποστηρίζουν την πλατφόρμα Java (όλες τις εκδόσεις Windows, Mac OS, Mac OS X, Linux, Unix).
- Επεκτασιμότητα. Οι δυναμικές εφαρμογές είναι απεριόριστες, καθώς κάθε ερευνητής μπορεί να κατασκευάσει και να εκδώσει το δικό του πρόσθετο. Στην επίσημη σελίδα του ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) υπάρχουν αναρτημένα πάνω από 500 πρόσθετα. Στο ελεύθερο διαδίκτυο μπορεί κανείς να βρεί πολύ περισσότερα σε επιμέρους σελίδες πανεπιστημίων, ιδιωτών χρηστών ή ερευνητικών ομάδων.
- Ενθάρρυνση της επιστημονικής έρευνας. Υπάρχει πάρα πολύ καλή τεκμηρίωση και άπειρα παραδείγματα χρήσης και προγραμματισμού πρόσθετων. Με απλές γνώσεις προγραμματισμού, μπορεί κανείς εύκολα να εξειδικεύσει την εφαρμογή στις ειδικές ανάγκες της έρευνάς του. Οι δημιουργοί του ImageJ ενθαρρύνουν και υποστηρίζουν την ανάπτυξη νέων προσθέτων (προσωπική εμπειρία).
- Επιστημονική καταξίωση. Μια απλή αναζήτηση στη βάση δεδομένων Medline δίνει πάνω από 500 δημοσιεύσεις οι οποίες έχουν χρησιμοποιήσει το ImageJ για την ανάλυση εικόνας.

Το ImageJ έχει βρεί πλήθος εφαρμογών στις βιολογικές επιστήμες, όπως στην ανάλυση εικόνων οπτικής μικροσκοπίας (**Εικόνα 55**), ανάλυση ηλεκτροφορημάτων (**Εικόνα 56**), ανάλυση δεδομένων υπολογιστικής τομογραφίας (π.χ. τρισδιάστατη ανασύσταση, (**Εικόνα 57**), μετρήσεις σε ακτινογραφίες (**Εικόνα 58**).

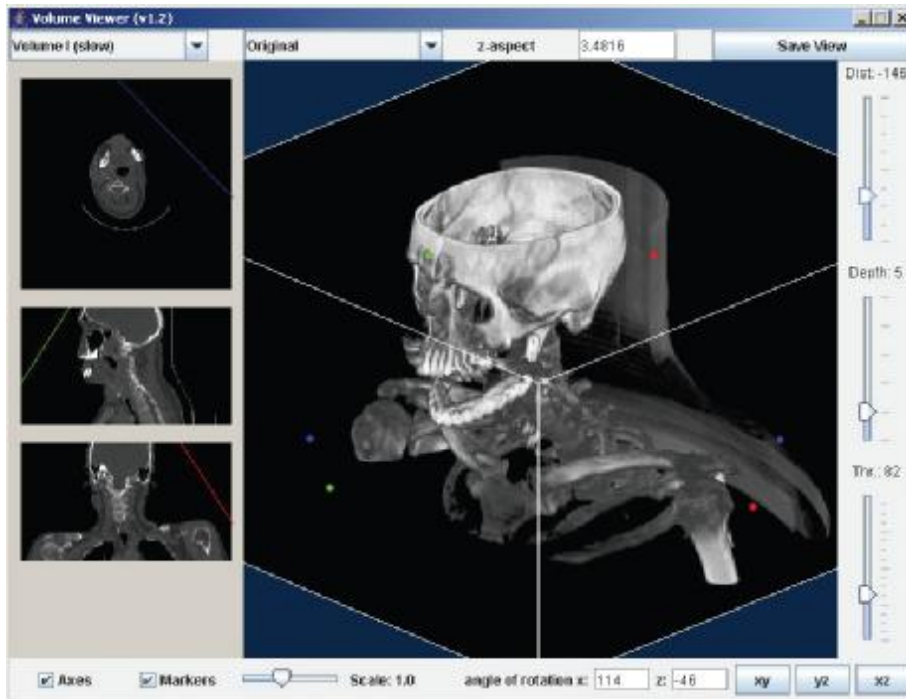
Στις **Εικόνες 55, 56, 57, 58** που ακολουθούν, παρουσιάζονται ορισμένα ενδεικτικά παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών του ImageJ στις βιολογικές επιστήμες.



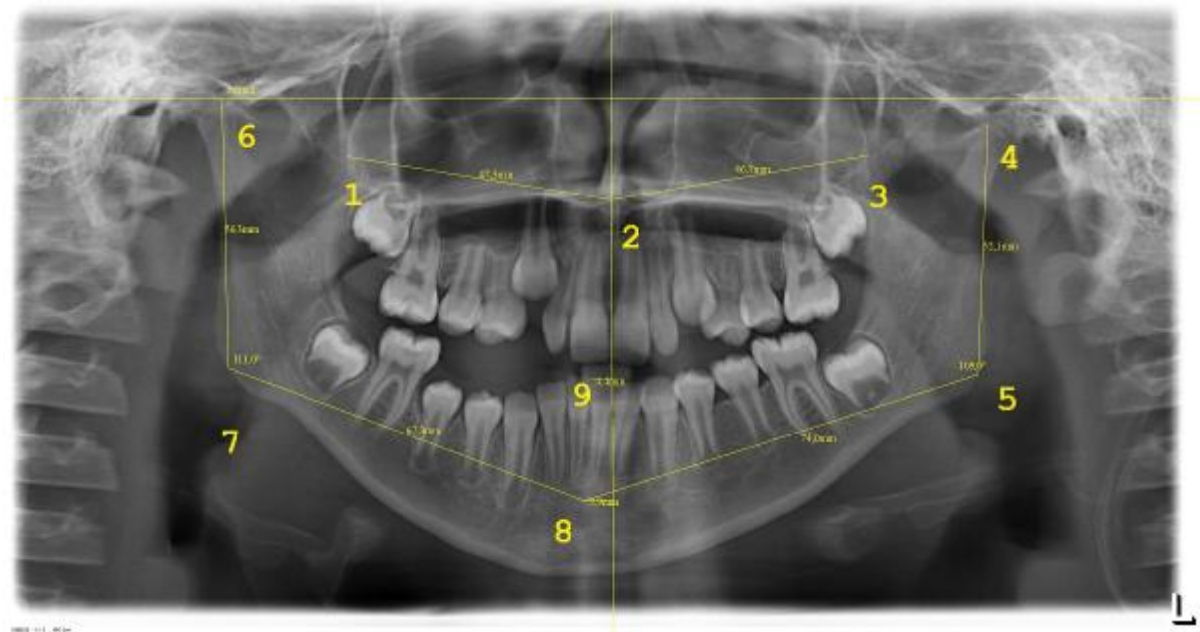
Εικόνα 55 Παράδειγμα εφαρμογής *ImageJ*: Αυτοματοποιημένη καταμέτρηση κυττάρων οπτικής μικροσκοπίας (από http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Collector/Cell_Counting)



Εικόνα 56 Παράδειγμα εφαρμογής *ImageJ*: Ανάλυση ηλεκτροφορημάτων (από <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html>)



Εικόνα 57 Παράδειγμα εφαρμογής ImageJ: Τρισδιάστατη ανασύσταση όγκου (3D volume rendering) από αξονική τομογραφία (από <http://imagej.nih.gov/ij/plugins/volume-viewer.html>)



Εικόνα 58 Παράδειγμα εφαρμογής ImageJ: Ημιαυτοματοποιημένες ακτινολογικές μετρήσεις (από <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/lemos-asymmetry-analysis/index.html>)

3.7.2 ΠΡΟΣΘΕΤΟ ImageJ “Map_BoneMicrostructure”

Για την ποσοτική χαρτογράφηση της μικροαρχιτεκτονικής των οστών στις σαρωμένες εικόνες, προγραμματίστηκε από το διατρίβοντα σε γλώσσα προγραμματισμού Java ένα σχετικό πρόσθετο (add-on), το οποίο ονομάστηκε Map_BoneMicrostructure. Το πρόσθετο έγινε αποδεκτό από την ομάδα υποστήριξης του ImageJ, και έχει προστεθεί στη λίστα προσθέτων στην επίσημη ιστοσελίδα του NIH (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins>). Ο πλήρης κώδικας παρατίθεται στο Παράρτημα.

Παρακάτω θα περιγραφεί η φιλοσοφία του αλγορίθμου του προγράμματος με χαρακτηριστικές εικόνες από τα επιμέρους στάδια της επεξεργασίας της εικόνας. Επίσης παρατίθενται ονομαστικά οι ορισμένες σημαντικές μεταβλητές του κώδικα Java, ώστε να είναι ακόμα πιο κατανοητή η παρακολούθηση του αλγορίθμου στον πρωτότυπο κώδικα.

ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο της οστικής ιστομορφομετρίας στο Γενικό Μέρος, η οστική ιστομορφομετρία βάσει του μοντέλου των παραλλήλων πλακών προϋποθέτει ορισμένες πρωτογενείς μετρήσεις στις δισδιάστατες εικόνες, βάσει των οποίων προκύπτουν μαθηματικά συμπεράσματα για την τρισδιάστατη δομή. Για την κλασσική οστική ιστομορφομετρία απαιτούνται τρεις πρωτογενείς μετρήσεις επί της δισδιάστατης εικόνας, βάσει των οποίων προκύπτουν μαθηματικά όλες οι υπόλοιπες παράμετροι.

Ο αλγόριθμος επεξεργασίας εικόνας σχεδιάστηκε ώστε να μετρώνται πρωτογενώς οι παρακάτω τρεις παράμετροι:

B.Ar μm^2 (bone area):	εμβαδόν που καταλαμβάνεται από το σύνολο των οστεοδοκίδων
B.Pm μm (bone perimeter)	περίμετρος του συνόλου των οστεοδοκίδων
T.Ar μm^2 (tissue area):	συνολικό εμβαδόν του ιστού (δηλ. το εμβαδό του οπτικού πεδίου)

3.7.2.α) Βήμα 1 - Κατωφλιοποίηση (thresholding)

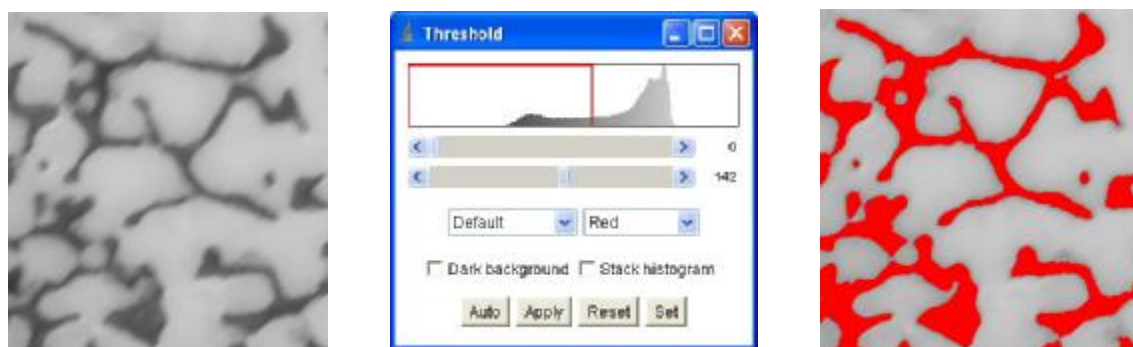
Η εικόνα που προκύπτει από τη σάρωση του δοκιμίου είναι σε κλίμακα του γκριζου με τιμές εικονοστοιχείων 0-255 (0 = μαύρο, 255 άσπρο). Το πρώτο στάδιο της ανάλυσης εικόνας είναι η **κατωφλιοποίηση** (ή δυαδοποίηση - binarization), δηλ. ο διαχωρισμός των εικονοστοιχείων σε αντικείμενα και υπόβαθρο, καθορίζοντας μια τιμή γκριζου ως κατώφλι.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι κατωφλιοποίησης⁶⁰ (ονομαστικά αναφέρονται οι: Huang, Intermodos, IsoData, Li, MaxEntropy, Mean, MinError(I), Minimum, Moments, Otsu, Percentile, RenyiEntropy, Shanbhag, Triangle, Yen), κάθε μια εκ των οποίων έχει τη δική της φιλοσοφία, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ανάλογα με το εκάστοτε πεδίο εφαρμογής (φωτογραφία, μικροσκόπηση, φασματογραφία κλπ).

Στην παρούσα εφαρμογή ακολουθήθηκε αλγόριθμος κατωφλιοποίησης ISODATA - Iterative Self-Organizing Data Analysis Technique, ο οποίος είναι ο προκαθορισμένος (default) του προγράμματος ImageJ. Στη βιβλιογραφία έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό οστού από υπόβαθρο σε εικόνες αξονικής τομογραφίας^{61,62,63,64}. Πρόκειται για τη μη επιβλεπόμενη διαδικασία πολλαπλών διελεύσεων (πολλαπλές σειριακές δοκιμές τιμών κατωφλίου) έως ότου ικανοποιηθεί η συνθήκη:

$$[kat\acute{o}fli] = \frac{[m.o.eikonostoiceíwn\ up\acute{o}baqrou] + [m.o.eikonostoiceíwn\ antikeiménou]}{2}$$

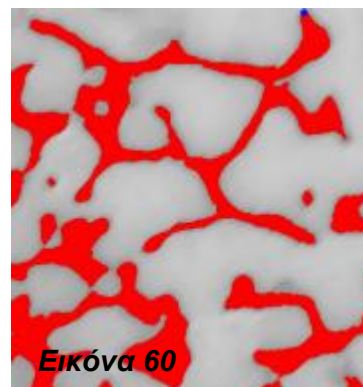
Με τον τρόπο αυτή επιτυγχάνεται η κατά μέσο όρο μέγιστη αντίθεση μεταξύ αντικειμένου (οστεοδοκίδων) και υπόβαθρου. **(Εικόνα 59)**



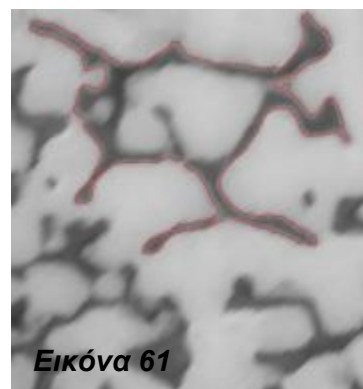
Εικόνα 59 Κατωφλιοποίηση ενός τμήματος σαρωμένης επιφάνειας σπογγώδους οστού. Η αυτοματοποιημένη διαδικασία ISODATA καθορίζει την τιμή κατωφλίου στο ιστόγραμμα κατανομής εικονοστοιχείων, η οποία δίνει την κατά μέσο όρο μέγιστη αντίθεση.

3.7.2.β) Βήμα 2 - Ανίχνευση οστεοδοκίδας

Η εικόνα σαρώνεται σημείο προς σημείο με κατεύθυνση από αριστερά προς τα δεξιά, και από επάνω ως κάτω, έως ότου εντοπιστεί το πρώτο έγκυρο εικονοστοιχείο κάτωθεν του κατωφλίου, δηλ. εικονοστοιχείο που ανήκει σε οστεοδοκίδα (σημειωμένο ως έντονη μπλε κουκκίδα). **(Εικόνα 60)**



Με τη βοήθεια του εργαλείου Wand («μαγικό ραβδί») ιχνηλατείται το εξωτερικό περίγραμμα της οστεοδοκίδας. Για το πρόγραμμα ImageJ, αυτό περίγραμμα αυτό θεωρείται ως μια πολυγωνική περιοχή ενδιαφέροντος (PolygonRoi, Polygon-Region-Of-Interest). **(Εικόνα 61)**



Η περίμετρος αυτή καταγράφεται ως «εξωτερική περίμετρος» (**externalPerimeter**).

ΣΧΟΛΙΟ σχετικά με την έννοια «Περίμετρος Οστεοδοκίδων»

Όπως έχει αναφερθεί, η περίμετρος του συνόλου των οστεοδοκίδων (**B.Pm. – Bone Perimeter**) αποτελεί μία από τις τρεις πρωτογενείς μετρήσεις που πρέπει να πραγματοποιηθούν επί της δισδιάστατης εικόνας. Ωστόσο ως περίμετρος δεν εννοείται μόνο η παραπάνω εξωτερική περίμετρος, αλλά ουσιαστικά όλο το μήκος επαφής οστού-μυελού. Αυτό σημαίνει ότι για την ολοκλήρωση της μέτρησης, πρέπει να ληφθούν υπόψη τυχόν περικλειόμενα κενά μέσα στη διατομή μιας οστεοδοκίδας.

Παρακάτω περιγράφεται ο αλγόριθμος ανίχνευσης και μέτρησης της εσωτερικής περιμέτρου των οστεοδοκίδων, δηλ. το μήκος των τυχόν εσωτερικών κενών.

2.7.2.γ) Βήμα 3 - Ανίχνευση εσωτερικών κενών

Εντός της πολυγωνικής περιοχής ενδιαφέροντος, ανιχνεύονται όλα τα έγκυρα σημεία, και δημιουργείται μια «μάσκα οστεοδοκίδας», δηλ. τα εν λόγω σημεία βάφονται λευκά σε ένα μαύρο υπόβαθρο (maskTracedRect_WithHoles). ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Με την τεχνική αυτή η τρέχουσα οστεοδοκίδα απομονώνεται από τυχόν άλλες γειτονικές οστεοδοκίδες εντός του περιγεγραμμένου ορθογώνιου (tracedRect). **(Εικόνα 62)**

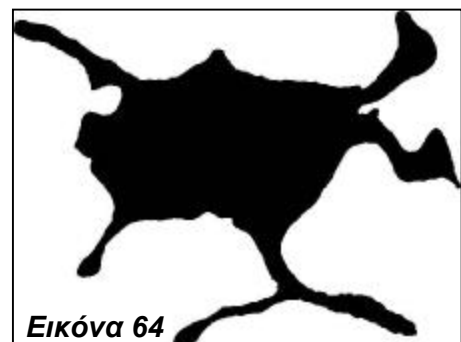


Από τη μάσκα αυτή μπορεί ήδη να υπολογιστεί η πρώτη από τις τρεις πρωτογενείς μετρήσεις, συγκεκριμένα το εμβαδό της οστεοδοκίδας **B.Ar.** (**Bone Area**)

Με ένα απλό γέμισμα του περιγράμματος παράγεται μια δεύτερη μάσκα εντός του περιγράμματος, στην οποία δεν λαμβάνονται υπόψη τυχόν εσωτερικά κενά (maskTracedRect_WithoutHoles). **(Εικόνα 63)**



Το αρνητικό της άνω μάσκας είναι ουσιαστικά μια μάσκα του χώρου γύρω από την οστεοδοκίδα (maskTracedRect_Background). **(Εικόνα 64)**

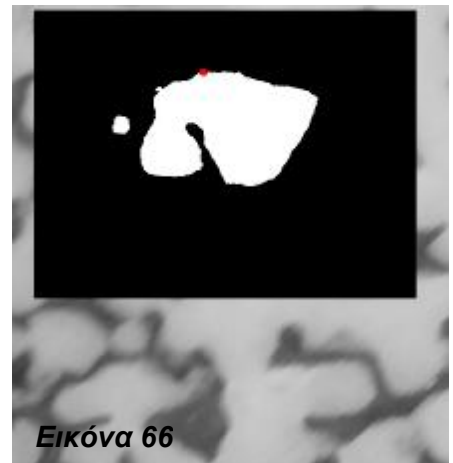


Η επιπροβολή της μάσκας οστεοδοκίδας (maskTracedRect_WithHoles) και της μάσκας υπόβαθρου (maskTracedRect_Background) επί της αρχικής εικόνας, απομονώνει τυχόν εσωτερικούς κενούς χώρους εντός της διατομής της οστεοδοκίδας. **(Εικόνα 65)**

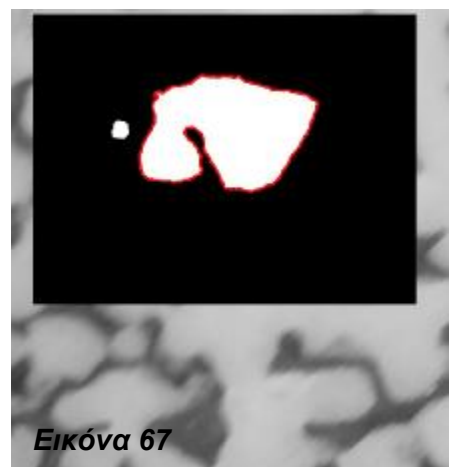
Οι κενοί αυτοί χώροι φαίνονται ως λευκές περιοχές σε μαύρο υπόβαθρο.



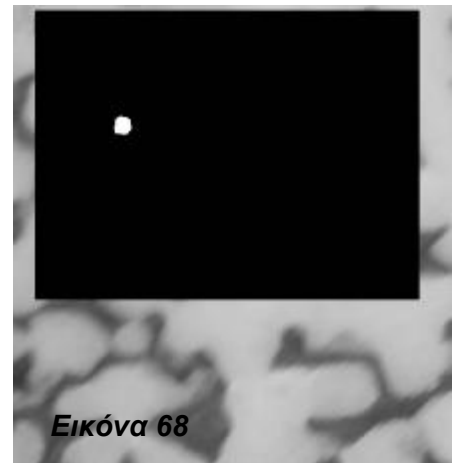
Το περιγεγραμμένο ορθογώνιο σαρώνεται σημείο προς σημείο για τον εντοπισμό των εσωτερικών κενών (κόκκινη κουκκίδα). **(Εικόνα 66)**



Με τη βοήθεια του εργαλείου Wand («μαγικό ραβδί») ιχνηλατείται το περίγραμμα του πρώτου ανιχνευθέντος κενού, και καταγράφεται η περίμετρός του. Η περίμετρος αυτή προστίθεται στην «εσωτερική περίμετρο» της οστεοδοκίδας (**internalPerimeter_{ΚΕΝΟ_1}**). **(Εικόνα 67)**



Το ανιχνευμένο κενό «αφαιρείται» (πληρούται με το μαύρο χρώμα του υποστρώματος, κλίμακα γκρίζου = 0), έτσι ώστε τυχόν άλλα εμπλεκόμενα κενά να παραμένουν ως λευκοί χώροι σε μαύρο υπόβαθρο. (Εικόνα 68)



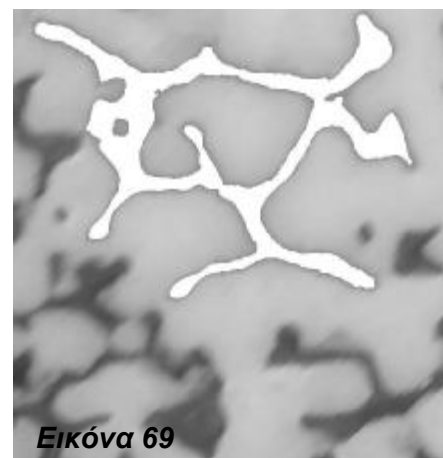
Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, έως ότου ανιχνευθούν και μετρηθούν όλα τα κενά. Σε κάθε κύκλο η υπολογιζόμενη περίμετρος κενού προστίθεται στην «εσωτερική περίμετρο» της οστεοδοκίδας. Όταν ολοκληρωθεί η ανίχνευση των κενών, μπορεί πλέον να προσδιοριστεί η πρωτογενής μέτρηση **B.Pm. (Bone Perimeter)**, προσθέτοντας την «εξωτερική περίμετρο» της οστεοδοκίδας (βλ. Εικόνα 60) με το σύνολο των «εσωτερικών περιμέτρων» των κενών.

$$\text{B.Pm}_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑΣ}} = \text{externalPerimeter} + \text{internalPerimeter}_{\text{ΚΕΝΟ}_1} + \text{InternalPerimeter}_{\text{ΚΕΝΟ}_2} + \dots + \text{InternalPerimeter}_{\text{ΚΕΝΟ}_v}$$

2.7.2.δ) Βήμα 4 - Αφαίρεση επεξεργασμένης οστεοδοκίδας, επανεκκίνηση αλγορίθμου

Εν συνεχεία η μάσκα οστεοδοκίδας (maskTracedRect_WithHoles) «αφαιρείται» από την αρχική εικόνα, πληρούμενη με λευκό χρώμα (κλίμακα γκρίζου = 255).

Ο αλγόριθμος επανεκκινείται προς ανίχνευση και επεξεργασία της επόμενης οστεοδοκίδας. Μία προς μία όλες οι οστεοδοκίδες της εικόνας ανιχνεύονται, επεξεργάζονται και «αφαιρούνται» από την εικόνα, έως ότου εξαντληθούν όλα τα εικονοστοιχεία με πυκνότητα οστού.



2.7.2.ε) Βήμα 5 - Τελικοί υπολογισμοί

Με τον παραπάνω αλγόριθμο, ανιχνεύονται και επεξεργάζονται μία προς μία όλες οι οστεοδοκίδες, για κάθε μια από τις οποίες υπολογίζεται το εμβαδόν **B.Ar. (Bone Area)** και η περίμετρος **B.Pm. (Bone Perimeter)**. Οι πρωτογενείς μετρήσεις για το σύνολο της εικόνας προκύπτουν από το άθροισμα των μετρήσεων των επιμέρους οστεοδοκίδων.

$$\mathbf{B.Ar_{\Sigma\text{ΝΟΛΙΚΗ}} = B.Ar_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑ}_1} + B.Ar_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑ}_2} + \dots + B.Ar_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑ}_N} +}$$

$$\mathbf{B.Pm_{\Sigma\text{ΝΟΛΙΚΗ}} = B.Pm_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑ}_1} + B.Pm_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑ}_2} + \dots + B.Pm_{\text{ΟΣΤΕΟΔΟΚΙΔΑ}_N} +}$$

Η τρίτη πρωτογενής μέτρηση **T.Ar. (Tissue Area)** είναι το συνολικό εμβαδό του ιστού, δηλ. το εμβαδό της σαρωμένης εικόνας.

$$\mathbf{T.Ar_{\Sigma\text{ΝΟΛΙΚΗ}} = \text{ΜήκοςΕικόνας} \times \text{ΠλάτοςΕικόνας}}$$

Οι παραπάνω μετρήσεις γίνονται αρχικά σε εικονοστοιχεία. Για την μετατροπή τους σε πραγματικά μεγέθη, απαιτείται η σχετική αντιστοίχιση βάσει των στοιχείων σάρωσης των πρωτότυπων εικόνων. Έτσι π.χ. μια ανάλυση σάρωσης 4800 DPI (dots per inch) δίνει μέγεθος εικονοστοιχείου 5,29 μm .

Όπως αναφέρθηκε στο Γενικό Μέρος – Οστική Ιστομορφομετρία, οι παράμετροι της οστικής μικροαρχιτεκτονικής συνδέονται μεταξύ τους με μαθηματικές σχέσεις, που προκύπτουν βάσει του γεωμετρικού μοντέλου των παράλληλων πλακών. Αυτές είναι οι παρακάτω:

BV/TV % (bone volume/total volume) ποσοστό όγκου ιστού που καταλαμβάνεται από οστεοδοκίδες

$$= \frac{B.Ar.}{T.Ar.}$$

Tb.Th μm (trabecular thickness) μέσο πάχος οστεοδοκίδων

$$= 2 \times \frac{B.Ar.}{B.Pm.}$$

Tb.Sp μm (trabecular spacing) μέση απόσταση μεταξύ οστεοδοκίδων

$$= 2 \times \frac{(T.Ar. - B.Ar.)}{B.Pm.}$$

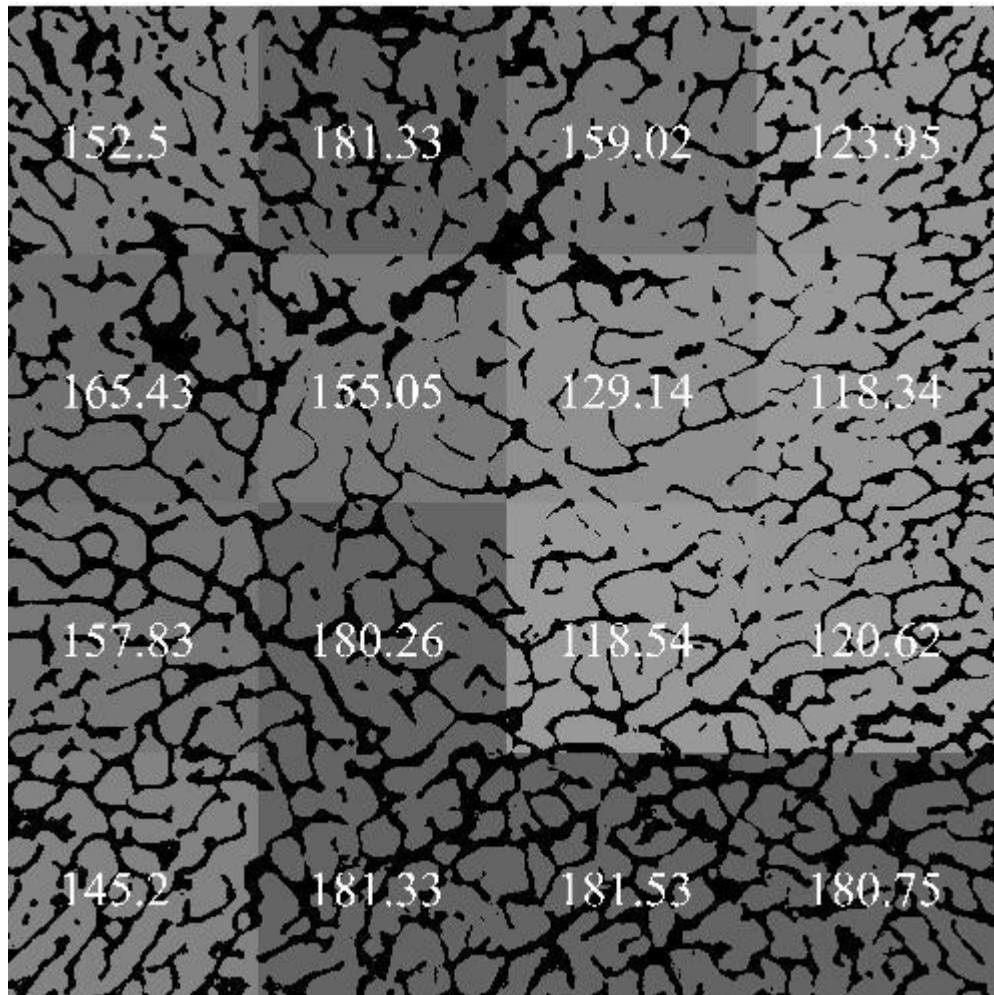
Tb.N mm^{-1} (trabecular number) μέσο πλήθος δοκίδων ανά mm

$$= \frac{1}{2} \times \frac{B.Pm.}{T.Ar.}$$

2.7.2.στ) Βήμα 6 - Χαρτογράφηση της Οστικής Μικροαρχιτεκτονικής

Το πρόσθετο Map_BoneMicrostructure κατασκευάστηκε ώστε να μπορεί να χαρτογραφεί την κατανομή οποιασδήποτε από τις άνω παραμέτρους επί της εξετασθείσας επιφάνειας. Αυτό γίνεται ως εξής:

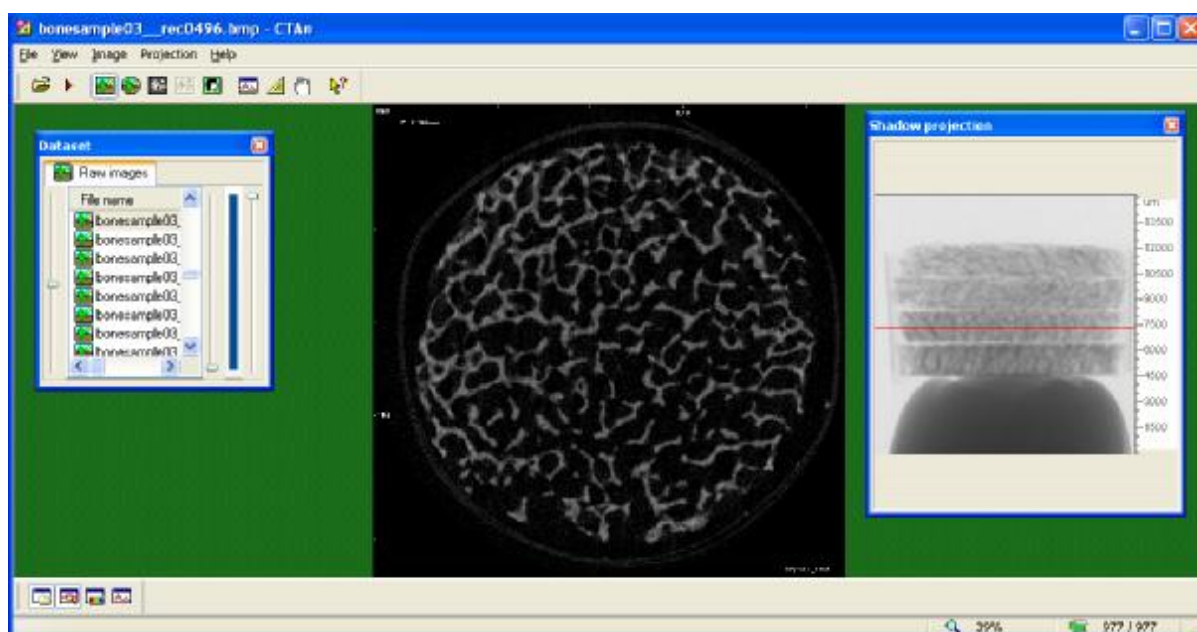
- 1) Η εικόνα διαιρείται σε τετραγωνίδια τα οποία ορίζονται από το χρήστη
- 2) Για κάθε τετραγωνίδιο υπολογίζονται οι παράμετροι BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp., Tb.N.
- 3) Ο χρήστης επιλέγει την παράμετρο ως προς την οποία θα χαρτογραφηθεί η εικόνα
- 4) Παράγεται μια νέα εικόνα, στην οποία το χρώμα υπόβαθρου κάθε τετραγωνίδιου διαβαθμίζεται ανάλογα με το ύψος της παραμέτρου, ενώ η καθεαυτή τιμή επιπροβάλλεται στο κέντρο (**Εικόνα 70**).



Εικόνα 70 Παράδειγμα χαρτογράφησης της παραμέτρου Tb.Th. (Trabecular Thickness) σε ένα τμήμα διατομής μηριαίας κεφαλής.

3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΙΚΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΝΑΝΤΙ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΜΕ MicroCT

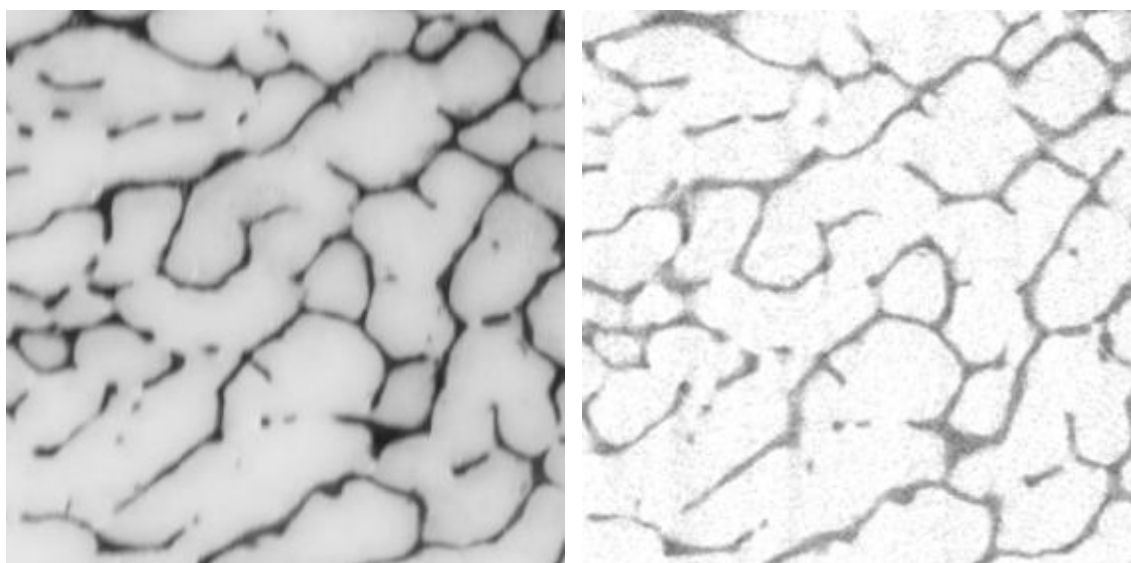
Για την τεκμηρίωση της αξιοπιστίας της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας, σχεδιάστηκε η σύγκριση αποτελεσμάτων έναντι της καθιερωμένης τεχνικής microCT. Από διατομές οχτώ μηριαίων κεφαλών, ελήφθη από ένας κύλινδρος διαμέτρου 10 mm και πάχους 1,8 mm. Οι κύλινδροι αυτοί ομαδοποιήθηκαν σε δύο στοίβες των τεσσάρων και σαρώθηκαν σε μηχάνημα microCT (SkyScan Model 1072; Aartselaar, Belgium), με τα εξής στοιχεία σάρωσης: Source 100kV / 98uA, Rotation step = 0.9000, cross-section pixel size



14.905428 μm . (Εικόνα 71)

Εικόνα 71 Παράδειγμα μιας εγκάρσιας διατομής (κέντρικό παράθυρο) από τη στοίβα οστικών κυλίνδρων, όπως σαρώθηκε στο μηχάνημα μικροαξονικής τομογραφίας. Δεξιά η σκιάδης προβολή (shadow projection) της στοίβας των τεσσάρων σαρωμένων κυλίνδρων.

Στη συνέχεια οι οχτώ οστικοί κύλινδροι υπεβλήθησαν σε πλήρη υλικογραφική επεξεργασία όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Από τα δεδομένα σάρωσης microCT του κάθε κυλίνδρου, επιλέχθηκε η διατομή εκείνη η οποία κατά τη μέγιστη προσέγγιση προσομοιάζει την εικόνα που παρασκευάστηκε υλικογραφικά (Εικόνα 72).



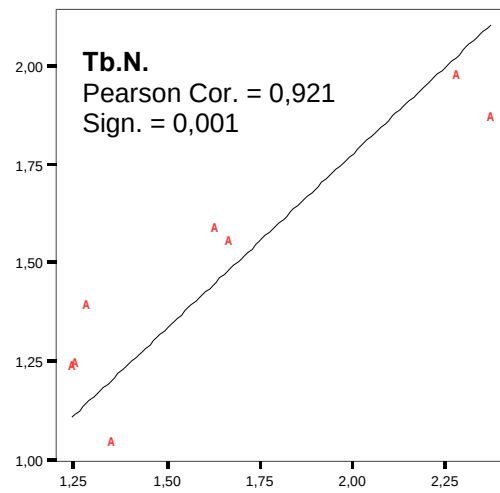
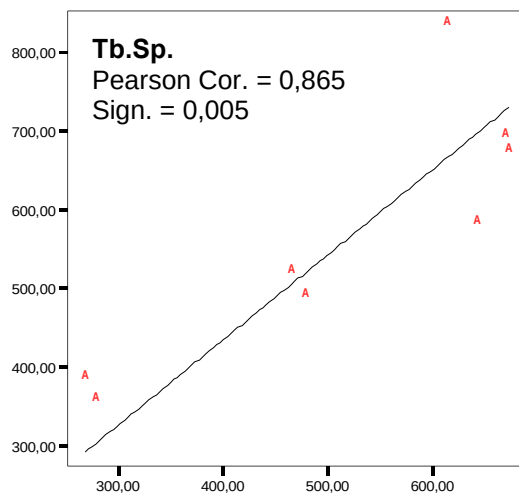
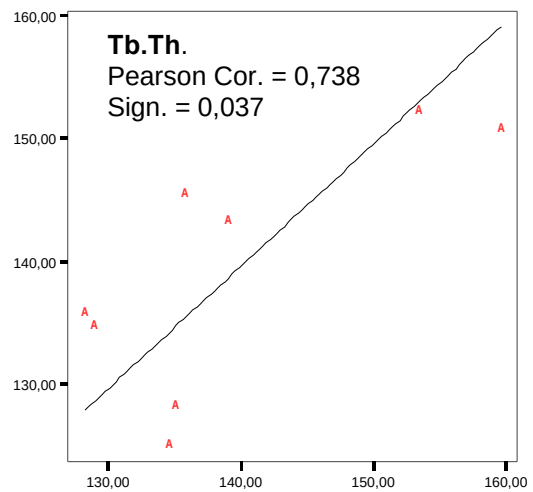
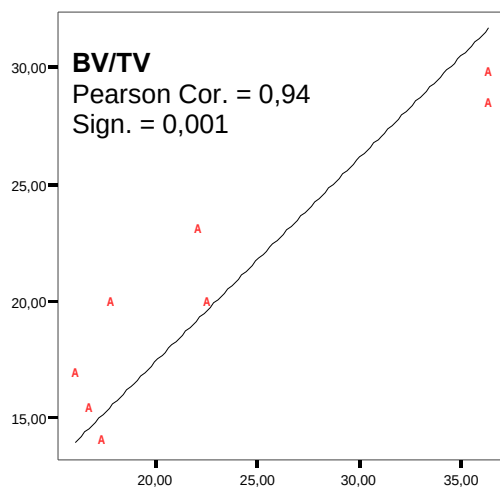
Εικόνα 72 Αντιπαραβολή των εικόνων που παρήχθησαν με τις δύο διαφορετικές μεθοδολογίες στο ίδιο δείγμα: Αριστερά εικόνα από την υλικογραφική επεξεργασία, δεξιά εικόνα από την αντίστοιχη διατομή στην microCT.

Για κάθε δείγμα υπολογίστηκαν οι τυπικές παράμετροι οστικής μικροαρχιτεκτονικής (BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp., Tb.N.) ξεχωριστά στη διατομή υλικογραφίας και στη διατομή από microCT. **(Πίνακας 2)**

Πίνακας 2 Παράμετροι οστικής μικροαρχιτεκτονικής υπολογισμένοι σε κάθε δείγμα με τη μεθοδολογία της υλικογραφίας και με microCT.

	BV/TV % (Υλικ/φία)	BV/TV % (μCT)	TbTh μm (Υλικ/φία)	TbTh μm (μCT)	TbSp μm (Υλικ/φία)	TbSp μm (μCT)	TbN /mm (Υλικ/φία)	TbN /mm (μCT)
Δείγμα 1	15,28013	16,75306	124,71448	134,55477	691,47274	668,61051	1,22521	1,24507
Δείγμα 2	16,73848	16,03504	135,46107	128,21345	673,81839	671,36956	1,23567	1,25065
Δείγμα 3	13,8915	17,37878	134,45293	128,97217	833,42644	613,15245	1,03319	1,34748
Δείγμα 4	19,77708	17,82029	143,04284	139,00229	580,23301	641,0205	1,3826	1,28201
Δείγμα 5	19,79254	22,52528	127,98408	135,09019	518,64388	464,6367	1,54648	1,66743
Δείγμα 6	22,91075	22,10917	145,19647	135,75269	488,55173	478,25813	1,57791	1,62864
Δείγμα 7	28,27115	36,35616	151,89747	153,39945	385,39051	268,53583	1,8612	2,37003
Δείγμα 8	29,64857	36,37139	150,47958	159,60322	357,06462	279,21201	1,97027	2,27886

Για κάθε παράμετρο υπολογίστηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης Pearson, χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS v.10. Για όλες τις παραμέτρους η συσχέτιση ήταν στατιστικά σημαντική.



4. ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΜΗ-ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΩΝ ΚΕΦΑΛΩΝ ΜΗΡΙΑΙΟΥ

Προς επίδειξη των δυνατοτήτων της μεθόδου ταχείας υλικογραφικής χαρτογράφησης της μικροαρχιτεκτονικής των οστών, πραγματοποιήθηκε μια πιλοτική σύγκριση των παραμέτρων οστικής ιστομορφομετρίας μεταξύ δώδεκα (12) οστεοαρθριτικών κεφαλών μηριαίου έναντι δώδεκα (12) μη οστεοαρθριτικών κεφαλών. Η παρακάτω σύγκριση έχει ενδεικτικό χαρακτήρα και όχι επιστημονικό διότι πραγματοποιήθηκε με κεφαλές μηριαίων από το διαθέσιμο αρχειακό υλικό, χωρίς τυχαιοποίηση και χωρίς βασικές κλινικές πληροφορίες (π.χ. προεγχειρητικές ακτινογραφίες, κλινικό ιστορικό, προηγηθείσες θεραπείες/ εγχειρήσεις κλπ).

4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

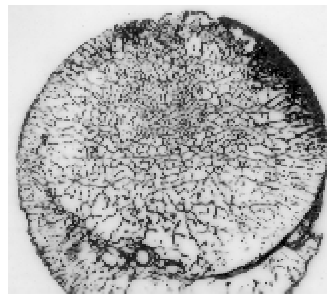
Η ομαδοποίηση έγινε με μακροσκοπικά κριτήρια (ομοιομορφία χόνδρου και σφαιρικότητα κεφαλής). Από κάθε κεφαλή παρασκευάστηκε μια εγκάρσια διατομή στο επίπεδο της μέγιστης διαμέτρου. Η διατομή υπεβλήθη σε τυπική υλικογραφική επεξεργασία, και η κεχρωσμένη εικόνα χαρτογραφήθηκε ως προς τις βασικές ιστομορφομετρικές παραμέτρους (BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp., Tb.N.).

Ακολουθούν δύο ενδεικτικά παραδείγματα χαρτογραφησης από μια οστεοαρθριτική (**Εικόνες 73, 74, 75, 76**) και μία μη οστεοαρθριτική κεφαλή μηριαίου (**Εικόνες 77, 78, 79, 80**).

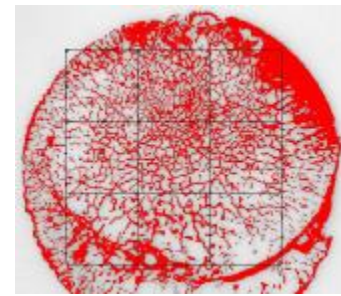
4.2.1 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΗΣ ΚΕΦΑΛΗΣ (ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ)



Εικ.73 Μακροσκοπική άποψη

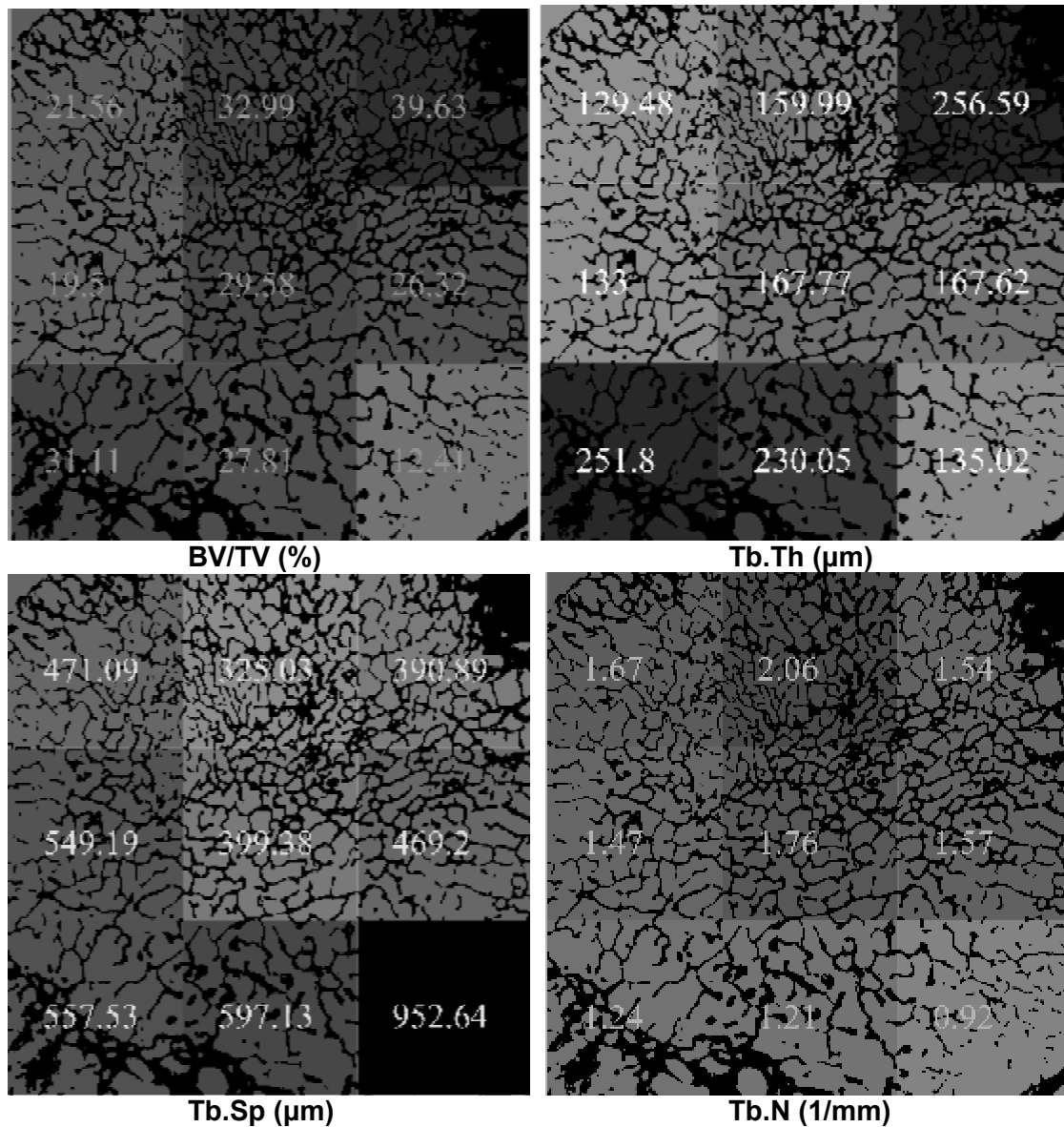


Εικ. 74 Ψηφιοποίηση της διατομής



Εικ.75 Διαίρεση σε τετραγωνίδια των 10 mm

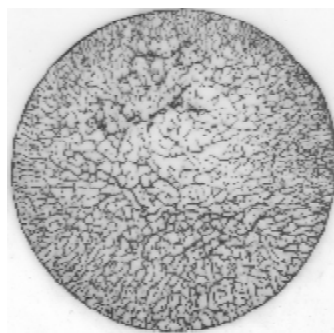
Εικόνα 76 Χαρτογράφηση της κατανομής των ιστομορφομετρικών παραμέτρων στην επιφάνεια διατομής, με αντίστοιχη διαβάθμιση γκρίζου σε κάθε τετραγωνίδιο.



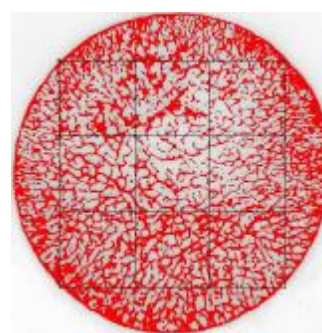
4.2.2 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΜΗ-ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΗΣ ΚΕΦΑΛΗΣ (ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ)



Εικ. 77 Μακροσκοπική άποψη

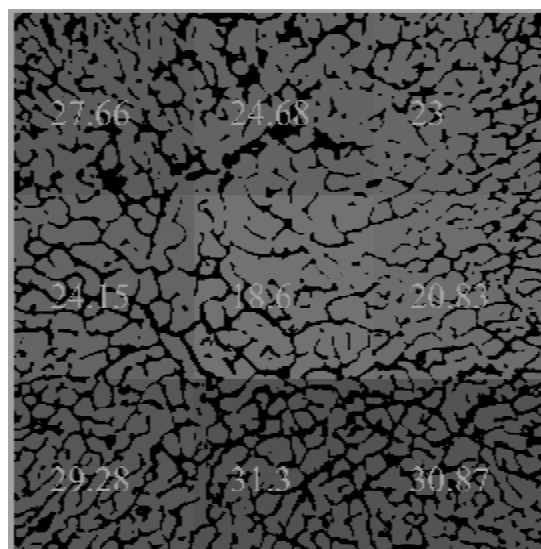


Εικ. 78 Ψηφιοποίηση της διατομής

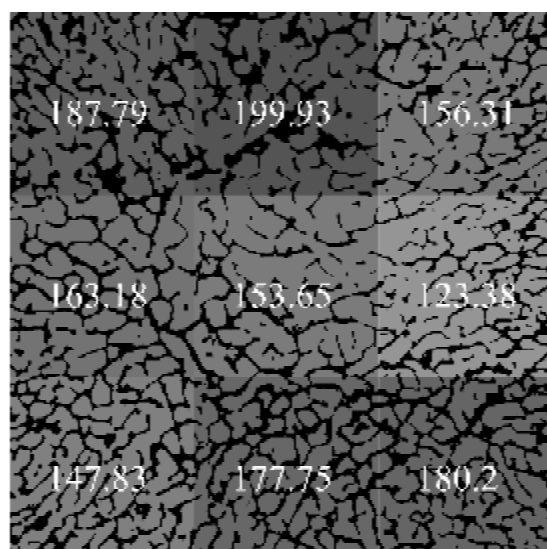


Εικ.79 Διαίρεση σε τετραγωνίδια των 10 mm

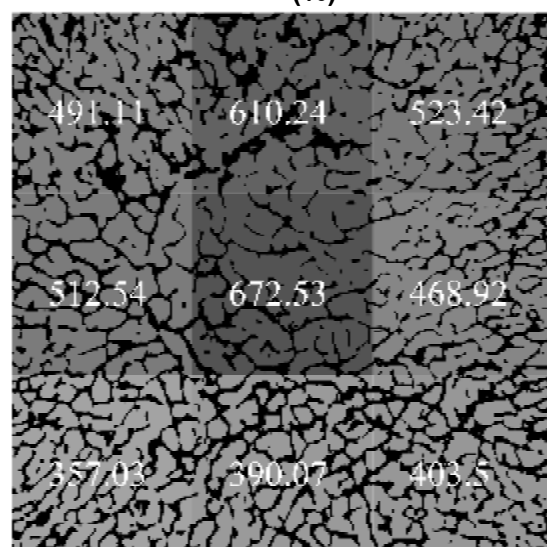
Εικόνα 80 Χαρτογράφηση της κατανομής των ιστομορφομετρικών παραμέτρων στην επιφάνεια διατομής, με αντίστοιχη διαβάθμιση γκρίζου σε κάθε τετραγωνίδιο.



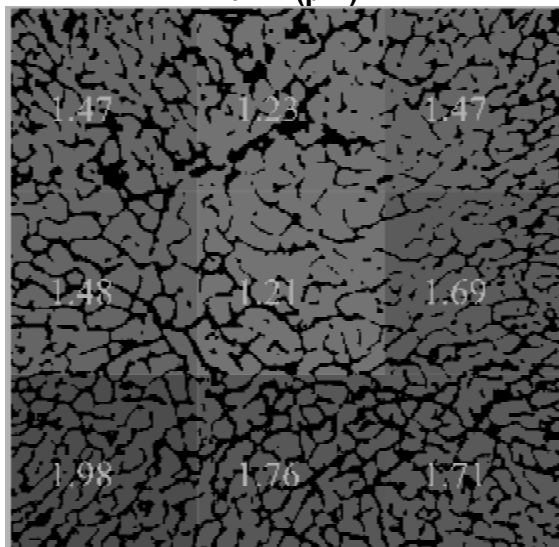
BV/TV (%)



Tb.Th (μm)



Tb.Sp (μm)



Tb.N (1/mm)

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον **Πίνακα 3** συνοψίζονται οι μέσοι όροι των ιστομορφομετρικών μετρήσεων σε κάθε μία από τις οστεοαρθρικές μηριαίες κεφαλές.

Πίνακας 3 Οστεοαρθρικές κεφαλές

ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΕΣ ΚΕΦΑΛΕΣ				
	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.Sp (μm)	Tb.N (1/mm)
Δείγμα 01	26,77	181,26	523,56	1,56
Δείγμα 02	17,48	147,77	707,08	1,18
Δείγμα 03	26,06	191,21	552,72	1,35
Δείγμα 04	20,82	164,26	690,84	1,41
Δείγμα 05	35,03	220,96	415,02	1,61
Δείγμα 06	36,76	243,46	512,50	1,54
Δείγμα 07	35,10	213,34	615,10	1,64
Δείγμα 08	25,57	174,26	518,49	1,46
Δείγμα 09	35,33	185,43	632,54	1,59
Δείγμα 10	31,40	214,43	732,23	1,32
Δείγμα 11	30,43	196,13	692,32	1,43
Δείγμα 12	27,54	169,43	639,32	1,75
M.O.	29,03	191,83	602,64	1,49

Στον **Πίνακα 4** συνοψίζονται οι μέσοι όροι των ιστομορφομετρικών μετρήσεων σε κάθε μία από τις μη-οστεοαρθρικές μηριαίες κεφαλές.

Πίνακας 4 Μη-οστεοαρθρικές κεφαλές

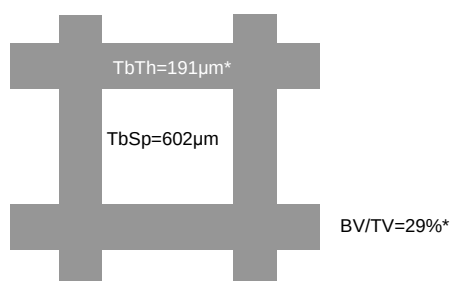
ΜΗ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΚΕΣ ΚΕΦΑΛΕΣ				
	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.Sp (μm)	Tb.N (1/mm)
Δείγμα 13	23,19	151,88	688,44	1,53
Δείγμα 14	26,79	160,15	639,50	1,36
Δείγμα 15	19,69	157,47	548,60	1,47
Δείγμα 16	21,58	163,96	630,61	1,62
Δείγμα 17	25,58	164,48	490,47	1,56
Δείγμα 18	24,25	146,51	468,15	1,64
Δείγμα 19	17,33	113,81	563,18	1,52
Δείγμα 20	23,14	170,89	584,77	1,42
Δείγμα 21	33,20	176,08	564,07	1,20
Δείγμα 22	20,46	158,46	449,40	1,59
Δείγμα 23	22,34	168,44	532,54	1,34
Δείγμα 24	24,43	141,39	443,49	1,42
M.O.	23,50	156,13	550,27	1,47

Από τη σύγκριση των παραμέτρων μεταξύ οστεοαρθρικών και μη οστεοαρθρικών κεφαλών, προκύπτει ότι οι οστεοαρθρικές κεφαλές έχουν κατά μέσο όρο παχύτερες και αραιότερες οστικές δοκίδες στη σπογγώδη δομή.

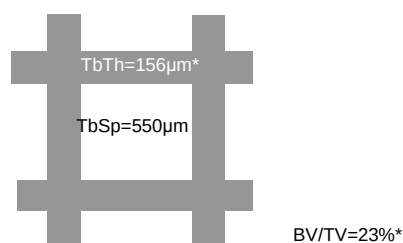
Οι τέσσερις μετρηθείσες παράμετροι (BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp, Tb.N) υπεβλήθησαν στη στατιστική δοκιμασία σύγκρισης μέσων όρων Student's t-test μεταξύ των δύο ομάδων. Η στατιστική επεξεργασία ανέδειξε στατιστικά σημαντικές τις διαφορές στις τιμές **BV/TV** ($p < 0,05$) και **Tb.Th** ($p < 0,05$).

Οι διαφορές που αναδείχθηκαν είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία.⁶⁵ Οι παραπάνω διαφορές στις μέσες τιμές των παραμέτρων οστικής μικροαρχιτεκτονικής των οστεοδοκίδων απεικονίζονται σχηματικά στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 81**):

Οστεοαρθριτική Κεφαλή



Μη Οστεοαρθριτική Κεφαλή



* Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$)

Εικόνα 81 Σχηματικό διάγραμμα των μέσων όρων παραμέτρων ιστομορφομετρίας μεταξύ δοκίδων οστεοαρθριτικών και μη οστεοαρθριτικών κεφαλών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάλυση της μικροαρχιτεκτονικής των οστών προϋποθέτει την επεξεργασία μη αφαλατωμένων οστικών δειγμάτων. Η σκληρότητα του οστίτη ιστού θέτει ωστόσο ιδιαίτερες δυσκολίες στο χειρισμό όλων των σταδίων της ιστολογικής παρασκευής. Ο εξοπλισμός και οι αυτοματισμοί που χρησιμοποιούνται ως ρουτίνα στα παθολογοανατομικά εργαστήρια είναι συνήθως ακατάλληλα για τέτοιου είδους επεξεργασία. Οι τρέχουσες τεχνικές που έχουν καθιερωθεί στη μελέτη των μη αφαλατωμένων οστικών δειγμάτων (μη αφαλατωμένες λεπτοτομές, υπέρλεπτη λείανση, επιφανειακή χρώση λειασμένων δοκιμίων, microCT, ηλεκτρονική μικροσκόπηση) έχουν καθεμία πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Ένα κοινό μειονέκτημα όλων των παραπάνω μεθόδων είναι η εξαιρετικά υψηλές απαιτήσεις σε χρόνο, σε κόστος εξοπλισμού και αναλώσιμων, και σε εξειδίκευση προσωπικού. Ως συνέπεια, η οστική ιστομορφομετρία θεωρείται αντικείμενο μόνο εξειδικευμένων κέντρων. Αυτό αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι παρόλο που καθημερινά εξάγεται παγκοσμίως ένας τεράστιος όγκος οστικών δειγμάτων, (π.χ. κεφαλές μηριαίου κατά τις αρthroπλαστικές ισχύου), η βασική έρευνα στην οστική μορφολογία παραμένει δυσανάλογα φτωχή, ακόμα και σε κοινές παθήσεις όπως η οστεοαρθρίτιδα και η οστεοπόρωση.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μια ταχεία, χαμηλού κόστους και φιλική προς τον ερευνητή εναλλακτική μέθοδος για τη μελέτη της μικροαρχιτεκτονικής των οστών σε δείγματα μεγάλης κλίμακας. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τις μεθοδολογικές αρχές της υλικογραφίας, ωστόσο η πρωτοπορία της έγκειται στην επιλογή εύχρηστου και χαμηλού κόστους εξοπλισμού και αναλώσιμων σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας (κοπή, απολίπανση, εγκιβωτισμός, λείανση, χρώση, ψηφιοποίηση). Δεν εξαρτάται από μικροσκόπηση, και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλα δείγματα. Στα πλαίσια μιας ολοκληρωμένης ερευνητικής πρότασης, αναπτύχθηκε λογισμικό ελεύθερου κώδικα για την εξαγωγή ποσοτικών μετρήσεων από τις παρασκευασμένες εικόνες.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΑΘΙΕΡΩΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η ταχεία υλικογραφική μέθοδος κληρονομεί ορισμένα από τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ήδη καθιερωμένων τεχνικών. Ανήκει μαζί με τη microCT και την τεχνική της επιφανειακής χρώσης λειασμένων δοκιμίων στην ομάδα τεχνικών που δεν εξαρτώνται από μικροσκόπιο, κατά συνέπεια δεν υπάρχει πρακτικά όριο στο μέγεθος των δειγμάτων. Στην παρούσα διατριβή η ανάπτυξη των διαφόρων σταδίων επεξεργασίας (κοπή, εγκιβωτισμός, λείανση) πραγματοποιήθηκε με ρητινούχα μπλοκ μεγέθους 7x7 cm, ωστόσο η τεχνική μπορεί με την κατάλληλη τροποποίηση διαστάσεων των σιλικονούχων μητρών, στηρικτικών μπλοκ, βάσεων κοπής και λείανσης κλπ να προσαρμοστεί σε οποιοδήποτε άλλο μέγεθος δειγμάτων.

Μεγάλο πλεονέκτημα της προτεινόμενης μεθόδου είναι, όπως αναφέρθηκε, το χαμηλό κόστος εξοπλισμού και αναλώσιμων υλικών. Τα απαιτούμενα εργαλεία (κοινό δρόπανο, δισκός λείανσης, λειαντικά χαρτιά, επιτραπέζια πριονοκορδέλλα) καθώς και τα αναλώσιμα υλικά (σιλικόνη καλουπιών, χλωρίνη, ρητίνη Eprofix, white-spirit, νιτρικός άργυρος, θειοθειικό νάτριο) είναι σχετικά λίγα, οικονομικά και ασφαλή για το προσωπικό, χωρίς τοξικότητα ή αναθυμιάσεις. Η χρησιμοποίησή τους δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό όπως π.χ. ρυμιστή θερμοκρασίας/υγρασίας ή απαγωγό κενού. Η κεχωρισμένη επιφάνεια μπορεί εύκολα να σαρωθεί με έναν επιτραπέζιο σαρωτή (scanner). Η τελική ηλεκτρονική επεξεργασία της ψηφιοποιημένης εικόνας μπορεί να πραγματοποιηθεί σε έναν τυπικό επιτραπέζιο ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του ελεύθερης πρόσβασης λογισμικού ImageJ (πρόσθετο Map_BoneMicrostructure). Το κόστος του πλήρους εξοπλισμού, εξαιρώντας σαρωτή και ηλεκτρονικό υπολογιστή, είναι περίπου 1000€, το κόστος αναλώσιμων ανά διατομή είναι περίπου 5€. **(Εικόνα 82)**

Όσον αφορά τον απαιτούμενο χρόνο επεξεργασίας ανά δείγμα, η προτεινόμενη μέθοδος έχει από τους συντομότερους χρόνους συγκριτικά με τις άλλες τεχνικές, συγκρίσιμη με τη microCT. Με την παρούσα μεθοδολογία η επεξεργασία μιας διατομής 6x6 cm μπορούσε να πραγματοποιηθεί εντός 3 ημερών, με πρωινή εργασία ενός μόνο ατόμου. Χρόνος εξοικονομείται όχι μόνο μέσω των σύντομων

σταδίων επεξεργασίας, αλλά και από το γεγονός ότι μεγάλα δείγματα μπορούν να εξετάζονται ως έχουν χωρίς ανάγκη τεμαχισμού. Ενδεικτικά, η επεξεργασία ενός αντίστοιχου δείγματος με την τεχνική των μη αφαλατωμένων λεπτοτομών θα προϋπέθετε τον τεμαχισμό σε 4-6 μικρότερα δείγματα προσαρμοσμένα στο μέγεθος της αντικειμενοφόρου πλάκας, με περαιτέρω χρόνο επεξεργασίας 5-10 ημέρες ανά διατομή. Η μεθοδολογία επιτρέπει επίσης την παράλληλη επεξεργασία περισσότερων δειγμάτων. Με την περιγραφόμενη διάταξη, είναι δυνατόν να παρασκευάζονται ταυτόχρονα έως και 8 δείγματα.

Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αδυναμία μελέτης των κυτταρικών δομών. Η κυτταρική μορφολογία προϋποθέτει την παρασκευή μικροσκοπίσιμων υπέρλεπτων τομών μη αφαλατωμένων δειγμάτων, οι οποίες μπορούν να παρασκευαστούν μόνο με υψηλής ακρίβειας τεχνικές (π.χ. τεχνική μη αφαλατωμένων λεπτοτομών, τεχνική υπέρλεπτων λειασμάτων), των οποίων το κόστος εξοπλισμού είναι τάξεις μεγέθους υψηλότερο από το κόστος της ταχείας υλικογραφικής μεθόδου. Η ταχεία υλικογραφική μέθοδος επινοήθηκε άλλωστε για τη μελέτη μόνο των εφαλατωμένων στοιχείων, όπως ισχύει και με *microCT*. Ένα άλλο εγγενές μειονέκτημα της μεθόδου είναι, ότι όλες οι υπολογιζόμενες παράμετροι οστικής ιστομορφομετρίας (BV/TV , $Tb.Th.$, $Tb.Sp.$, $Tb.N$) είναι τρισδιάστατες εκτιμήσεις βασισμένες στην εφαρμογή του μαθηματικού μοντέλου των παράλληλων πλακών επί των πρωτογενών δισδιάστατων μετρήσεων (αρχή της στερεολογίας). Ωστόσο, αυτό είναι κοινό χαρακτηριστικών όλων των τεχνικών που στηρίζονται στη μελέτη διατομών. Μόνο η *microCT* επιτρέπει την τρισδιάστατη ανασύσταση της οστικής δομής, και κατά συνέπεια πρωτογενείς τρισδιάστατες μετρήσεις.

Ο **Πίνακας 5** που ακολουθεί στην επόμενη σελίδα συγκρίνει επιγραμματικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της προτεινόμενης ταχείας υλικογραφικής μεθόδου ως προς τις υπόλοιπες προαναφερθείσες τεχνικές οστικής ιστομορφομετρίας.

Πίνακας 5. Σύγκριση μεταξύ των διαφόρων τεχνικών οστικής ιστομορφομετρίας που εφαρμόζονται σε μη αφαλατωμένα οστά.

	Μη αφαλατωμένες λεπτοτομές	Υπέρλεπτα λειάσματα	Επιφανειακή χρώση λειασμάτων	MicroCT	Ταχεία υλικογραφική μέθοδος
Μέγιστο μέγεθος	20x50 ^a mm	20x50 ^a mm	50x100 mm	20x20x20 mm ^b	70x70 mm ^c
Εξεταζόμενες δομές	Εφαλατωμένα στοιχεία, Οστεοειδές, Χόνδρος, Εξωκυττάρια ουσία κλπ	Εφαλατωμένα στοιχεία, Οστεοειδές, Χόνδρος, Εξωκυττάρια ουσία Εμφυτεύματα, κλπ	Εφαλατωμένα στοιχεία, Εμφυτεύματα. Περιορισμένη μελέτη των κυτταρικών δομών	Μόνο εφαλατωμένα στοιχεία, όχι κυτταρικές δομές	Μόνο εφαλατωμένος ιστός, όχι κυτταρικές δομές
Εξοπλισμός κοπής/ λείανσης	Σκληρο-μικροτόμοι υψηλής ακρίβειας	Λειαντικά μηχανήματα υψηλής ακρίβειας	Λειαντικά μηχανήματα υψηλής ακρίβειας	Πριονοκορδέλλα γενικής χρήσης	Πριονοκορδέλλα γενικής χρήσης
Μονιμοποίηση	Φορμαλίνη	Φορμαλίνη	Φορμαλίνη	Καμία	Καμία
Εγκιβωτισμός	Μεθυλ-μεθακρυλικό	Μεθυλ-μεθακρυλικό	Μεθυλ-μεθακρυλικό	Δεν χρειάζεται	Εποξεική ρητίνη
Χρώση	Ιστολογικές χρώσεις	Ιστολογικές χρώσεις	von Kossa, κυανούν τολουιδίνης	Καμία	Τροποποιημένη von Kossa
Χρόνος επεξεργασίας	5-10 ημέρες	>20 ημέρες	15 – 20 ημέρες	1-2 ημέρες	3 ημέρες
Σχόλια	Υψηλό κόστος, Ερεθιστικά χημικά, Συσκευή κενού, Απαγωγός, Ρύθμιση θερμοκρασίας	Πολύ Υψηλό κόστος, Ερεθιστικά χημικά, Συσκευή κενού, Απαγωγός, Ρύθμιση θερμοκρασίας	Υψηλό κόστος, Ερεθιστικά χημικά, Συσκευή κενού, Απαγωγός, Ρύθμιση θερμοκρασίας	Πολύ υψηλό κόστος, Ασφαλής διαδικασία	Χαμηλό κόστος ^d , Ελάχιστος εργαστηριακός εξοπλισμός, Ασφαλής διαδικασία

^a Μεγαλύτερα δείγματα μπορούν να επεξεργαστούν με τους κατάλληλους μικροτόμους ή λειαντικά μηχανήματα. Ωστόσο, εφόσον το τελικό αποτέλεσμα είναι μια λεπτή τομή προς μικροσκοπήση, το χρήσιμο μέγεθος δείγματος γενικά περιορίζεται στο οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου.

^b Τυπική συσκευή. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται δείγματα έως 100 x 100 x 100 mm σε πειραματικές συσκευές, ωστόσο σε κόστος ανάλυσης (40μm/pixel ή χαμηλότερη).

^c Η προτεινόμενη μέθοδος πρακτικά δεν έχει περιορισμό μεγέθους, με τις κατάλληλες τροποποιήσεις των σιλικονούχων μητρών, στηρικτικών μπλοκ, βάσεις λείανσης κλπ.

^d Το κόστος βασικού εξοπλισμού είναι περίπου 1,000 €. Το κόστος παρασκευής μιας τομής υπολογίζεται στα 5€.

ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εγκυρότητα της προτεινόμενης ταχείας υλικογραφικής μεθόδου τεκμηριώθηκε συγκρίνοντάς της με την καθιερωμένη τεχνική microCT. Οχτώ δείγματα αναλύθηκαν πρώτα με την μη καταστροφική τεχνική της microCT και εν συνεχεία με την υλικογραφική μεθοδολογία. Η στατιστική σύγκριση των μετρήσεων ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε όλες τις εξετασθείσες παραμέτρους οστικής ιστομορφομετρίας (BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp., Tb.N.).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η προτεινόμενη ταχεία υλικογραφική μέθοδος για την οστική ιστομορφομετρία δειγμάτων μεγάλης κλίμακας είναι ένα ολοκληρωμένο ερευνητικό εργαλείο, περιλαμβάνοντας όλα τα στάδια επεξεργασίας από πρωτογενές δείγμα έως την παρασκευή ψηφιοποιήσιμων εικόνων, περιλαμβάνοντας και το αντίστοιχο λογισμικό εξαγωγής ποσοτικών μετρήσεων. Έχει τις προϋποθέσεις να συμβάλει στην επέκταση της μελέτης του οστίτη ιστού, καθώς επιτρέπει την ταχεία μελέτη οστικών δειγμάτων με χαμηλές απαιτήσεις εξοπλισμού και κόστος αναλώσιμων (Εικόνα 82).



Εικόνα 82 Γενική άποψη της πλήρους εργαστηριακής διάταξης με την οποία αναπτύχθηκε η παρούσα ταχεία υλικογραφική μέθοδος. Συγκριτικά με άλλες τεχνικές χαρακτηρίζεται από σχετικά λίγα, οικονομικά και εύχρηστα εργαλεία/ αναλώσιμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος: Η ανάπτυξη μιας απλοποιημένης τεχνικής για τη μελέτη της οστικής μικροαρχιτεκτονικής σε μη αφαλατωμένα δείγματα μεγάλης κλίμακας (οστική ιστομορφομετρία). Οι έως τώρα καθιερωμένες τεχνικές, όπως μη αφαλατωμένες λεπτοτομές, υπέρλεπτη λείανση, επιφανειακή χρώση λειασμένων δοκιμίων, microCT, ηλεκτρονική μικροσκόπηση, είναι κατά κανόνα δαπανηρές, χρονοβόρες, θέτουν υψηλές απαιτήσεις σε εξοπλισμό, αναλώσιμα, μέτρα εργαστηριακής ασφάλειας και εξειδίκευση προσωπικού.

Μέθοδος: Η τεχνική στηρίζεται στις αρχές της υλικογραφίας, ωστόσο η πρωτοπορία της έγκειται στην επιλογή εύχρηστου και χαμηλού κόστους εξοπλισμού και αναλώσιμων σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας (κοπή, απολίπανση, εγκιβωτισμός, λείανση, χρώση, ψηφιοποίηση). Στην παρούσα διατριβή περιγράφονται διεξοδικά τα στάδια επεξεργασίας, καθώς και πλήθος τεχνικών λεπτομερειών για την επιτυχή πρακτική εφαρμογή τους: κοπή λεπτών παράλληλων τομών με τη βοήθεια ιδιοδιάταξης επί επιτραπέζιας πριονοκορδέλλας, καθαρισμός λίπους σε υποχλωρίδιο το νατρίου (χλωρίνη), εγκιβωτισμός σε εποξεική ρητίνη, λείανση με λειαντικά χαρτιά καρβιδίου του πυριτίδου, χρώση με τροποποιημένη τεχνική von Kossa, ψηφιοποίηση σε επιτραπέζιο σαρωτή. Στα πλαίσια μιας ολοκληρωμένης ερευνητικής πρότασης, αναπτύχθηκε το πρόσθετο Map_BoneMicrostructure ως λογισμικό ελεύθερου κώδικα για την πλατφόρμα ImageJ για την επεξεργασία των εικόνων και την εξαγωγή ποσοτικών μετρήσεων.

Για την επικύρωση της μεθόδου, οχτώ οστικά δείγματα μελετήθηκαν με την καθιερωμένη τεχνική της microCT, και εν συνεχεία υπεβλήθησαν στην ταχεία υλικογραφική μέθοδο. Οι παράμετροι οστικής ιστομορφομετρίας BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp., Tb.N. υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα και με τις δύο μεθόδους, και εν συνεχεία υπεβλήθησαν στη στατιστική δοκιμασία του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης Pearson. Η συσχέτιση ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,005$) και για τις τέσσερις παραμέτρους.

Συζήτηση: Η προτεινόμενη τεχνική δεν εξαρτάται από μικροσκόπηση, μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλα δείγματα, είναι σχετικά ταχεία, χρησιμοποιεί ασφαλή υλικά, και έχει ελάχιστες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό (περ. 1000€) και αναλώσιμα (περ. 5€ ανά διατομή). Ωστόσο, δεν επιτρέπει τη μελέτη κυτταρικών στοιχείων. Η μέθοδος επικυρώθηκε επιτυχώς συγκρινόμενη με τη microCT.

Συμπέρασμα: Η ταχεία υλικογραφική μέθοδος είναι ένα ολοκληρωμένο ερευνητικό εργαλείο, και έχει τις προϋποθέσεις να συμβάλλει στην επέκταση της μελέτης του οστίτη ιστού, καθώς επιτρέπει την ταχεία μελέτη οστικών δειγμάτων με χαμηλές απαιτήσεις εξοπλισμού και κόστος αναλώσιμων.

SUMMARY

Aim: The development of a simplified technique for the large scale study of bone microstructure on undecalcified bone (mineral bone histomorphometry).

Established techniques such as undecalcified bone thin sectioning, ultrathin grinding, surface-stained block-grindings and micro-CT, electron microscopy, are expensive, time consuming, have very high demands on equipment, consumables, laboratory safety facilities and personell expertise.

Method: The proposed technique is based on the principles of materiallography. However, its novelty lies on the selection of user-friendly, low-cost equipment and materials in all stages of preparation (cutting, defatting, embedding, grinding, staining, digitization). On the present thesis, all stages are described in detail, with many practical tips for the successful implementation: parallel thin cutting with a modified table band-saw arrangment, defatting with sodium hypochloride (bleach), embedding in epoxy-resin, silicon-carbide paper grinding, von Kossa staining, flatbed scanner digitization. For the purposes of an integrated research project, the open-source plugin “Map_BoneMicrostructure” was developed for the platform ImageJ, for image processing and acquisition of quantitative results.

For the validation of the method, eight bone specimens were studied with the established technique of microCT, and subsequently with the rapid metariallographic method. The bone histomorphometry parameters BV/TV, Tb.Th., Tb.Sp., Tb.N. were calculated by each method, and were subjected to the statistical test of Pearson’s linear correlation. The correlation was found statistical significant ($p < 0,005$) for all four parameters.

Discussion: The proposed technique is not microscope-bound, can be implemented even on large specimens, is relatively quick, uses safe materials, and has low demands on laboratory equipment (aprox. 1000€) and consumables (aprox. 5€ pro slice). However, it is not suitable for the study of cellular structures. It was successfully validated compared with the established microCT.

Conclusion: The rapid materiallographic method is an integrated research tool, and has all prerequisites to contribute to the expansion of the study of bone tissue, since it allows the rapid study of bone samples with low equipment and consumables costs.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΠΡΟΣΘΕΤΟ ImageJ Map_BoneMicrostructure

Κώδικας σε γλώσσα προγραμματισμού Java του πρόσθετου Map_BoneMicrostructure για το πρόγραμμα ανοιχτού κώδικα ImageJ.

```
import java.awt.*;
import java.awt.event.*;
import java.awt.SystemColor;
import java.util.*;
import javax.swing.*;
import java.text.*;

import ij.measure.Calibration;
import ij.measure.ResultsTable;
import ij.plugin.filter.Analyzer;
import ij.plugin.frame.*;
import ij.*;
import ij.process.*;
import ij.gui.*;

/*****\
|
| ImageJ Plugin Map_BoneMicrostructure
| Author: Vasilis Karantzoulis
|
| What does it do:
| Calculates standard bone histomorphometry parameters on a digitized trabecular
| bone surface, and maps the distributions of selected parameters onto the surface
|
\*****/
public class Map_BoneMicrostructure extends PlugInFrame implements ActionListener, TextListener,
ItemListener{

/*****\
|
| Internal Variables
|
\*****/
// Variables that refer to the original image
public ImagePlus imp;
int iImageWidth, iImageHeight;
ImageCanvas ic;
String imageTitle;
ImageProcessor ip;

// ipRectangle represents the bounding Rectangle of the current-Roi processed.
// It must pass through various routines as a static variable
Rectangle ipRectangle;

// ip2 and derivatives refer to the copy made for actual image-processing.
// ip2 has the size of the square-ROI that the original image.
// Wand ip2Wand, FloodFiller ff and PolygonFiller pf are created for every instance of ip2
// PolygonFiller pf and FloodFiller ff are needed in order to accurately fill
// the interior of found particles (see analyzeParticles() for further details
ImageProcessor ip2;
Object ip2PixelsCopy;
Wand ip2Wand;
FloodFiller ff;
PolygonFiller pf;

// The variables level1, level2 define the thresholding values.
// Since this plugin was designed to process black bone-trabeculae on white background,
// as default level1 = 0
double level1, level2;
```

```

// Global interface panel fields
Panel panelDPIContainer;
    Choice DPI;
    TextField textmm, textPixels;

Panel panelGridContainer;
    TextField textSqrWidthMM;
    TextField textSqrWidthPix;
    TextField textSqrX;
    TextField textSqrY;
    Button buttonUseCurrentRoi;
    Button buttonCreateSquareRoi;

Panel panelModifiersContainer;
    Checkbox chkboxSmooth;
    Checkbox chkboxAutoThreshold;
    Checkbox chkboxDespeckle;
    TextField textSpeckleSize;

Panel panelMapContainer;
    Button buttonMapAllSquares;
    Button buttonMapCurrentRoi;
    Button buttonMapEntireImage;
    Label labelProgress;
    String txtProgress;

Panel panelMaskContainer;
    Button buttonGrayscale;
    Choice grayscaleMapping;
    TextField textGrayscaleMin, textGrayscaleMax;
    String mappingValue;

// Global Variables calculated from user-input (from the above panel fields)
int sqrX, sqrY, sqrWidth; // Coordinates of active Square-Roi
int sqrXstart, sqrYstart; // Beginning of the splitting process
int countSqrRois; // Total No of Square-Rois, that the image will be split to
int iRoisX, iRoisY; // No of Square-Rois in the X and Y axis respectively

double umperpixel, mmpixel;
String grayscaleMin, grayscaleMax;

boolean blnSmooth;
boolean blnAutoThreshold;
boolean blnDespeckle;
double speckleSize;

// We 'trap' the entries in main panel with textValueChanged(TextEvent)
// for various tasks, such as automatic fill-in in other fields.
// Unfortunately, Java invokes this call-back even with 'internal' changes.
// The following flag serves to differentiate between user- and automatic field update
boolean flagTextValueChangeInvokedInternally = false;

// maskIP holds the mask for the traced particles. It is as big as the original image
// Every traced particle is drawn on maskIP as a mask.
// At the end of the procedure maskIP should look like the thresholded image
ImageProcessor maskIP;

// We define new Roi classes MyRoi, MyOvalRoi, MyPolyRoi to facilitate
// the display of the grid of squares that the image will be split to.

// Definition of an arbitrary Roi-type, hoping nobody else had the same idea ...
public static final int MYROI = 999;
// Flag to enable/block the overriding of MyXXXRoi.draw(..) call-back function
boolean flagOverrideRoiDraw = true;

```

```

// Holds the user-selected Roi
Roi userRoi;

// All other variables ...
ResultsTable rt;
Analyzer analyzer;

double particlesTotalArea;
double particlesTotalPerimeter;
double currentRoiTotalArea;
double currentRoiParticlesArea;
double currentRoiParticlesTotalPerimeter;
int particlesCount;

DecimalFormat df;

/*****
|
|  Constructor
|
| *****/
public Map_BoneMicrostructure(){
    super("Map_BoneMicrostructure");

    // Dequote to automatically open an image.
    // Intended for debug purposes, where the plugin is invoked many consecutive times
    // IJ.open("D:\\Διατριβή BONE-
    IMAGES\\AnalyzeParticleExample\\AnalyzeParticleExampleCrop.bmp");

    imp = WindowManager.getCurrentImage();
    if (imp == null) {
        IJ.error("There is no active image.");
        return;
    }
    ip = imp.getProcessor();
    imageTitle = imp.getTitle();
    ic = imp.getCanvas();
    iImageWidth = ip.getWidth();
    iImageHeight = ip.getHeight();

    // invoke Thresholder
    IJ.run("Threshold...");

    // invoke user interface Panel
    CreatePanel();
}

```

```

/*****
|
|  Creates the main user interface panel.
|
| *****/
public void CreatePanel() {

    setBackground(SystemColor.control);
    setLayout(new BorderLayout(this, BorderLayout.Y_AXIS));

    // ----- SECTION WARNING -----
    JTextArea txtWarning = new JTextArea(" " +
        "This session of Map_BoneMicrostructure is bound to image: " +
        imageTitle + "\n" +
        "WARNING: The plugin is designed to process " +
        "8-bit grayscale images with black-coloured bone-trabeculae on " +
        "white background. If your image does not conform, please " +
        "apply the appropriate conversions before using.");
    txtWarning.setWrapStyleWord(true);
    txtWarning.setLineWrap(true);
    txtWarning.setBackground(getBackground());
    txtWarning.setEditable(false);

    add(txtWarning);
    add(new Label(""));

    // ----- SECTION CALIBRATION -----
    // Panels Structure:
    // panelDPIContainer (GridLayout 1x2)
    //     -> txtDescriptionDPI (text)
    //     -> panelDPI1 (BoxLayout in Y axis)
    //     -> panelDPI (main panel)

    panelDPIContainer = new Panel();
    panelDPIContainer.setLayout(new GridLayout(1, 2, 2, 2));

    JTextArea txtDescriptionDPI = new JTextArea(" " +
        "STEP 1. CALIBRATE: Select the DPI resolution with which the image was
        scanned. " +
        "Alternatively, you can manually type the relationship between pixels and
        millimeters");
    txtDescriptionDPI.setWrapStyleWord(true);
    txtDescriptionDPI.setLineWrap(true);
    txtDescriptionDPI.setBackground(getBackground());
    txtDescriptionDPI.setEditable(false);

    Panel panelDPI = new Panel();
    DPI = new Choice();
    DPI.add("4800DPI");
    DPI.add("9600DPI");
    DPI.add("2400DPI");
    DPI.add("Custom");
    panelDPI.add(DPI);
    DPI.addItemListener(this);
    DPI.addFocusListener(this);

    textPixels = new TextField(Integer.toString(1));
    panelDPI.add(textPixels);
    panelDPI.add(new Label("pixels equal:"));
    textPixels.addTextListener(this);
    textPixels.addFocusListener(this);

    textmm = new TextField(Double.toString(0.00529));
    panelDPI.add(textmm);
    panelDPI.add(new Label("mm"));
    textmm.addTextListener(this);

```

```

textmm.addFocusListener(this);

Panel panelDPI1 = new Panel();
panelDPI1.setLayout(new BoxLayout(panelDPI1, BoxLayout.Y_AXIS));
panelDPI1.add(panelDPI);
panelDPI1.add(new Label("")); // Placeholder

panelDPIContainer.add(txtDescriptionDPI);
panelDPIContainer.add(panelDPI1);

add(panelDPIContainer);
add(new Label(""));

CalculateMMperPixel();

// -----SECTION GRID OF SQUARES -----
// Panels Structure:
// panelGridContainer (GridLayout 1x2)
//     -> txtDescriptionGrid (text)
//     -> panelGrid1 (BoxLayout in Y axis)
//         -> Label("Coordinates of Square-Roi")
//         -> panelSqrLine1 (GridLayout 1x4)
//             -> textSqrX | textSqrWidthPix
//             -> panelSqrLine2 (GridLayout 1x4)
//                 -> textSqrY | textSqrWidthMM
//             -> panelButtonGrid (GridLayout 1x2)
//                 -> buttonUseCurrentRoi | buttonCreateSquareRoi

panelGridContainer = new Panel();
panelGridContainer.setLayout(new GridLayout(1, 2, 2, 2));

JTextArea txtDescriptionGrid = new JTextArea(" " +
    "STEP 2. CREATE GRID OF SQUARES: Drag a Roi (Rectangle, Oval, Freeline) "
    "or define the coordinates of a Square-Roi. " +
    "A grid of equal square-ROIs can be generated, " +
    "to which the image will be split and 'mapped'" +
    "as to the above basic bone-microstructure parameters.");
txtDescriptionGrid.setWrapStyleWord(true);
txtDescriptionGrid.setLineWrap(true);
txtDescriptionGrid.setBackground(getBackground());
txtDescriptionGrid.setEditable(false);

Panel panelSqrLine1 = new Panel();
panelSqrLine1.setLayout(new GridLayout(1,4,2,2));
panelSqrLine1.add(new Label("X (pix):", Label.RIGHT));
sqrX = 0; //initial value
textSqrX = new TextField(Integer.toString(sqrX));
panelSqrLine1.add(textSqrX);
textSqrX.addTextListener(this);
textSqrX.addFocusListener(this);
panelSqrLine1.add(new Label("Width(pix):", Label.RIGHT));
// Define the maximum-width square within the image
if (iImageWidth < iImageHeight)
{
    sqrWidth = iImageWidth;
} else {
    sqrWidth = iImageHeight;
}
textSqrWidthPix = new TextField(Integer.toString(sqrWidth));
panelSqrLine1.add(textSqrWidthPix);
textSqrWidthPix.addTextListener(this);
textSqrWidthPix.addFocusListener(this);

```

```

// This plug-in was written on a greek-PC, so I decided to force Double output
// in US-format #.## and not the traditional greek format #,## (-)
// df.format(some_double_value) produces a US-compatible output
// on all international machines (even mine)
Locale loc = Locale.US;
NumberFormat nf = NumberFormat.getNumberInstance(loc);
df = (DecimalFormat)nf;
df.applyPattern("#.##");

Panel panelSqrLine2 = new Panel();
panelSqrLine2.setLayout(new GridLayout(1,4,2,2));
panelSqrLine2.add(new Label("Y (pix) :", Label.RIGHT));
sqrY = 0; //initial value
textSqrY = new TextField(Integer.toString(sqrY));
panelSqrLine2.add(textSqrY);
textSqrY.addTextListener(this);
textSqrY.addFocusListener(this);
panelSqrLine2.add(new Label("Width(mm):", Label.RIGHT));
textSqrWidthMM = new TextField(df.format(sqrWidth * mmperpixel));
panelSqrLine2.add(textSqrWidthMM);
textSqrWidthMM.addTextListener(this);
textSqrWidthMM.addFocusListener(this);

Panel panelButtonGrid = new Panel();
panelButtonGrid.setLayout(new GridLayout(1,2,2,2));
buttonUseCurrentRoi = new Button("Use Current Roi");
buttonUseCurrentRoi.addActionListener(this);
buttonCreateSquareRoi = new Button("Create New Square Roi");
buttonCreateSquareRoi.addActionListener(this);
panelButtonGrid.add(buttonUseCurrentRoi);
panelButtonGrid.add(buttonCreateSquareRoi);

Panel panelGrid1 = new Panel();
panelGrid1.setLayout(new BorderLayout(panelGrid1, BorderLayout.Y_AXIS));
panelGrid1.add(new Label("Coordinates of Square-Roi:"));
panelGrid1.add(panelSqrLine1);
panelGrid1.add(panelSqrLine2);
panelGrid1.add(panelButtonGrid);

panelGridContainer.add(txtDescriptionGrid);
panelGridContainer.add(panelGrid1);

add (panelGridContainer);
add (new Label(""));

// ----- SECTION MAPPING -----
// Panels Structure:
// panelMapContainer (GridLayout 1x2)
//   -> txtDescriptionMap (text)
//   -> panelMap1 (BoxLayout Y axis)
//     -> panelMapButtons1 (GridLayout 1x2)
//       -> panelMapButtons (GridLayout 3x1) | panelProgress (GridLayout 3x2)
//         -> buttonMapAllSquares           -> labelProgress
//         -> buttonMapCurrentRoi           -> (placeholder)
//         -> buttonMapEntireImage          -> (placeholder)
//       -> panelCheckLine1
//       -> panelCheckSmooth (FlowLayout) | panelCheckAutoThreshold
//     -> chkboxSmooth           -> chkboxAutoThreshold
//   -> panelCheckDespeckle (FlowLayout)
//   -> chkboxDespeckle       | textSpeckleSize

panelMapContainer = new Panel();
panelMapContainer.setLayout(new GridLayout(1, 2, 2, 2));

JTextArea txtDescriptionMap = new JTextArea(" +

```

```

        "STEP 4. CALCULATE the following bone-microstructure values: " +
        "BA/TA (bone area fraction, %), " +
        "TbTh (mean trabecular thickness,  $\mu\text{m}$ ), " +
        "TbSp (mean trabecular separation,  $\mu\text{m}$ ), " +
        "TbN (mean trabecular number per length unit, 1/mm). " + "\n" +
        "A results-table is created: each row represents " +
        "a processed ROI. ");

txtDescriptionMap.setWrapStyleWord(true);
txtDescriptionMap.setLineWrap(true);
txtDescriptionMap.setBackground(getBackground());
txtDescriptionMap.setEditable(false);

Panel panelMap1 = new Panel();
panelMap1.setLayout(new BorderLayout(panelMap1, BorderLayout.Y_AXIS));

Panel panelMapButtons1 = new Panel();
panelMapButtons1.setLayout(new GridLayout(1,2,2,2));

Panel panelMapButtons = new Panel();
panelMapButtons.setLayout(new GridLayout(3,1,2,2));
buttonMapAllSquares = new Button("Map All Squares");
buttonMapAllSquares.addActionListener(this);
panelMapButtons.add(buttonMapAllSquares);
buttonMapCurrentRoi = new Button("Map Current Roi");
buttonMapCurrentRoi.addActionListener(this);
panelMapButtons.add(buttonMapCurrentRoi);
buttonMapEntireImage = new Button("Map Entire Image");
buttonMapEntireImage.addActionListener(this);
panelMapButtons.add(buttonMapEntireImage);

Panel panelProgress = new Panel();
panelProgress.setLayout(new GridLayout(3, 2, 2, 2));
panelProgress.add(new Label("Progress:", Label.RIGHT));
labelProgress = new Label("0/0");
panelProgress.add(labelProgress);
panelProgress.add(new Label("")); // Placeholder
panelProgress.add(new Label("")); // Placeholder

panelMapButtons1.add(panelMapButtons);
panelMapButtons1.add(panelProgress);

Panel panelCheckLine1 = new Panel();
panelCheckLine1.setLayout(new GridLayout(1,2,1,1));

Panel panelCheckSmooth = new Panel();
panelCheckSmooth.setLayout(new FlowLayout(FlowLayout.LEADING));
checkboxSmooth = new Checkbox("Smooth Image", true);
panelCheckSmooth.add(checkboxSmooth);

Panel panelCheckAutoThreshold = new Panel();
panelCheckAutoThreshold.setLayout(new FlowLayout (FlowLayout.LEADING));
checkboxAutoThreshold = new Checkbox("Autothreshold", true);
panelCheckAutoThreshold.add(checkboxAutoThreshold);

panelCheckLine1.add(panelCheckSmooth);
panelCheckLine1.add(panelCheckAutoThreshold);

Panel panelCheckDespeckle = new Panel();
panelCheckDespeckle.setLayout(new FlowLayout(FlowLayout.LEADING));
checkboxDespeckle = new Checkbox("Despeckle Particles with Radius <", true);
panelCheckDespeckle.add(checkboxDespeckle);
textSpeckleSize = new TextField("10");
panelCheckDespeckle.add(textSpeckleSize);
panelCheckDespeckle.add(new Label("pix"));

panelMap1.add(panelMapButtons1);
panelMap1.add(panelCheckLine1);

```

```

panelMap1.add(panelCheckDespeckle);

panelMapContainer.add(txtDescriptionMap);
panelMapContainer.add(panelMap1);

add(panelMapContainer);
add(new Label(""));

// -----SECTION GRAYSCALE MASK -----
// Panels Structure:
// panelMaskContainer (GridLayout 1x2)
//     -> txtDescriptionMask (text)
//     -> panelMask1 (BoxLayout in Y axis)
//         -> buttonGrayscale (action button)
//         -> grayscaleMapping (list of parameters)
//         -> User defined GrayscaleMin and GrayscaleMax values
//         -> Label("") as place holder

panelMaskContainer = new Panel();
panelMaskContainer.setLayout(new GridLayout(1, 2, 2, 2));

JTextArea txtDescriptionMask = new JTextArea("" +
    "STEP 4. CREATE A GRAYSCALED DISTRIBUTION of each parameter " +
    "on a thresholded mask of the bone-trabeculae. " +
    "There are predefined values for minimum- (white) and maximum-shading (black).");

txtDescriptionMask.setWrapStyleWord(true);
txtDescriptionMask.setLineWrap(true);
txtDescriptionMask.setBackground(getBackground());
txtDescriptionMask.setEditable(false);

panelMaskContainer.add(txtDescriptionMask);

Panel panelMask1 = new Panel();
panelMask1.setLayout(new GridLayout(4, 2, 2, 2));
buttonGrayscale = new Button("Grayscaled Distribution of ...");
buttonGrayscale.addActionListener(this);
panelMask1.add(buttonGrayscale);

grayscaleMapping = new Choice();
grayscaleMapping.add("BA/TA (%)");
grayscaleMapping.add("Tb.Th (µm)");
grayscaleMapping.add("Tb.Sp (µm)");
grayscaleMapping.add("Tb.N (1/mm)");
panelMask1.add(grayscaleMapping);
grayscaleMapping.addItemListener(this);

panelMask1.add(new Label("White Shade for :", Label.RIGHT));
textGrayscaleMin = new TextField("0");
panelMask1.add(textGrayscaleMin);

panelMask1.add(new Label("Black Shade for :", Label.RIGHT));
textGrayscaleMax = new TextField("100");
panelMask1.add(textGrayscaleMax);

panelMask1.add(new Label(""));
panelMask1.add(new Label(""));

panelMaskContainer.add(panelMask1);

add(panelMaskContainer);
add(new Label(""));

```

```

// -----END PANEL-----

// Initialize the user-depended global values
// forcing a dummy TextEvent
textValueChanged(null);

pack();
show();

}

/*****\
|
| The following 3 functions:
| textValueChanged(TextEvent), itemStateChanged(ItemEvent), actionPerformed(ActionEvent)
| are system call-backs invoked whenever a change takes place in text-fields,
| choice-fields, or a button is clicked respectively.
| The call-back function focusGained(FocusEvent) is called whenever the user
| clicks on one of the trapped-fields.
|
| *****/

public void focusGained(FocusEvent event){
    if (event != null) {
        // User wants to type-in something. Stop the annoying
        // Roi-overriding, or else the Square-Roi fields are
        // blocked for input by the constant refreshing!
        flagOverrideRoiDraw = false;
    }
}

public void textValueChanged(TextEvent event)

// Caution: A TextEvent is automatically generated even when a text-field is
// modified within the subroutine. This causes an endless loop. To differentiate
// when textValueChanged is invoked though user-input or internally, we
// use the flag textValueChangeInvokedInternally to avoid endless loops
{
if (flagTextValueChangeInvokedInternally == true ) {
    //This one no, the next one yes
    flagTextValueChangeInvokedInternally = false;
    return;
}

// If Roi-trapping is activated, don't bother update any values (endless loop...)
if (flagOverrideRoiDraw == true){
    return;
}

//////////
// Checks entries in Calibration, in pixels and mm

int pixels = Integer.parseInt(textPixels.getText());
double mm = Double.parseDouble(textmm.getText());
if (mm/pixels == 0.00529)
{
    DPI.select("4800DPI");
} else if (mm/pixels == 0.010583)
{
    DPI.select("2400DPI");
} else if (mm/pixels == 0.002646)
{
    DPI.select("9600DPI");
} else
{
    DPI.select("Custom");
}

```

```

// Refresh the global variables mmperpixel and umperpixel
if (CalculateMMperPixel() == true)
{ // mmperpixel was modified.
    // Refresh textSqrWidthMM
    flagTextValueChangeInvokedInternally = true;
    textSqrWidthMM.setText(df.format((sqrWidth * mmperpixel)));
}

////////////////////////////////////
// Checks entries in square-Roi Coordinates

sqrX = Integer.parseInt(textSqrX.getText());
sqrY = Integer.parseInt(textSqrY.getText());

// If user typed the width of the square-ROI in mm, then convert to pixels
// If user typed the width of the square-Roi in pixels, then convert to mm
if (event != null) {
    if (event.getSource() == textSqrWidthMM) {
        double iMMRoiWidth = Double.parseDouble(textSqrWidthMM.getText());
        sqrWidth = (int)(iMMRoiWidth/mmperpixel);
        flagTextValueChangeInvokedInternally = true;
        textSqrWidthPix.setText(Integer.toString(sqrWidth));
    }
    else if (event.getSource() == textSqrWidthPix) {
        sqrWidth = Integer.parseInt(textSqrWidthPix.getText());
        flagTextValueChangeInvokedInternally = true;
        textSqrWidthMM.setText(df.format((sqrWidth * mmperpixel)));
    }
}

}

public void itemStateChanged(ItemEvent e)
{
    //////////////////////////////////////
    // Checks entries in DPI Choice-field
    String selection = DPI.getSelectedItem();
    if(e.getSource()== DPI)
    {
        if (selection.equals("4800DPI"))
        {
            textPixels.setText(Integer.toString(1));
            textmm.setText(Double.toString(0.00529));
        } else if (selection.equals("2400DPI"))
        {
            textPixels.setText(Integer.toString(1));
            textmm.setText(Double.toString(0.010583));
        } else if (selection.equals("9600DPI"))
        {
            textPixels.setText(Integer.toString(1));
            textmm.setText(Double.toString(0.002646));
        }

        // Refresh the global variables mmperpixel and umperpixel
        if (CalculateMMperPixel() == true)
        { // mmperpixel was modified.
            // Refresh textSqrWidthMM
            flagTextValueChangeInvokedInternally = true;
            textSqrWidthMM.setText(df.format((sqrWidth * mmperpixel)));
        }
    }

    //////////////////////////////////////
    // Traps entries in grayscaleMapping

```

```

mappingValue = grayscaleMapping.getSelectedItemAt();
if(e.getSource()== grayscaleMapping)
{
    // Predefined grayscaleMin, grayscaleMax for every value selected.
    if (mappingValue.equals("BA/TA (%)"))
    {
        textGrayscaleMin.setText("0");
        textGrayscaleMax.setText("100");
    } else if (mappingValue.equals("Tb.Th (μm)"))
    {
        textGrayscaleMin.setText("0");
        textGrayscaleMax.setText("300");
    } else if (mappingValue.equals("Tb.Sp (μm)"))
    {
        textGrayscaleMin.setText("0");
        textGrayscaleMax.setText("1000");
    } else if (mappingValue.equals("Tb.N (1/mm)"))
    {
        textGrayscaleMin.setText("0");
        textGrayscaleMax.setText("5");
    }

    // Refresh screen
    Graphics panelg = panelMaskContainer.getGraphics();
    panelMaskContainer.update(panelg);
}

}

public void actionPerformed(ActionEvent e) {

////////////////////
// Traps the "Use Current Roi" button
if (e.getSource() == buttonUseCurrentRoi)
{
    TrapUserDefinedRoi();
    imp.draw();
}

////////////////////
// Traps the "Create Square Roi" button
if (e.getSource() == buttonCreateSquareRoi)
{
    // Create a square-Roi according to user-coordinates
    // and then call TrapUserDefinedRoi()
    imp.setRoi(sqrX, sqrY, sqrWidth, sqrWidth);
    TrapUserDefinedRoi();
    imp.draw();
}

////////////////////
// Traps the "MapXXX" buttons
if (e.getSource() == buttonMapAllSquares)
{
    CommandSplitAndAnalyzeSquareRois();
}

if (e.getSource() == buttonMapCurrentRoi)
{
    userRoi = imp.getRoi();
    if (userRoi == null) {
        // No user-defined Roi. Assume entire image
        imp.setActivated();
        IJ.makeRectangle(0, 0, iImageWidth, iImageHeight);
        userRoi = imp.getRoi();
    }
    CommandAnalyzeSingleRoi(userRoi);
}
}

```

```

    if (e.getSource() == buttonMapEntireImage)
    {
        imp.setActivated();
        IJ.makeRectangle(0, 0, iImageWidth, iImageHeight);
        userRoi = imp.getRoi();
        CommandAnalyzeSingleRoi(userRoi);
    }

    //////////////////////////////////////
    // Traps the "Create a Grayscale Mask" button
    if (e.getSource() == buttonGrayscale)
    {
        // If there is no maskIP and no entry in ResultsTable, cannot go on
        int noROIs = rt.getCounter();
        if ((maskIP == null) || (noROIs < 1))
        {
            return;
        }

        // Read user input: which value is to be mapped?
        mappingValue = grayscaleMapping.getSelectedItemAt();

        // Read user input: grayscaleMin and grayscaleMax
        double min = Double.parseDouble(textGrayscaleMin.getText());
        double max = Double.parseDouble(textGrayscaleMax.getText());

        CreateGrayscaleMask(mappingValue, min, max);
    }

    /*****\
    | Calculates the calibration mm-per-pixel and um-per-pixel according
    | to user input, and defines the global variables mmperpixel and umperpixel
    | Returns true if the variables were modified, otherwise returns false
    |
    | *****/
    boolean CalculateMMperPixel(){
        // Calculate micrometers (symbol:  $\mu$ m or um) per pixel
        int pixels = Integer.parseInt(textPixels.getText());
        double mm = Double.parseDouble(textmm.getText());

        //Correct false entries by user
        if (pixels == 0)
        {
            pixels = 1;
            textPixels.setText(Integer.toString(1));
        }

        if (mm <= 0)
        {
            mm = 0.00529;
            textmm.setText(Double.toString(0.00529));
        }
        double new_mmperpixel = mm / pixels;

        if (new_mmperpixel == mmperpixel)
        { // Nothing changed
            return false;
        } else {
            // Update the global values
            mmperpixel = new_mmperpixel;
            umperpixel = mmperpixel * 1000;
            return true;
        }
    }
}

```

```

/*****\
|
|  Creates a new image with the mask of thresholded bone-trabeculae,
|  background-shaded to the user-selected parameter
|
| *****/
void CreateGrayscaleMask(String mappingValue, double min, double max) {

    int noROIs = rt.getCounter();

    // grayscaleIP is the image where the grayscaled mapping will be displayed
    ImageProcessor grayscaleIP = new ByteProcessor(iImageWidth, iImageHeight);
    grayscaleIP.setColor(Color.white);
    grayscaleIP.fill();

    // Print the grayscaled background
    for (int x = 0; (x < noROIs); x++)
    {
        //Roi coordinates
        int X1 = (int)rt.getValue("X1", x);
        int Y1 = (int)rt.getValue("Y1", x);
        int X2 = (int)rt.getValue("X2", x);
        int Y2 = (int)rt.getValue("Y2", x);
        Roi grayRoi = new Roi(X1,Y1,(X2 - X1), (Y2 - Y1));

        //Value to be mapped
        double value = rt.getValue(mappingValue, x);

        // Convert value to grayscale 0-254, according to min, max
        int gray = (int)( 254 * (max - value)/(max) );

        // Paint grayscale value in grayscaleIP
        grayscaleIP.setColor(gray);
        grayscaleIP.setRoi(grayRoi);
        grayscaleIP.fill(grayRoi.getMask());
    }

    // Print the trabeculae of maskIP in grayscaleIP
    grayscaleIP.resetRoi();
    grayscaleIP.setColor(Color.black);

    // Make some corrections on mappingValue, to get valid file-names
    // ('/' character unfortunately forbidden)
    String mappingValueCorrected = mappingValue;

    if (mappingValue.equals("BA/TA (%)" ))
    {
        mappingValueCorrected = "BATA (%)";
    } else if (mappingValue.equals("Tb.Th (µm)"))
    {
        // Do nothing, it's Ok
    } else if (mappingValue.equals("Tb.Sp (µm)"))
    {
        // Do nothing, it's Ok
    } else if (mappingValue.equals("Tb.N (1/mm)"))
    {
        mappingValueCorrected = "Tb.N (1 per mm)";
    }
    }

    new ImagePlus(imageTitle + "_" + mappingValueCorrected , grayscaleIP).show();
    ImageProcessor mask = maskIP.duplicate();
    mask.setMask(maskIP);
    mask.invert();
    grayscaleIP.fill(mask);

    // Print the values on top

```

```

for (int x = 0; (x < noROIs); x++)
{
    //Roi coordinates
    double X1 = (double)rt.getValue("X1", x);
    double Y1 = (double)rt.getValue("Y1", x);
    double X2 = (double)rt.getValue("X2", x);
    double Y2 = (double)rt.getValue("Y2", x);
    double WIDTH = X2-X1;
    double HEIGHT = Y2-Y1;
    //Value to be mapped
    double value = rt.getValue(mappingValue, x);

    // Paint value as string in grayscaleIP
    grayscaleIP.setColor(Color.WHITE);
    Font f = new Font("serif", Font.PLAIN, (int)(WIDTH * 0.2));
    grayscaleIP.setFont(f);
    double X = X1 + ((WIDTH) * 0.2);
    double Y = Y1 + ((HEIGHT) * 0.66);
    grayscaleIP.drawString(df.format(value), (int)X , (int)Y);
}

}

/*****\
|
| Set of custom Roi-classes.
| They override the draw(Graphics g) function of the native Roi-types,
| in order to draw in real-time the bindings of the square-Rois
| to be analyzed
|
| *****/

public class MyPolyRoi extends PolygonRoi {

    public MyPolyRoi(int[] xPoints, int[] yPoints, int nPoints, int type) {
        super(xPoints, yPoints, nPoints, type);
        this.type = MYROI;
    }

    public boolean isArea(){return true;}

    public void draw(Graphics g){
        super.draw(g);
        DrawBoundingSquares(g, this);
    }
}

public class MyOvalRoi extends OvalRoi {
    public MyOvalRoi(int x, int y, int width, int height) {
        super(x, y, width, height);
        this.type = MYROI;
    }

    public boolean isArea(){return true;}

    public void draw(Graphics g){
        super.draw(g);
        DrawBoundingSquares(g, this);
    }
}

public class MyRoi extends Roi {
    public MyRoi(int x, int y, int width, int height) {
        super(x, y, width, height);
        this.type = MYROI;
    }

    public boolean isArea(){return true;}
}

```

```

    public void draw(Graphics g){
        super.draw(g);
        if (flagOverrideRoiDraw == true) {
            DrawBoundingSquares(g, this);
            imp.draw();
        }
    }
}

/*****\
|
|   Draws the bounding of the to-be-mapped squares on the image,
|   and refreshes the global variables sqrWidth, sqrX, sqrY, countSqrRois
|
\*****/
public void DrawBoundingSquares(Graphics g, Roi r)
{
    // Define global variables sqrX, sqrY, sqrWidth
    Rectangle rect = r.getBounds();
    if (rect.width > rect.height)
    {
        sqrWidth = rect.width;
    } else {
        sqrWidth = rect.height;
    }
    sqrX = rect.x;
    sqrY = rect.y;

    // Split image to square Rois of width sqrWidth.
    // sqrXstart and sqrYstart point to the beginning where the splitting procedure should
    // start.
    sqrXstart = sqrX - (((int)(sqrX / sqrWidth)) * sqrWidth);
    sqrYstart = sqrY - (((int)(sqrY / sqrWidth)) * sqrWidth);

    // Global variables iRoisX and iRoisY are the No of Rois in the X and Y axis
    // respectively
    iRoisX = (int) ((iImageWidth - sqrXstart) / sqrWidth);
    iRoisY = (int) ((iImageHeight - sqrYstart) / sqrWidth);
    countSqrRois = iRoisX * iRoisY;

    // Update the appropriate text fields on the panel
    textSqrX.setText(Integer.toString(sqrX));
    textSqrY.setText(Integer.toString(sqrY));
    textSqrWidthPix.setText(Integer.toString(sqrWidth));
    textSqrWidthMM.setText(df.format((sqrWidth * mmperpixel)));
    labelProgress.setText(Integer.toString(0) +
        "/" + Integer.toString(countSqrRois) + " Sqs" );

    g.setColor(Color.BLACK);
    int x; int y; // ROI Coordinates as number
    int iX;      int iY; // ROI Coordinates as pixels
    for ( x = 1; x <= iRoisX; x++) {
        for ( y = 1; y <= iRoisY; y++) {
            iX = sqrXstart + (x-1)*sqrWidth;
            iY = sqrYstart + (y-1)*sqrWidth;

            // Draw a rectangle around the square-Roi of this loop
            // Note: Graphics g requires screen and not Ip coordinates
            g.drawRect(ic.screenX(iX), ic.screenY(iY), ic.screenX(sqrWidth),
            ic.screenY(sqrWidth));
        }
    }
}
}

```

```

/*****\
| Checks the type of the user-defined Roi, and creates a MyXXXRoi equivalent
| in order to override the draw(Graphics g) function of ImageJ's native Rois.
| By internally calling draw(...) -> DrawBoundingSquares(...), this
| procedure automatically sets the global variables: sqrX, sqrY, countSqrRois
| *****/

void TrapUserDefinedRoi(){
    userRoi = imp.getRoi();
    if (userRoi == null) {
        // No user-defined Roi. Assume entire image
        imp.setActivated();
        IJ.makeRectangle(0, 0, iImageWidth, iImageHeight);
        userRoi = imp.getRoi();
    }
    Rectangle saveRoiRect = userRoi.getBounds();

    // Turn on the overriding of native Roi's draw(...) call-back function
    flagOverrideRoiDraw = true;

    switch (userRoi.getType()) {
        case MYROI:
            // Do nothing, it is already 'trapped'
            break;
        case Roi.FREELINE:
        case Roi.FREEROI:
        case Roi.POLYGON:
        case Roi.POLYLINE:
            PolygonRoi polyRoi = (PolygonRoi)userRoi;
            int n = polyRoi.getNCoordinates();
            int[] nx = polyRoi.getXCoordinates();
            int[] ny = polyRoi.getYCoordinates();
            int[] sx = new int[n];
            int[] sy = new int[n];
            System.arraycopy(nx, 0, sx, 0, n);
            System.arraycopy(ny, 0, sy, 0, n);
            MyPolyRoi mypolyRoi = new MyPolyRoi(sx, sy, n, userRoi.getType());
            mypolyRoi.setLocation(saveRoiRect.x, saveRoiRect.y);
            imp.setRoi(mypolyRoi);
            break;
        case Roi.OVAL:
            MyOvalRoi myovalRoi = new MyOvalRoi(saveRoiRect.x, saveRoiRect.y,
            saveRoiRect.width, saveRoiRect.height);
            myovalRoi.setLocation(saveRoiRect.x, saveRoiRect.y);
            imp.setRoi(myovalRoi);
            break;
        case Roi.POINT:
            saveRoiRect = ip.getRoi();
        case Roi.LINE:
        case Roi.RECTANGLE:
        default:
            MyRoi myRoi = new MyRoi(saveRoiRect.x, saveRoiRect.y, saveRoiRect.width,
            saveRoiRect.height);
            myRoi.setLocation(saveRoiRect.x, saveRoiRect.y);
            imp.setRoi(myRoi);
            break;
    }
}

```

```

/*****\
|
|  Splits image to a grid of square Rois of width sqrWidth
|  and performs microstructure analysis in each one of them
|
\*****/
void CommandSplitAndAnalyzeSquareRois(){
// Read Modifiers
    blnSmooth = chkboxSmooth.getState();
    blnDespeckle = chkboxDespeckle.getState();
    blnAutoThreshold = chkboxAutoThreshold.getState();
    if (blnDespeckle == true) {
        speckleSize = Double.parseDouble(textSpeckleSize.getText());
    } else {
        // Accept all particles
        speckleSize = 0;
    }

// maskIP contains the mask of thresholded particles
    maskIP = new ByteProcessor(iImageWidth, iImageHeight);
    maskIP.setColor(Color.white); // White background
    maskIP.fill();
    maskIP.setColor(Color.black); // Black particles, to be added ...

// Initiate Results Table
    rt = Analyzer.getResultsTable();
    rt.reset();
    Analyzer.resetCounter();
    analyzer = new Analyzer(imp);

// Get user-defined Roi from ImagePlus, and "trap" it (if not already done).
// DrawBoundingSquares(), invoked indirectly by TrapUserDefinedRoi(),
// is supposed to refresh the global variables
// sqrWidth, sqrX, sqrY, sqrXstart, sqrYstart, iRoisX, iRoisY
    Roi impRoi = imp.getRoi();
    Rectangle impRoiRect = impRoi.getBounds();
    TrapUserDefinedRoi();

// Split image to square Rois of width sqrWidth.
// sqrXstart and sqrYstart point to the beginning where the splitting procedure should start.
// iRoisX and iRoisY is the No of Rois in the X and Y axis respectively
    int countRoi = 1;
    int x; int y; // ROI Coordinates as numbers
    int iX;      int iY; // ROI Coordinates      as pixels

    for ( x = 1; x <= iRoisX; x++) {
        for ( y = 1; y <= iRoisY; y++) {
            iX = sqrXstart + (x-1)*sqrWidth;
            iY = sqrYstart + (y-1)*sqrWidth;

            // Update ShowProgress
            Graphics panelg = panelMapContainer.getGraphics();
            labelProgress.setText(Integer.toString(countRoi) +
                                "/" + Integer.toString(countSqrRois) + " SqrS"
                                );
            panelMapContainer.update(panelg);
            countRoi++;

            // ip is the real image.
            // ip2 is a copy of the currentRoi as a separate Imageprocessor.
            // The actual processing will take place in ip2.

            ipRectangle = new Rectangle(iX, iY, sqrWidth, sqrWidth);
            Roi ipRoi = new Roi(ipRectangle);
            ip.setRoi(ipRoi);

```

```

        ip2 = ip.crop();
        ip2.resetRoi();

        // Call the scanning-engine
        AnalyzeIp2();
        // and publish the results for this currentRoi
        FillResultsTable();
    }
}

}

/*****\
| Analyzes the user-defined Roi on the current image.
| It can be any type of Roi, even a freehand one.
| *****/

void CommandAnalyzeSingleRoi(Roi roi){
// Read Modifiers
    blnSmooth = chkboxSmooth.getState();
    blnDespeckle = chkboxDespeckle.getState();
    blnAutoThreshold = chkboxAutoThreshold.getState();
    if (blnDespeckle == true) {
        speckleSize = Double.parseDouble(textSpeckleSize.getText());
    } else {
        // Accept all particles
        speckleSize = 0;
    }

// maskIP contains the mask of thresholded particles
    maskIP = new ByteProcessor(iImageWidth, iImageHeight);
    maskIP.setColor(Color.white); // White background
    maskIP.fill();
    maskIP.setColor(Color.black); // Black particles

// Initiate Results Table
    rt = Analyzer.getResultsTable();
    rt.reset();
    Analyzer.resetCounter();
    analyzer = new Analyzer(imp);

// Copy the user-selection to internal clipboard, and paste it to ip2
    imp.copy(false);
    ipRectangle = roi.getBounds();

    ImagePlus impClip = ImagePlus.getClipboard();
    ip2 = impClip.getProcessor().duplicate();
    WindowManager.checkForDuplicateName = true;
    ImagePlus impIp2 = new ImagePlus("ip2", ip2);
    Roi ipRoi = impClip.getRoi();
    impIp2.killRoi();
    if (ipRoi!=null && ipRoi.isArea() && ipRoi.getType()!=Roi.RECTANGLE) {
        ipRoi = (Roi)ipRoi.clone();
        ipRoi.setLocation(0, 0);
        impIp2.setRoi(ipRoi);
        IJ.run(impIp2, "Clear Outside", null);
        impIp2.killRoi();
    }
    impIp2.changes = false;
    impIp2.close();
    ImageProcessor ip2Mask = roi.getMask();
    ip2.setMask(ip2Mask);

// Call the scanning-engine ...

```

```

        AnalyzeIp2();
        // ... and publish the results
        FillResultsTable();
    }

/*****\
|
|     Scans pixel by pixel current-Roi (passed as ip2).
| If ip2 is irregular, it must be passed with the appropriate mask
| If a valid pixel is encountered, analyzeParticle() is called
| in order to wand the particle.
| Modifies the following static variables for further evaluation:
|     currentRoiTotalArea (= area occupied by current-Roi)
|     currentRoiParticlesArea (= area occupied by bone)
|     currentRoiParticlesTotalPerimeter (= total perimeter of bone-particles in
|     currentRoi)
|
| *****/

    void AnalyzeIp2() {
        // Smooth image if wished by user
        if (blnSmooth == true) {
            ip2.smooth();
        }

        // Either accept the user-defined threshold levels of parent-ip
        // or Autothreshold
        if (blnAutoThreshold == true) {
            level1 = 0;
            level2 = ip2.getAutoThreshold();
            ip2.setThreshold(level1, level2, ip2.RED_LUT);
        } else {
            level1 = ip.getMinThreshold();
            level2 = ip.getMaxThreshold();
            ip2.setThreshold(level1, level2, ip2.RED_LUT);
        }

        // Calculate total currentRoi Area
        int[] histogram = ip2.getHistogram();
        currentRoiTotalArea = 0;
        for (int i = 0; i <= 255; i++) {
            currentRoiTotalArea += histogram[i];
        }

        // PolygonFiller pf and FloodFiller ff are needed
        // in order to accurately fill the interior of found particles
        // (see analyzeParticles() for further details
        pf = new PolygonFiller();
        ImageProcessor ipf = ip2.duplicate();
        ipf.setColor(Color.black);
        ff = new FloodFiller(ip2);
        ip2Wand = new Wand(ip2);

        // Initiate particle measurements
        particlesCount = 0;
        particlesTotalArea = 0;
        particlesTotalPerimeter = 0;

        // THIS IS THE MAIN SCANNING ENGINE
        // Iterate through pixels, stop and analyze at every valid point
        int offset = 0;
        double value;
        byte[] pixels = (byte[]) ip2.getPixels();

        int curRoiWidth = ip2.getWidth();
        int curRoiHeight = ip2.getHeight();

        for (int y = 0; y < curRoiHeight; y++) {

```

```

        offset = y * curRoiWidth;
        for (int x = 0; x < curRoiWidth; x++) {

            value = pixels[offset + x] & 255;
            if (value >= level1 && value <= level2){

                // Hooray! We encountered the beginning of a particle
                // Restore currentRoi to the entire ip2
                ip2.resetRoi();
                AnalyzeParticle(x, y, ip2);
            }
        }

        currentRoiParticlesArea = particlesTotalArea;
        currentRoiParticlesTotalPerimeter = particlesTotalPerimeter;
    }

}

/*****\
|
|  Once the Scanning Engine hits a positive pixel, the Wand tool is called
|  to extract the particle. Then follows the calculation of the outer perimeter,
|  as well of as the inner perimeter (if the particle contains holes).
|  Finally the particle is erased, so that the Scanning Engine can hit
|  the next particle
|
| *****/

void AnalyzeParticle(int x, int y, ImageProcessor ip2)
{

    ip2Wand.autoOutline(x, y, level1, level2);

    // Ignore null results, or single pixels
    if (ip2Wand.npoints <= 1) {
        //IJ.log("wand error: " + x + " " + y);
        return;
    }

    PolygonRoi tracedPolygonRoi = new PolygonRoi(ip2Wand.xpoints, ip2Wand.ypoints,
        ip2Wand.npoints, Roi.TRACED_ROI);
    Rectangle tracedRect = tracedPolygonRoi.getBounds();
    ip2.setRoi(tracedRect);

    // Now we want to "erase" our particle painting it white.
    // The "straightforward" approach ip2.fill(tracedPolygonRoi)
    // leads to erroneous filling of the particle without taking into consideration
    // any internal holes.
    // A more accurate filling of the interior of the particle can be achieved
    // with the use of PolygonFiller.getMask() and FloodFiller.particlesAnalyzerFill()
    //

    pf.setPolygon(tracedPolygonRoi.getXCoordinates(), tracedPolygonRoi.getYCoordinates(),
        tracedPolygonRoi.getNCoordinates());
    ip2.setMask(pf.getMask(tracedRect.width, tracedRect.height));
    ip2.setColor(Color.white);
    ff.particleAnalyzerFill(x, y, level1, level2, ip2.getMask(), tracedRect);

    // This piece of code is for debugging purposes. It means: for the first e.g. 3 particles
    // display ip2.getMask() or whatever you like, with a useful comment.
    // You can put as many "process checks" as you wish within this procedure
    //
    /*
    if (particlesCount <= 3)
    {
        ImageProcessor ip4;

```

```

    ip4 = ip2.getMask().duplicate();
    String txt = "ip2.getMask, Particle" + particlesCount;
    new ImagePlus(txt, ip4).show();
    IJ.error(txt + "after ff.particleAnalyzerFill");
}
*/

ImageProcessor maskTracedRect_WithHoles = ip2.getMask().duplicate();

// Now we must check our tracedPolygonRoi for internal holes.
// This is important for calculating the internal perimeter.

// First save current state to restore it later (there will be a mess with ip2)
ip2.snapshot();

// We want to fill our particle as well as everything outside it
// black, so that if there are holes, they will appear
// as the only white pixels within a black tracedRect

// Construct a maskTracedRect_Background with everything surrounding the traced particle
ImageProcessor maskTracedRect_WithoutHoles = tracedPolygonRoi.getMask();
ImageProcessor maskTracedRect_Background = maskTracedRect_WithoutHoles.duplicate();
maskTracedRect_Background.invert();

// Now paint black the two masks: maskIp2_WithHoles + maskIp2_Background
// This should leave only white holes (if any) in a fully black ip2
ip2.setRoi(tracedRect);
ip2.setColor(Color.white);
ip2.fill();
ip2.setColor(Color.black);
ip2.fill(maskTracedRect_WithHoles);
ip2.fill(maskTracedRect_Background);

// Now Iterate through pixels within tracedRect,
// stop if a white pixel is encountered
double internalHolesPerimeter = 0;

int offset = 0;
int value;
byte[] pixels = (byte[]) ip2.getPixels();
int width = ip2.getWidth();

// yParticle, xParticles are local variables used for scanning within tracedRect
for (int yParticle = tracedRect.y; yParticle < (tracedRect.y + tracedRect.height);
yParticle++) {
    offset = yParticle * width;
    for (int xParticle = tracedRect.x; xParticle < (tracedRect.x + tracedRect.width);
xParticle++) {
        value = (int)(pixels[offset + xParticle] & 255);
        if (value == 255){ // = white

            // Hooray! We encountered a bit of white-hole within our particle
            // Invoke the Wand tool, get the outline, and calculate the internal
            // perimeter
            ip2Wand.autoOutline(xParticle, yParticle, 255, 255);
            PolygonRoi internalHolePolygonRoi =
                new PolygonRoi(ip2Wand.xpoints,
                    ip2Wand.ypoints, ip2Wand.npoints, Roi.TRACED_ROI);

            internalHolesPerimeter += internalHolePolygonRoi.getLength();
            // Now erase this internal hole ("paint it black")
            // and proceed for the next one (if exists)
            ip2.setRoi(internalHolePolygonRoi);
            ip2.setColor(Color.black);

```

```

        ip2.fill(ip2.getMask());
    }
}

// Now, all internal holes must have been deleted,
// which means tracedRect is all black!. Now, restore the mess
ip2.reset();

// Measurements for the tracedPolygonRoi
double tracedRoiArea = 0;
double tracedRoiPerimeter = 0;

int[] histogram = maskTracedRect_WithHoles.getHistogram();
for (int i = 0; i <= 255; i++) {
    long count;
    count = histogram[i];
    tracedRoiArea += count;
}
tracedRoiArea = histogram[255];

// Continue with calculations only if tracedRoiArea is above
// the user-defined radius of SpeckleSize
if (tracedRoiArea > (Math.PI * Math.pow(speckleSize, 2)))
{
    tracedRoiPerimeter = tracedPolygonRoi.getLength();

    // Add the perimeter of internal holes.
    // NOTE: in bone histomorphometry, "perimeter" refers to the length
    // bone-marrow interface, even if when the interface
    // is a "hole" of marrow within a bone structure.
    tracedRoiPerimeter += internalHolesPerimeter;

    particlesTotalArea += tracedRoiArea;
    particlesTotalPerimeter += tracedRoiPerimeter;

    // Draw tracedPolygonRoi as mask in maskIP
    // Remember: the whole ip2 is a copy of ipRoi
    // and is contained within ipRectangle
    if (maskIP != null)
    {
        tracedPolygonRoi.setLocation(ipRectangle.x + tracedRect.x, ipRectangle.y +
        tracedRect.y);
        maskIP.setRoi(tracedPolygonRoi);
        maskIP.setMask(maskTracedRect_WithHoles);
        maskIP.fill(ip2.getMask());

        particlesCount++;
    }
}
}

```

```

/*****\
|
| Takes the global variables:
| currentRoiTotalArea (= area occupied by currentRoi)
| currentRoiParticlesArea (= area occupied by bone)
| currentRoiParticlesTotalPerimeter (= total perimeter of bone-particles in
| currentRoi)
| and calculates the bone-microstructure parameters according to Parfitt.
| The results are added to the results-table rt
|
| *****/
void FillResultsTable() {
    // Calculate values according to Parfitt
    double BAR; //Bone Area
    double TAR; // Tissue Area
    double BPm; // Bone Perimeter
    double BATA; // Bone Area fraction
    double BSTV; // Bone Surface
    double TbTh; // Trabecular Thickness
    double TbSp; // Trabecular Separation
    double TbN; // Trabecular Number

    TAR = currentRoiTotalArea;
    BAR = currentRoiParticlesArea;
    BPm = currentRoiParticlesTotalPerimeter;

    BATA = BAR/TAR;
    BSTV = (BPm/TAR);
    TbTh = (2)* (BAR/BPm);
    TbSp = (2) * (TAR - BAR) / BPm;
    TbN = (0.5)* (BPm/TAR);

    // Fill Results table
    rt.setPrecision(3);

    // Increment count and upper-left coordinates of every square-ROI examined
    rt.incrementCounter();
    rt.addValue("X1", ipRectangle.getBounds().getX());
    rt.addValue("Y1", ipRectangle.getBounds().getY());
    rt.addValue("X2", ipRectangle.getBounds().getX() + ipRectangle.width - 1);
    rt.addValue("Y2", ipRectangle.getBounds().getY() + ipRectangle.height - 1);

    // Bone Parameters
    rt.addValue("BA/TA (%)", BATA*100);
    rt.addValue("Tb.Th (µm)", TbTh * umperpixel);
    rt.addValue("Tb.Sp (µm)", TbSp * umperpixel);
    rt.setPrecision(5);
    rt.addValue("Tb.N (1/mm)", TbN / (mmperpixel));
    rt.show("Results");
}
}

```

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Parfitt AM, Mathews CHE, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between Surface, Volume, and Thickness of Iliac Trabecular Bone in Aging and in Osteoporosis. *J Clin Invest*. 1983;72;1396-1409
- ² Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987 Dec;2(6):595-610.
- ³ Parkinson IH, Fazzalari NL. Interrelationships between structural parameters of cancellous bone reveal accelerated structural change at low bone volume. *J Bone Miner Res*. 2003 Dec;18(12):2200-5.
- ⁴ Vidal B, Pinto A, Galvão MJ, Santos AR, Rodrigues A, Casco R, Abdulghani S, Caetano-Lopes J, Ferreira A, Fonseca JE, Canha H. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port*. 2012;37:294-300
- ⁵ Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982; 11(4):318-326.
- ⁶ Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Apr 1;10 Suppl 1:E74-87.
- ⁷ Hahn M, Vogel M, Delling G. Undecalcified preparation of bone tissue: report of technical experience and development of new methods. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol*. 1991;418;1-7
- ⁸ Alava JI, Marin F, Intxaurandieta A, Bracerás I, De Maeztu MA. Simultaneous materialographic and histological thin section preparation: Investigation of bone integration on dental implants. *Structure Struers J Materialography* 2005; 6: 1–6.
- ⁹ Draenert M, Draenert A, Draenert K. Osseointegration of hydroxyapatite and remodeling-resorption of tricalciumphosphate ceramics. *Microsc Res Tech*. 2013 Feb 7. . [Epub ahead of print]
- ¹⁰ Saksø H, T Jakobsen, M Saksø, J Baas, SS Jakobsen, and K Soballe. No Positive Effect of Acid Etching or Plasma Cleaning on Osseointegration of Titanium Implants in a Canine Femoral Condyle Press-Fit Model. *Open Orthop J*. 2013; 7: 1–7.
- ¹¹ Shon WJ, Chung SH, Kim HK, Han GJ, Cho BH, Park YS. Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Feb 13.]
- ¹² Iezzi G, Degidi M, Piattelli A, Shibli JA, Perrotti V. A Histological and Histomorphometrical Evaluation of Retrieved Human Implants With a Wetttable, Highly Hydrophilic, Hierarchically Microstructured Surface: A Retrospective Analysis of 14 Implants. *Implant Dent*. 2013 Jan 22. [Epub ahead of print]

-
- ¹³ Oltramari-Navarro PV, Navarro RL, Henriques JF, Cestari TM, Francischone CE, Taga R, McNamara JA Jr. The impact of healing time before loading on orthodontic mini-implant stability: A histomorphometric study in minipigs. *Arch Oral Biol.* 2013 Jan 18. pii: S0003-9969(12)00455-4. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.12.010. [Epub ahead of print]
- ¹⁴ Möller B, Terheyden H, Acil Y, Purcz NM, Hertrampf K, Tabakov A, Behrens E, Wiltfang J. A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 41(5):638-45.
- ¹⁵ Back DA, Pauly S, Rommel L, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B, Greiner SH. Effect of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Mar 22;13:42.
- ¹⁶ Shi L, Wang L, Zhang Y, Guo Z, Wu ZX, Liu D, Gao MX, Chen H, Fu SC, Lei W. Improving fixation strength of pedicle screw by microarc oxidation treatment: an experimental study of osteoporotic spine in sheep. *J Orthop Res.* 2012 Aug;30(8):1296-303
- ¹⁷ Grandfield K, Palmquist A, Gonçalves S, Taylor A, Taylor M, Emanuelsson L, Thomsen P, Engqvist H. Free form fabricated features on CoCr implants with and without hydroxyapatite coating in vivo: a comparative study of bone contact and bone growth induction. *J Mater Sci Mater Med.* 2011 22(4):899-906.
- ¹⁸ Silva GA, Moreira A, Alves JB. Histological processing of teeth and periodontal tissues for light microscopy analysis. *Methods Mol Biol.* 2011;689:19-36.
- ¹⁹ Gutwald R, Schön R, Metzger M, Kreutzer K, Rahn B, Schmelzeisen R, Sauerbier S. Miniplate osteosynthesis with four different systems in sheep. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2011; 40: 94–102.
- ²⁰ Johansson CB, Jimbo R, Roeser K. 2011. In P. Ducheyne (Ed. in chief). *Comprehensive Biomaterials*. Oxford: Elsevier
- ²¹ Yin H, Li J, Yu X, Fu Z. Effects of simvastatin on osseointegration in a canine total hip arthroplasty model: an experimental study. *J Arthroplasty.* 2011 Dec;26(8):1534-9
- ²² Deguchi T, Yabuuchi T, Hasegawa M, Garetto LP, Roberts WE, Takano-Yamamoto T. Histomorphometric evaluation of cortical bone thickness surrounding miniscrew for orthodontic anchorage. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011 13(3) 197-205.
- ²³ Rüger M, Gensior TJ, Herren C, von Walter M, Ocklenburg C, Marx R, Erli HJ. The removal of Al₂O₃ particles from grit-blasted titanium implant surfaces: effects on biocompatibility, osseointegration and interface strength in vivo. *Acta Biomater.* 2010 Jul;6(7):2852-61
- ²⁴ De Maezta MA, Braceras I, Alava JI, Gay-Escoda C. Improvement of osseointegration of titanium dental implant surfaces modified with CO ions: a comparative histomorphometric study in beagle dogs. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008; 37: 441–447.
- ²⁵ Rammelt S, Corbeil D, Manthey S, Zwipp H, Hanisch U. Immunohistochemical in situ characterization of orthopedic implants on polymethyl metacrylate embedded cutting and grinding sections. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Nov;83(2):313-22

-
- ²⁶ Artzi Z, Weinreb M, Tal H, Nemcovsky CE, Rohrer MD, Prasad HS, Kozlovsky A. Experimental intrabony and periodontal defects treated with natural mineral combined with a synthetic cell-binding Peptide in the canine: morphometric evaluations. *J Periodontol*. 2006 Oct; 77(10):1658-64.
- ²⁷ Franchia M, Finib M, Martinia D, Orsinia E, Leonardia L, Ruggeria A, Giavaresia G, Ottania V. Biological fixation of endosseous implants. *Micron* 2005 36: 665–671
- ²⁸ Hasegawa T, Inufusa A, Imai Y, Mikawa Y, Lim TH, An HS. Hydroxyapatite-coating of pedicle screws improves resistance against pull-out force in the osteoporotic canine lumbar spine model: a pilot study. *Spine J*. 2005 May-Jun;5(3):239-43.
- ²⁹ Kusakabe H, Sakamaki T, Nihei K, Oyama Y, Yanagimoto S, Ichimiya M, Kimura J, Toyama Y. Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem. *Biomaterials*. 2004 25(15):2957-69.
- ³⁰ De Maeztu MA, Alava JI, Gay-Escoda C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Feb;14(1):57-62.
- ³¹ Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Jan-Feb;18(1):15-22.
- ³² Zechner W, Tangl S, Fürst G, Tepper G, Thams U, Mailath G, Watzek G. Osseous healing characteristics of three different implant types. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Apr;14(2):150-7.
- ³³ Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Apr;12(2):128-34.
- ³⁴ Fajardo RJ, Ryan TM, Kappelman J. Assessing the accuracy of high-resolution X-ray computed tomography of primate trabecular bone by comparisons with histological sections. *Am J Phys Anthropol*. 2002 May;118(1):1-10.
- ³⁵ Nosaka Y, Kitano S, Wada K, Komori T. Endosseous implants in horizontal alveolar ridge distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Nov-Dec;17(6):846-53.
- ³⁶ Zaffe D, Bertoldi C, Palumbo C, Consolo U. Morphofunctional and clinical study on mandibular alveolar distraction osteogenesis. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Oct;13(5):550-7.
- ³⁷ Klug CN, Millesi-Schobel GA, Millesi W, Watzinger F, Ewers R. Preprosthetic vertical distraction osteogenesis of the mandible using an L-shaped osteotomy and titanium membranes for guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Nov;59(11):1302-8;
- ³⁸ Oda T, Sawaki Y, Ueda M. Experimental alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis using a simple device that permits secondary implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Jan-Feb;15(1):95-102.
- ³⁹ Block MS, Almerico B, Crawford C, Gardiner D, Chang A. Bone response to functioning implants in dog mandibular alveolar ridges augmented with distraction osteogenesis.

Int J Oral Maxillofac Implants. 1998 May-Jun;13(3):342-51.

⁴⁰ Chappard D, Aguado E, Huré G, Grizon F, Basle MF. The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3- and 6-month study in sheep. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999 Mar-Apr;14(2):189-96.

⁴¹ Lind M, Overgaard S, Bunger C, Soballe K. Improved bone anchorage of hydroxyapatite coated implants compared with tricalcium-phosphate coated implants in trabecular bone in dogs. Biomaterials. 1999 20(9):803-8.

⁴² Piattelli A, Piattelli M, Scarano A. Simultaneous demonstration of alkaline and acid phosphatase activity in bone, at bone-implant interfaces and at the epiphyseal growth plate in plastic-embedded undemineralized tissues. Biomaterials 1997(18); 545-549.

⁴³ Amling M, Posl M, Ritzel H, Hahn M, Vogel M, Wening VJ, Delling G. A histomorphometric analysis of the complete spinal column from 40 autopsy specimens. Arch Orthop Trauma Surg. 1996;115(5):262-9.

⁴⁴ Hahn M, Vogel M, Amling M, Ritzel H, Delling G. Microcallus formations of the cancellous bone: a quantitative analysis of the human spine. J Bone Miner Res. 1995 Sep;10(9):1410-6.

⁴⁵ Amling M, Hahn M, Wening VJ, Grote HJ, Delling G. The microarchitecture of the axis as the predisposing factor for fracture of the base of the odontoid process. A histomorphometric analysis of twenty-two autopsy specimens. J Bone Joint Surg Am. 1994 Dec;76(12):1840-6.

⁴⁶ Odgaard A, Andersen K, Ullerup R, Frich LH, Melsen F. Three-dimensional reconstruction of entire vertebral bodies. Bone. 1994;15:335-342.

⁴⁷ Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Hjortdal VE, Juhl GI, Pedersen CM, Hvid I, Bünger C. Fixation of titanium and hydroxyapatite-coated implants in arthritic osteopenic bone. J Arthroplasty. 1991 Dec;6(4):307-16.

⁴⁸ Fazzalari NL, Parkinson FH. Femoral trabecular bone of osteoarthritic and normal subjects in an age and sex matched group. Osteoarthritis and Cartilage. 1998;6; 377-382

⁴⁹ Callis GM. 2008. Bone. In J. D. Bancroft, M. Gamble (eds). Theory and practice of histological techniques. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier

⁵⁰ <http://www.brsoc.org.uk/gallery/index.htm>

⁵¹ Vijayanpalan V., Sutton-Smith P., Parkinson I., Martin B., Fazzalari N. Trabecular Rod Thickness by Direct Measurement From 3D SEM Analysis. Anat Rec A. 2003; 271 ; 286-290.

⁵² Odgaard A. Three dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. Bone. 1997;20;315-328.

⁵³ Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rüegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1167-74.

⁵⁴ Rietbergen BV, Huiskes R, Eckstein F, Ruegsegger P. Trabecular bone tissue strains in the healthy and osteoporotic human femur. JBMR. 2003; 18(10):1781-1788.

-
- ⁵⁵ Müller R, Hahn M, Vogel M, Delling G, Rügsegger P. Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies. Comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. *Bone*. 1996;18;215-220.
- ⁵⁶ Kingsmill VJ, Boyde A. 1998. Variation in the apparent density of human mandibular bone with age and dental status. *J Anat*. 1998;192;233-244.
- ⁵⁷ Ding M, Odgaard A, Hvid I. Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by Micro-CT scanning. *J Biomech*. 1999;32;323-326.
- ⁵⁸ Odgaard A, Andersen K, Ullerup R, Frich LH, Melsen F. Three-dimensional reconstruction of entire vertebral bodies. *Bone*. 1994;15;335-342.
- ⁵⁹ Neilson M, White A, Malik U, Morrison E, McGill P, McDonald SW. Changes in bone architecture in the femoral head and neck in osteoarthritis. *Clin Anat* 2004;17;378-391
- ⁶⁰ http://fiji.sc/wiki/index.php/Auto_Threshold
- ⁶¹ Sangole AP, Aubin CE, Labelle H, Stokes IA, Lenke LG, Jackson R, Newton P. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Jan 1;34(1):91-9. Three-dimensional classification of thoracic scoliotic curves.
- ⁶² Clementino-Luedemann TN, Kunzelmann KH. Mineral concentration of natural human teeth by a commercial micro-CT. *Dent Mater J*. 2006 Mar;25(1):113-9.
- ⁶³ Baiker M, Milles J, Dijkstra J, Henning TD, Weber AW, Que I, Kaijzel EL, Löwik CW, Reiber JH, Lelieveldt BP. Atlas-based whole-body segmentation of mice from low-contrast Micro-CT data. *Med Image Anal*. 2010 Dec;14(6):723-37
- ⁶⁴ Doube M, Kłosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, Jackson JS, Schmid B, Hutchinson JR, Shefelbine SJ. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*. 2010 Dec;47(6):1076-9.
- ⁶⁵ Fazzalari NL, Darracott J, Vernon-Roberts B. Histomorphometric changes in the trabecular structure of a selected stress region in the femur in patients with osteoarthritis and fracture of the femoral neck. *Bone*. 1985;6(3):125-33