

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

**Scuola di Scienze  
Corso di Laurea Magistrale in Fisica**

**Controlli di qualità e rappresentazione 3D delle  
microtomografie a raggi X applicate allo studio dei  
modelli murini per la progeria**

**RELATORE:**  
Prof.ssa Maria Pia Morigi

**PRESENTATA DA:**  
Anna Festa

**CORRELATORE:**  
Dott. Fabio Baruffaldi

**TERZA SESSIONE**

---

**ANNO ACCADEMICO 2016-2017**



“The way to know life  
is to love many things.”

*Vincent Van Gogh*



# Abstract

La progeria è una malattia genetica rarissima che genera un invecchiamento precoce, con una incidenza di 1 caso su 4 milioni di nascite e circa 100 casi noti attualmente in tutto il mondo. L'età media di sopravvivenza è di circa 13.5 anni, con una aspettativa di vita tra gli 8 e i 21 anni.

La massa ossea ridotta e le anomalie scheletriche sono tra i principali disordini dell'invecchiamento precoce.

Al fine di sviluppare una migliore comprensione della patogenesi e della progressione della sindrome, oltre che per progredire nelle possibili terapie, sono stati sviluppati modelli animali che replicano in-vivo ed in condizioni controllate la genesi e l'evoluzione della malattia. Uno dei modelli animali più diffusi è quello murino, il cui sistema scheletrico può essere studiato mediante microtomografia a raggi X.

Attualmente considerata come il *gold standard*, grazie alla sua elevata risoluzione spaziale, la micro-CT fornisce importanti indicazioni sulla struttura trabecolare e corticale del tessuto osseo.

Le misure microtomografiche dei segmenti ossei murini sono affette da variabilità intrinseca legata ai parametri di scansione, al posizionamento del campione da parte dell'operatore, alla selezione manuale o automatizzata della ROI, alla scelta del filtro e dei parametri di segmentazione.

Questo lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Tecnologia Medica (LTM) dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) di Bologna, parte da una approfondita ricerca bibliografica in merito ad accuratezza e ripetibilità delle misure ossee morfometriche e densitometriche del modello murino analizzato mediante micro-CT. Sono stati quindi definiti e applicati opportuni protocolli di controllo qualità, di scansione e di rendering 3D al fine di avere la possibilità di confronto riguardo i modelli murini analizzati, in particolare per il femore e il cranio, e opportunità di indagine più approfondita tramite la visualizzazione tridimensionale dei campioni in analisi.



# Indice

Introduzione.....	1
CAPITOLO 1: Sistema scheletrico e patologie associate .....	1
Struttura del tessuto osseo .....	1
Morfologia e composizione .....	2
Biologia del tessuto osseo .....	3
Osso corticale e trabecolare .....	5
Ricambio e sviluppo del tessuto osseo .....	7
Osteoporosi.....	10
Deterioramento della massa ossea correlata all'età.....	11
Progeria .....	12
Modelli murini per la ricerca .....	13
CAPITOLO 2: Tecniche di imaging per la caratterizzazione della struttura ossea.....	15
Principali tecniche di imaging applicate al tessuto osseo .....	15
Tomografia Computerizzata .....	17
CT Quantitativa (QCT) e CT Quantitativa Periferica (pQCT).....	21
Micro-CT.....	22
Microtomografia con luce di Sincrotrone (SR- $\mu$ CT) .....	23
Ultrasonografia ossea quantitativa.....	24
Risonanza magnetica e $\mu$ MRI .....	25
CAPITOLO 3: Principi di tomografia a raggi X .....	26
Produzione di raggi X e loro interazione con la materia .....	26
Attenuazione del fascio .....	31
Metodi di ricostruzione tomografica .....	33
Scala delle unità Hounsfield.....	37
Artefatti tomografici .....	38
CAPITOLO 4: Microtomografia a raggi X del tessuto osseo .....	42
Il sistema microtomografico a raggi X.....	42
Il microtomografo Skyscan 1072 .....	44
Parametri strutturali del tessuto osseo .....	45
Densità minerale delle ossa e del tessuto.....	52
CAPITOLO 5: Ripetibilità e accuratezza.....	53
Preparazione del campione e posizionamento.....	54
Mezzo di scansione.....	55
Intensità .....	55

Calibrazione.....	55
Dimensione del voxel e risoluzione dell'immagine .....	58
Regione di interesse.....	60
Filtraggio .....	62
Segmentazione.....	62
Parametri e metodi di indagine a confronto in merito a ripetibilità e accuratezza. ....	67
CAPITOLO 6: Controllo qualità .....	77
Software utilizzati.....	77
Allineamento sorgente-telecamera ( <i>frequenza bimestrale</i> ) .....	79
BHC: Beam Hardening Correction ( <i>frequenza semestrale</i> ) .....	81
Calibrazione dei livelli di grigio in g/cm <sup>3</sup> di HA equivalente (Bone Mineral Density) ( <i>frequenza bimestrale</i> ).....	86
Monitoraggio parametri morfometrici e TDM ( <i>frequenza bimestrale</i> ) .....	90
Rumore ed uniformità ( <i>frequenza semestrale</i> ) .....	92
CAPITOLO 7: Micro-CT applicata ad un modello murino della progeria .....	96
Campioni ossei .....	96
Preparazione del campione e configurazione della strumentazione .....	97
Acquisizione dati .....	98
Ricostruzione delle sezioni .....	99
Unione di due dataset .....	102
Segmentazione e calcolo dei parametri morfometrici .....	103
CAPITOLO 8: Rendering 3D.....	106
Creazione immagini color-coded in CT-Analyser.....	106
Creazione del modello 3D in CT-Vox.....	108
Conclusioni.....	117
Bibliografia.....	118





# Introduzione

L'aumento dell'età media nella popolazione ha portato ad un incremento nel numero di studi volti alla comprensione dei meccanismi che caratterizzano le fratture ossee causate dall'invecchiamento, al fine di sviluppare strategie per la prevenzione ed un adeguato piano di trattamento. L'osteoporosi costituisce una delle principali cause di fratture ed è la seconda malattia cronica più diffusa dopo quella cardiovascolare.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce l'osteoporosi una malattia sistemica, caratterizzata da un decremento quantitativo nella massa ossea (osteopenia) e da un deterioramento qualitativo della microarchitettura del tessuto osseo, con conseguente aumento della fragilità e suscettibilità alla frattura. La tecnica considerata tradizionalmente il *gold standard* per la caratterizzazione della struttura dell'osso trabecolare e corticale è l'istologia. Tuttavia, malgrado l'elevata accuratezza, questa tecnica è una procedura laboriosa e distruttiva, che dà una rappresentazione bidimensionale della struttura tridimensionale dell'osso.

Sono state sviluppate diverse tecniche di imaging 3D, come la micro-CT e la micro-MRI, che permettono uno studio non distruttivo del provino. In particolare, la microtomografia computerizzata a raggi X è utilizzata per studi di istomorfometria nell'osso trabecolare e caratterizzazione dei biomateriali con misure di porosità nell'osso corticale.

Oggi, la micro-CT è diventata il nuovo *gold standard* per la valutazione della morfologia e della microstruttura ossea nei modelli murini e in altri modelli animali ex-vivo di piccole dimensioni. Al momento, gli scanner micro-CT disponibili raggiungono una dimensione voxel isotropica di qualche micrometro, sufficiente per investigare strutture come le trabecole del topo che hanno una grandezza che va approssimativamente dai 30 ai 50  $\mu\text{m}$ .

L'accuratezza delle misure morfometriche micro-CT è stata valutata in letteratura tramite confronti con misure tradizionali 2D istomorfometriche, sia in campioni animali che umani. Questi studi hanno mostrato che le misure morfologiche 2D e 3D ottenute tramite micro-CT sono generalmente altamente correlate con quelle 2D istomorfometriche e questo rappresenta una forte motivazione per l'uso della microtomografia per indagare la morfologia scheletrica.

La massa ossea ridotta e le anomalie scheletriche sono tra i principali disordini dell'invecchiamento precoce, inclusa la *Hutchinson Gilford Progeria syndrome* (HGPS). I due danni molecolari noti che inducono progeria sono il gene LMNA mutato e/o il processo post-traslazionale anomalo (mutazioni nel gene ZMPSTE24).

Descritta per la prima volta da J. Hutchinson nel 1886 e da H. Gilford nel 1904, la progeria ha una incidenza di 1 su 4 milioni di nascite e attualmente ci sono 100 casi noti in tutto il mondo; l'età media di sopravvivenza è di circa 13.5 anni, con aspettativa di vita tra gli 8 e i 21 anni.

Al fine di sviluppare una migliore comprensione della patogenesi e della progressione della sindrome, oltre che per progredire in potenziali terapie, si sono sviluppati modelli animali con la stessa patologia.

In questo lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Tecnologia Medica (LTM) dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR, Bologna, Italia), si è definita una procedura di controllo della qualità per misure effettuate su scansioni microtomografiche di segmenti ossei, in particolare su femore, di un modello murino per la progeria tramite l'utilizzo di diversi fantocci. Si è poi descritta ed applicata la procedura di imaging utilizzata per misurazioni morfometriche e densitometriche su campioni quali femore e cranio di un modello murino. In conclusione, si sono analizzati il femore ed il cranio del modello animale riguardo la loro migliore rappresentazione 3D mediante opportune tecniche di rendering, utilizzando i software messi a disposizione dalla casa di produzione Bruker del microtomografo Skyscan 1072 utilizzato nell'intero studio.

La tesi è strutturata in 8 capitoli.

Il primo capitolo tratta le caratteristiche del tessuto osseo, la sua organizzazione strutturale e la sua biologia; il capitolo si chiude con la presentazione delle patologie ossee correlate all'età, l'osteoporosi e la sindrome di Hutchinson-Gilford.

Nel secondo capitolo sono descritte le principali tecniche di imaging applicate al tessuto osseo partendo dall'evoluzione degli scanner per la tomografia computerizzata. Nel terzo capitolo si introducono i principi tomografici a partire dall'interazione dei raggi X con la materia; si analizzano i metodi di ricostruzione tomografica e gli artefatti dovuti ad un fascio policromatico.

Il capitolo quattro si apre con la descrizione di un sistema microtomografico e si conclude con l'elenco dei principali parametri morfometrici 2D e 3D caratterizzanti la microarchitettura ossea.

Il quinto capitolo è dedicato alla ricerca bibliografica in merito alla ripetibilità e accuratezza e ai principali fattori che possono influenzarli nelle varie tecniche per indagare l'osso.

Il sesto capitolo riporta la descrizione dei software utilizzati e l'applicazione del protocollo di controllo qualità.

Nel settimo capitolo è esposta la procedura di scansione, ricostruzione e analisi per la micro-CT applicata ad un modello murino della progeria.

L'ultimo capitolo è dedicato al rendering 3D dei campioni ossei del modello murino.

L'appendice è dedicata alla descrizione delle principali grandezze dosimetriche.



# CAPITOLO 1

## Sistema scheletrico e patologie associate

### Struttura del tessuto osseo

Le componenti principali del sistema scheletrico sono le 206 ossa (alla nascita sono 270, ma con la crescita molte di loro si fondono insieme) e il tessuto connettivo (come cartilagine e tendini) che le tiene legate.

Le funzioni fondamentali dello scheletro sono quelle di fornire un supporto e dare una forma al nostro corpo, fornire protezione ad altri sistemi ed organi, trasmettere forza muscolare durante il movimento, produrre globuli rossi. Il contenuto minerale dell'osso funge da serbatoio per gli ioni, in particolare il calcio, e contribuisce anche alla regolazione della composizione del fluido extracellulare. L'osso è un materiale strutturale auto-riparatore, in grado di adattare la sua massa, la forma e le proprietà ai cambiamenti nei requisiti meccanici durante la vita dell'essere umano.

Lo scheletro umano può essere suddiviso in scheletro assiale e scheletro appendicolare. Il primo è costituito da circa 80 ossa: colonna vertebrale, gabbia toracica, cranio ed ossa associate; la sua funzione è quella di mantenere la posizione eretta. Il secondo, connesso con il primo, è formato da 126 ossa e in particolare dalla cintura scapolare, dalla cintura pelvica e dalle ossa degli arti superiori ed inferiori; la sua funzione è quella di proteggere i maggiori organi della digestione, escrezione e riproduzione e ci permette di camminare.

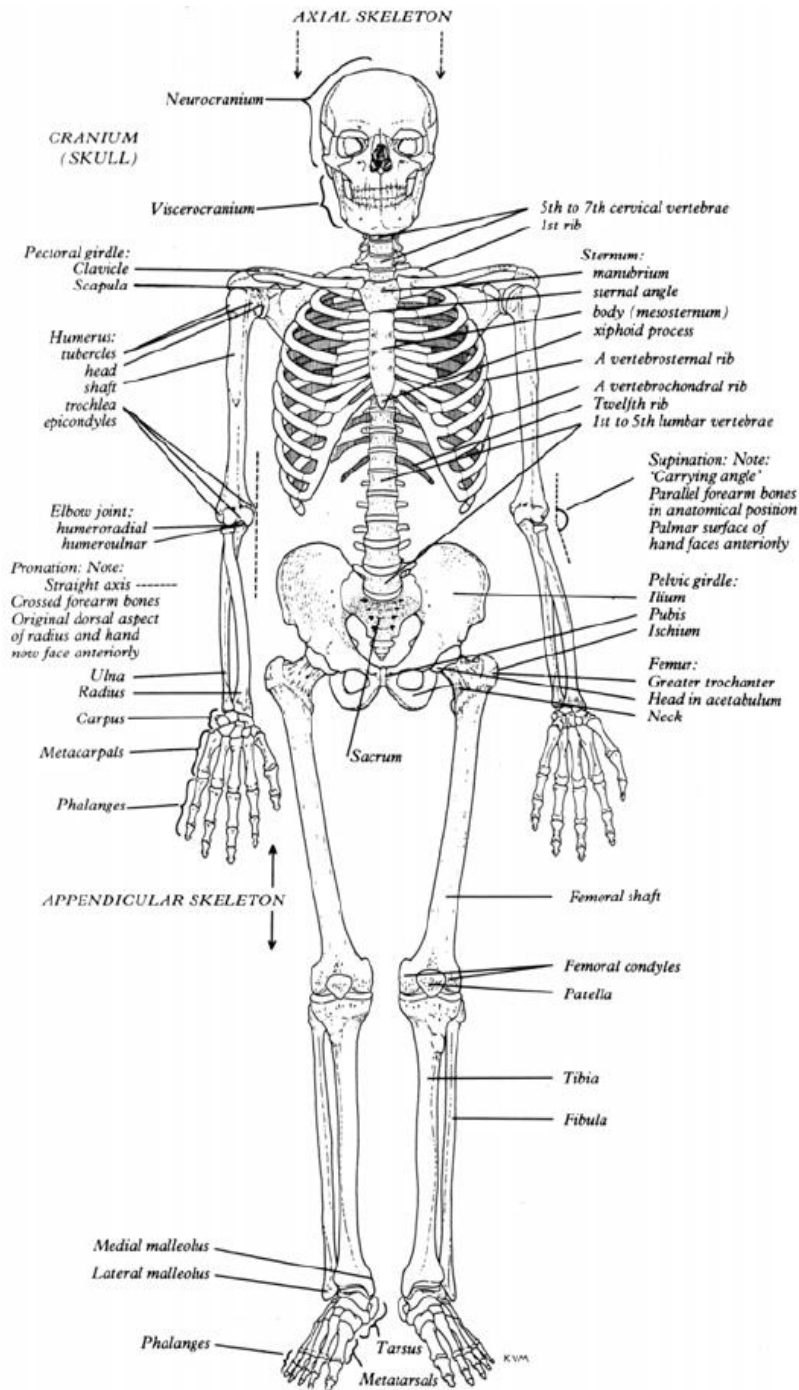


Figura 1: Vista anteriore di scheletro umano adulto.

## Morfologia e composizione

L'osso risulta costituito per il 65% da una componente minerale formata da cristalli di idrossiapatite  $Ca_6(PO_4)_6(OH)_2$  e da ioni sodio, magnesio, carbonato e citrato, e per il restante 35% da una fase organica, (cellule e acqua) costituita per il 95% da fibre di collagene (proteine) e per il 5% da mucopolisaccaridi [14].

In base alla loro morfologia, le ossa possono essere distinte in [91]:

- Ossa lunghe: arti, come femore, tibia e omero
- Ossa corte: ad esempio carpo, tarso
- Ossa piatte: ad esempio cranio e scapola
- Ossa irregolari: ad esempio le vertebre

Un tipico esempio della morfologia macroscopica delle ossa può essere dato dalle ossa lunghe. Come descritto dalla figura sottostante, esse sono costituite da un corpo cilindrico, o diafisi, e due estremità più ampie e rotonde dette epifisi. Le regioni coniche, dette metafisi, connettono la diafisi e l'epifisi.

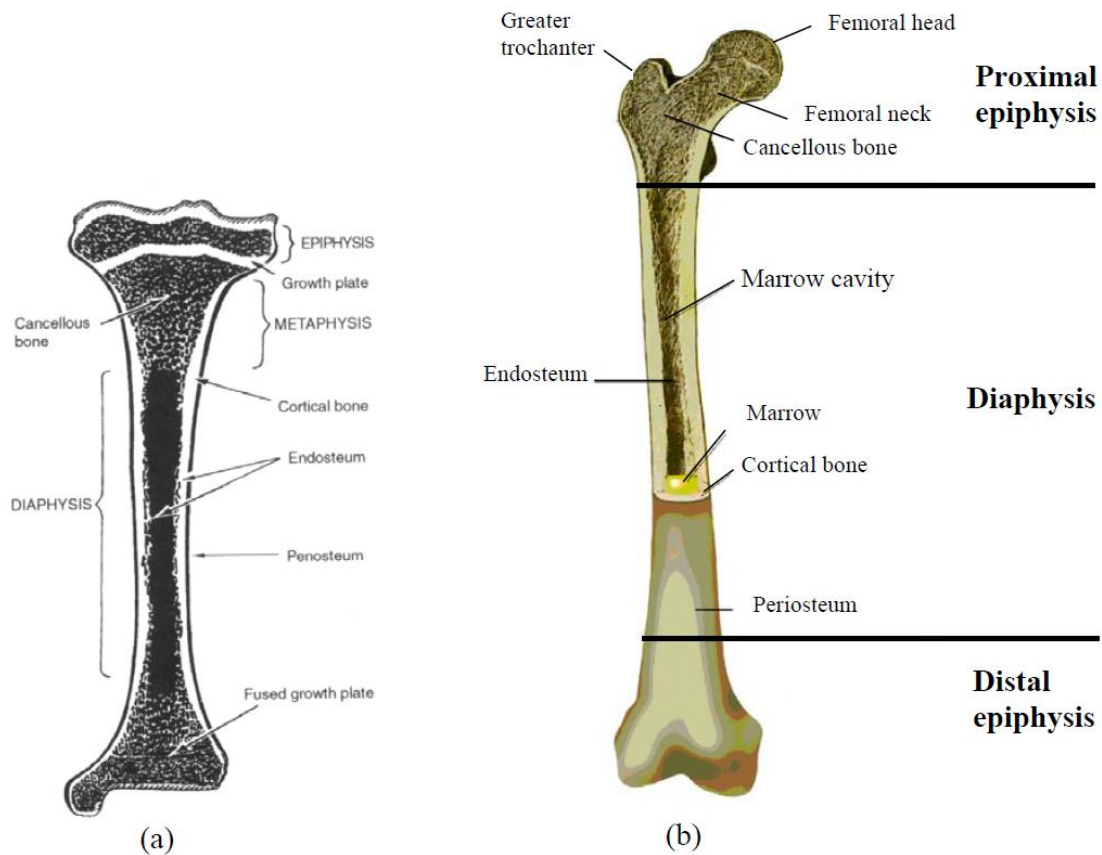


Figura 2: Rappresentazione schematica di (a) tibia umana e (b) femore umano.

## Biologia del tessuto osseo

Il tessuto osseo è caratterizzato principalmente da quattro tipi di elementi cellulari: osteoclasti, osteoblasti, osteociti e cellule del rivestimento osseo [6][24].

Gli osteoclasti sono cellule differenziate multinucleate provenienti da cellule staminali ematopoietiche, sotto l'influenza di diversi fattori che promuovono l'attivazione dei fattori di trascrizione e dell'espressione genica. Contengono da uno a più di 50 nuclei ed hanno un diametro che va da 20 a più di 100  $\mu\text{m}$ . Il loro ruolo è di riassorbire l'osso, solubilizzando sia il minerale che la componente organica della matrice, smontando e

digerendo il composto di proteine e minerali idratati a livello molecolare, mediante la secrezione di acidi e di collagenasi. Queste cellule sono vitali per il processo di crescita ossea, per la ricostruzione dell'osso e per la sua capacità di ripararsi.

Gli osteoblasti si presentano come uno strato di cellule contigue, disposte sulla superficie dell'osso, che nel loro stato attivato sono cuboidali (dai 15 ai 30  $\mu\text{m}$  di spessore) e sono note per la loro funzione nella formazione dell'osso; queste cellule sintetizzano e secretano la matrice ossea non mineralizzata (l'osteoido) e regolano il flusso di calcio e fosfato dentro e fuori l'osso.

La sintesi della matrice ossea tramite osteoblasti avviene in due fasi: deposizione della matrice organica e la sua conseguente cristallizzazione.

Il ciclo vitale può essere sintetizzato come segue [14][54][89]:

- Nascita da una cellula progenitore;
- Differenziazione da cellule staminali in osteoblasti e partecipazione all'elaborazione della matrice e delle unità di calcificazione;
- Arrivati fin qui può tornare alla situazione pre-osteoblasto, trasformarsi in cellula di rivestimento osseo e giacere come osteocita, oppure morire.

Lo sviluppo degli osteoblasti e degli osteoclasti è collegato su basi molecolari. Entrambi derivano da cellule precursori originatesi nel midollo osseo (con gli osteoblasti da cellule staminali mesenchimali multipotenti, mentre gli osteoclasti da cellule ematopoietiche del lignaggio di monociti/macrofagi) e la differenziazione degli osteoblasti è un prerequisito per lo sviluppo degli osteoclasti.

Gli osteociti, che comprendono il 90-95% del numero totale di cellule ossee, sono le cellule più abbondanti e con la vita più lunga [26]. Gli osteociti maturi dispongono di un corpo cellulare che ha la forma di un ellissoide, con l'asse più lungo (25  $\mu\text{m}$ ) parallelo alla lamella ossea circostante.

Si ritengono capaci di rispondere ai cambiamenti nell'azione meccanica e di diffondere il flusso per la trasduzione delle informazioni alle cellule di superficie, attraverso i processi canalicolari e le giunzioni di divisione comunicanti. Gli osteociti infine svolgono un ruolo chiave nel processo di omeostatica, morfogenetica e ristrutturazione della massa ossea.

Le cellule di rivestimento sono ritenute essere gli osteoblasti piatti inattivi che ricoprono le superfici ossee, in cui non si verifica né riassorbimento osseo né formazione ossea. Le loro funzioni non sono completamente comprese, è stato dimostrato però che queste cellule consentono l'interazione diretta tra gli osteoclasti e la matrice ossea e partecipano alla differenziazione degli osteoclasti; sono inoltre responsabili del rilascio immediato di calcio nell'osso nel caso in cui il suo livello fosse troppo basso [15].



## Osso corticale e trabecolare

Il tessuto osseo può assumere in generale due configurazioni spaziali diverse: corticale (o compatto) e trabecolare (o spugnoso).

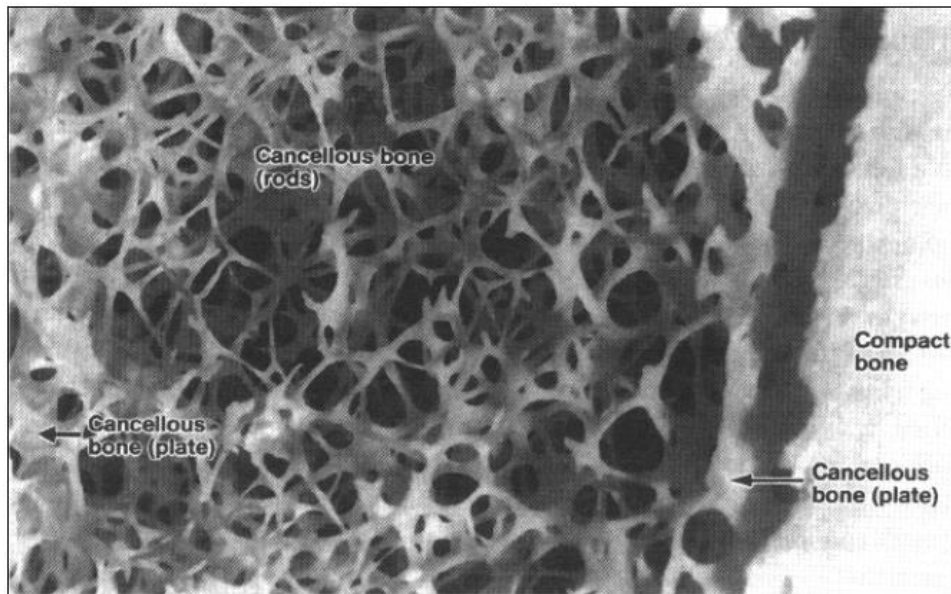


Figura 3: Fotografia di una sezione di una tibia mostrante osso trabecolare (spugnoso) e corticale (compatto).

L'osso corticale costituisce circa l'80% della massa scheletrica di un adulto e costituisce la parete esterna di tutte le ossa, conferendo rigidità, durezza e resistenza alle sollecitazioni meccaniche.

Si tratta di un osso duro, compatto, privo di cavità macroscopicamente evidenti; i piccoli canali presenti sono riservati ai vasi sanguigni.

Il restante 20% della massa scheletrica è costituita da osso trabecolare. Esso è caratterizzato microscopicamente da una struttura reticolare di piastre e asticelle aventi tipicamente uno spessore medio tra i 50  $\mu\text{m}$  e i 300  $\mu\text{m}$  che prendono il nome di trabecole, conferendo all'osso un aspetto spugnoso.

Le diafisi sono principalmente composte da osso corticale. Le epifisi e metafisi contengono invece osso trabecolare con un sottile rivestimento esterno di corticale. Durante la crescita, l'epifisi è separata dalla metafisi da uno strato di cartilagine di accrescimento (growth plate). Quest'ultima, insieme all'adiacente osso corticale delle metafisi, costituiscono una regione in cui si produce osso trabecolare e si sviluppa la corteccia. In un individuo adulto la cartilagine d'accrescimento è rimpiazzata dall'osso corticale che causa una fusione tra epifisi e metafisi.

## Osso corticale

L'unità strutturale dell'osso corticale è costituita da osteoni, organizzati in lamelle, dalla forma cilindrica di circa 200  $\mu\text{m}$  di diametro e costituiti da un canale centrale (canale Haversiano) circondato da circa 20-30 lamelle concentriche. All'interno di questo canale decorrono nervi e vasi, sia sanguigni che linfatici.

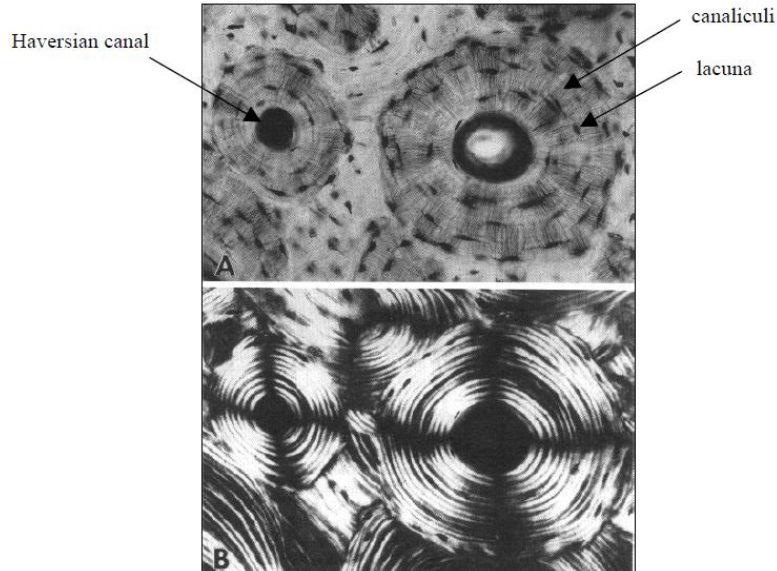


Figura 4: (A) Sezione istologica trasversale di osso corticale, mostrante osteone con i suoi canali Haversiani, lacune e canalicoli capillari. (B) Stessa sezione in luce polarizzata, che mostra gli osteoni composti da numerose lamelle concentriche.

I canali Haversiani sono interconnessi tramite canali trasversali e obliqui, anche detti canali di Volkmann, che permettono la comunicazione con il periostio e il midollo osseo.

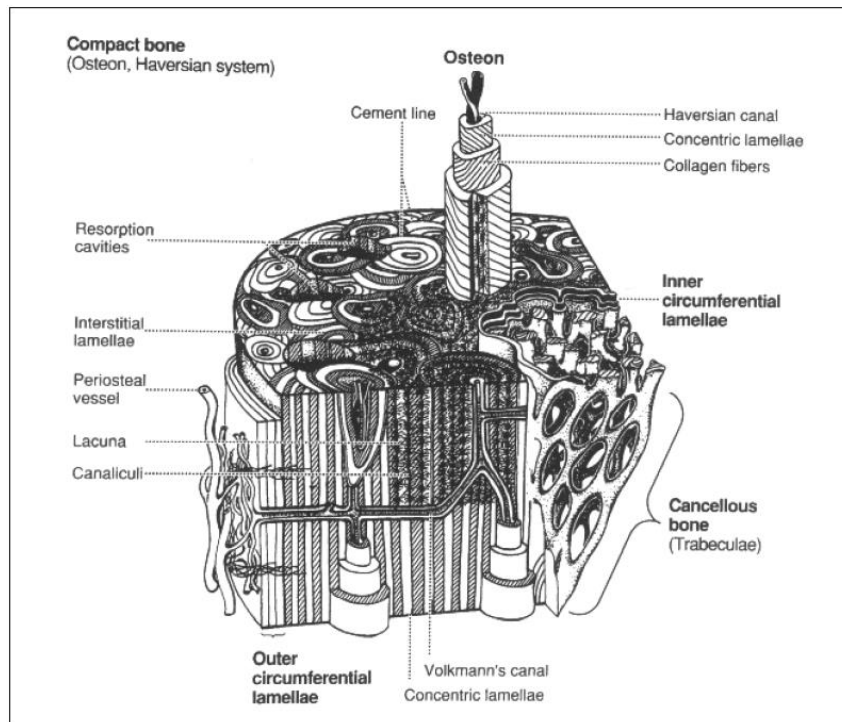


Figura 5: Schema di una porzione di osso lungo con dettagli di osso corticale.

## **Osso trabecolare**

L'osso trabecolare non ha sistemi haversiani ed è costituito da un insieme di fasci interconnessi, detti trabecole, aventi spessore massimo di 0.3 mm e dalla configurazione variabile. Ogni trabecola è formata da un pacchetto di lamelle parallele di dimensioni dell'ordine di 1 mm in lunghezza e 50-60  $\mu\text{m}$  in sezione.

## **Ricambio e sviluppo del tessuto osseo**

In condizioni normali, l'osso è caratterizzato da una coesistenza equilibrata tra processo riassorbitivo e apposizionale.

### **Riassorbimento osseo**

Il meccanismo effettivo per l'attivazione del riassorbimento dell'osteoclasto osseo è ancora poco chiaro. Dove gli osteoclasti entrano in contatto con la superficie dell'osso, questi iniziano a erodere le ossa formando cavità (lacune di Howship) nell'osso spugnoso e formando coni di taglio o cavità di riassorbimento nell'osso corticale. Il processo di riassorbimento avviene in due fasi, che si verificano sostanzialmente simultaneamente: dissoluzione del minerale e digestione enzimatica delle macromolecole organiche.

### **Formazione ossea**

La formazione dell'osso avviene in due fasi: sintesi della matrice seguita da mineralizzazione extracellulare. Dopo la deposizione di sostanze cementizie, gli osteoblasti iniziano a depositare uno strato di matrice ossea, denominato strato osteoideo. Dopo circa 5-10 giorni, lo strato osteoideo raggiunge un livello di mineralizzazione pari a circa il 70%. La mineralizzazione completa dura dai 3 ai 6 mesi sia nell'osso corticale che trabecolare. La formazione dell'osso è un processo complesso regolato da ormoni (ad esempio gli ormoni paratiroidei) e fattori di crescita (ad esempio, Transforming Growth Factor- $\beta$ ).

La costruzione dell'osso come organo funzionale è un processo importante, in quanto l'osso aumenta costantemente, si rinnova e si sviluppa nel tempo. Contemporaneamente si adatta per sostenere la protezione, le necessità meccaniche e le numerose attività metaboliche ed ematopoietiche [27][36][91]. La formazione di un osso funzionalmente competente è il risultato di una combinazione di diversi processi:

- Ossificazione intramembranea;
- Ossificazione endocondrale;
- Crescita;
- Modellizzazione in una forma desiderata;
- Sostituzione costante del "vecchio" con l'osso "nuovo".

## **Ossificazione**

L'ossificazione intramembranea (formazione di ossa di membrana) forma la maggior parte delle future strutture ossee corticali. Questo dà origine a molte delle ossa dello scheletro facciale, della volta del cranio, degli organi di senso e delle parti della mandibola e della clavicola.

L'ossificazione endocondrale (formazione di ossa cartilaginee) forma la maggior parte delle future ossa spugnose, dando origine alla maggior parte delle ossa alla base del cranio, della colonna vertebrale, del bacino e delle estremità. Le cellule di cartilagine (condrociti) proliferano e depositano la matrice finché non viene costruito un modello di cartilagine del futuro osso. Le cellule della cartilagine maturano, crescono e sono seguite dalla calcificazione della matrice. Gli osteoblasti pongono il tessuto osseo sul substrato di nuclei di cartilagine calcificati non riassorbiti, formando la spongiosa primaria. Questo sarà poi sostituito da un pacchetto trabecolare lamellare che costruisce la spongiosa secondaria, cioè la futura spongiosa adulta.

## **Modellazione**

In generale, la crescita e la modellazione sono collegati tra loro [14]. La modellazione consente di sviluppare una normale architettura durante la crescita, controllando la forma, la dimensione, la robustezza e l'anatomia delle ossa e delle articolazioni. Accresce la corteccia esterna e i diametri delle cavità del midollo osseo, dà forma alle estremità delle ossa lunghe, compatta trabecole e cortecce, allarga la volta cranica e modifica la curvatura cranica. Durante la normale crescita, l'osso periostale viene aggiunto più rapidamente tramite deriva di formazione rispetto alla rimozione dell'osso endosteale mediante deriva di riassorbimento. Questo processo è regolato in modo che l'albero cilindrico si espanda notevolmente in diametro, mentre lo spessore della parete e della cavità del midollo aumentano lentamente.

La modellazione controlla anche la modulazione dell'architettura ossea e della massa quando la condizione meccanica cambia [17]. Ad esempio, le superfici ossee possono essere spostate per rispondere ad esigenze meccaniche. L'azione coordinata del riassorbimento e formazione ossea di un lato delle superfici periosteali e endosteali può spostare l'intero albero a destra o a sinistra, lasciando che alcune ossa crescano eccentricamente [16].

## **Rimodellamento**

Il rimodellamento può essere definito come un processo che produce e mantiene l'osso che è biomeccanicamente e metabolicamente competente [14]. Nell'infanzia, l'osso immaturo delle metafisi è strutturalmente inferiore all'osso maturo. Nell'osso adulto la qualità (come le proprietà meccaniche) dell'osso peggiora nel tempo. Quindi, come molti altri tessuti, l'osso deve sostituirsi o rinnovarsi. Questa sostituzione dell'osso immaturo e vecchio si verifica con un processo chiamato rimodellamento, che è una sequenza di riassorbimento seguito dalla formazione di nuove ossa lamellari [17]. Il

rimodellamento caratterizza tutta la vita delle ossa. Per i tassi normali di sostituzione ossea periodica (turnover ossea), l'osso spugnoso ha un'età media che va da 1 a 4 anni, mentre per l'osso corticale è di circa 20 anni.

Il rimodellamento ha sia effetti positivi quanto negativi sulla qualità dell'osso a livello dei tessuti. Permette di rimuovere i micro-danneggiamenti, sostituire l'osso morto e ipermineralizzato, adattare la microarchitettura alle sollecitazioni locali. Ma il rimodellamento può anche perforare o rimuovere le trabecole, aumentare la porosità ossea corticale, diminuire la larghezza corticale e eventualmente ridurre la resistenza ossea.

Il gruppo di cellule ossee che esegue il ricambio osseo è chiamato gruppo di rimodellamento osseo (dall'inglese bone remodelling unit - BMU). Il ciclo di vita di un'unità può essere sintetizzato nelle seguenti fasi: riposo, attivazione, riassorbimento, inversione (coupling), formazione, mineralizzazione e ritorno al riposo.

- **Riposo:**

Circa l'80% delle superfici ossee corticali (periosteali e endosteali) e circa il 95% delle superfici ossee intracorticali nei grandi animali adulti (compresi gli esseri umani), sono inattive rispetto allo stadio di rimodellamento osseo, in qualsiasi momento. Queste superfici inattive sono coperte da cellule di rivestimento osseo e da una sottile membrana endosteale.

- **Attivazione:**

L'attivazione è definita come la conversione della superficie ossea quiescente nell'attività di riassorbimento. Quale fattore inizia questo processo non è noto. Tuttavia, si ritiene che l'attivazione avviene in parte in risposta a stimoli strutturali o biomeccanici locali. Il ciclo di rimodellamento richiede l'assunzione di osteoclasti e il mezzo per accedere alla superficie ossea.

- **Riassorbimento:**

Gli osteoclasti iniziano a erodere l'osso, formando cavità.

- **Inversione:**

L'intervallo da 1 a 2 settimane tra il completamento del riassorbimento e l'inizio della formazione dell'osso è chiamato inversione.

- **Formazione e mineralizzazione:**

La formazione delle ossa avviene attraverso la sintesi della matrice, seguita dalla mineralizzazione extracellulare.

Il ricambio delle ossa dipende sia dalla frequenza di attivazione limitata dalla superficie sia dal rapporto tra superficie e volume. La frequenza di attivazione è l'inverso dell'intervallo di tempo tra i cicli consecutivi di rimodellamento nello stesso sito. Il rapporto tra superficie e volume dell'osso spugnoso è di circa 5-10 volte maggiore rispetto all'osso corticale.

Ci sono studi che dimostrano che il rimodellamento differisce in diverse parti dello scheletro e anche in diverse parti di un determinato osso in qualsiasi momento. Possibili ragioni sono che, in caso di micro-danni, il rimodellamento basato sulla BMU aumenta per cercare di ripararlo. Di solito, tali regioni sono siti molto ricchi, come la spongiosa

epifisaria [9][14]. Un altro motivo potrebbe essere che durante la crescita le parti dello scheletro accumulano più ossa di quanto non sia necessario per l'uso meccanico, questo aumenterà la perdita ossea dipendente dal rimodellamento [30][14]. Nell'osso adulto, il rimodellamento osseo fornisce un meccanismo allo scheletro utile all'adattarsi alle sue condizioni meccaniche, dovute all'inattività o ad una forte attività. Questi fenomeni sono definiti rimodellamento biomeccanico. Al contrario, è sostenuto che esista un rimodellamento geneticamente guidato o un rimodellamento stocastico che impedisce danni da sforzo. Questa ipotesi è molto discussa [9][30][14].

### **L'ipotesi del meccanostato**

L'ipotesi del meccanostato è stata introdotta da Frost [28][29] per spiegare come l'uso meccanico regola la massa e l'architettura ossea. Si basa sull'idea che esiste una sollecitazione efficace che induce una reazione per cambiare la massa e la robustezza ossea. Il meccanismo si comporterebbe come un termostato in una casa. In questo concetto, a seconda dell'uso meccanico dell'osso, i segnali vengono trasmessi al sistema di modellazione e rimodellamento, che altera attivamente la massa e la forma ossea.

## **Osteoporosi**

L'osteoporosi, letteralmente "ossa porose", è una malattia comune nei Paesi sviluppati e probabilmente lo diventerà anche nei Paesi in via di sviluppo, dove la longevità sta rapidamente aumentando [31][90].

L'osteoporosi è spesso definita malattia "silente", poiché non ha sintomi discernibili finché non si presenta una frattura, anche per questo, fino a poco tempo fa, non era classificata come malattia: in precedenza veniva considerata come una conseguenza inevitabile dell'invecchiamento. Ora l'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce l'osteoporosi come una malattia sistemica progressiva, caratterizzata da bassa densità ossea e deterioramento della microarchitettura del tessuto osseo, con conseguente aumento della fragilità ossea e della suscettibilità alla frattura. Una delle cause della diffusione della patologia osteoporosi deriva dall'incremento della vita media che ha caratterizzato gli ultimi decenni. Operativamente, l'osteoporosi viene valutata sulla base delle misurazioni della densità minerale ossea (BMD) [10]. Seguendo i suggerimenti dell'OMS, l'osteoporosi è definita nelle donne caucasiche per una densità minerale ossea (chiamata anche T-score) che risiede in 2,5 deviazioni standard o più, al di sotto della media per la giovane popolazione femminile sana [90]. Lo stesso valore BMD assoluto può essere utilizzato provvisoriamente per gli uomini, in seguito ad aggiustamento per corpi di grandi dimensioni. I valori BMD con T-score tra -1 e -2,5 sono classificati come osteopeni. I soggetti osteopenici non hanno un rischio di frattura maggiore rispetto ai normali, ma sono a rischio di sviluppare l'osteoporosi in futuro. L'incidenza di osteoporosi è molto più elevata nelle donne rispetto agli uomini; per

donne in post menopausa il rischio è circa tre volte rispetto agli uomini anziani, indipendentemente dall'età. L'incidenza della frattura dell'anca, ad esempio, ha un aumento esponenziale con l'età; le donne caucasiche di 80 anni hanno un rischio annuale di frattura dell'anca di circa il 3%.

I siti scheletrici più strettamente associati a fratture da osteoporosi sono l'anca (fratture del collo del femore), il polso e la vertebra [31]. Importanti fattori di rischio clinico per le fratture dell'anca nelle donne caucasiche includono il basso peso corporeo, la storia della frattura, il fumo, l'uso di steroidi glucocorticoidi, l'inattività fisica. Il principale fattore di rischio, tuttavia, è l'età (con un'età media di 80 anni per le donne con frattura dell'anca), con implicazioni di carenza di vitamina D. Le fratture vertebrali, che sono anche fortemente correlate all'età (età media 65 anni), sono ancor più correlate ai cambiamenti post menopausali nel metabolismo osseo. Tra i pazienti con fratture vertebrali, il rischio futuro di sviluppare fratture osteoporotiche è notevolmente aumentato. Le fratture del polso e di altri siti presentano incidenze che seguono un modello diverso, che aumenta di circa un fattore 10 nei quindici anni successivi alla menopausa, ma rimane ancora abbastanza costante.

## **Deterioramento della massa ossea correlata all'età**

Durante il corso della vita umana, la massa ossea aumenta durante la crescita, raggiunge un plateau in giovane età adulta e dopo i 30 anni inizia a diminuire. Intorno ai 70 anni, circa il 30% della giovane massa adulta può essere persa [88].

In generale, con l'avanzare dell'età, la perdita ossea avviene in tutte le parti dello scheletro, ma in quantità diverse. Sia l'osso corticale che quello trabecolare sono sottoposti alla perdita ossea, con rimozione che avviene prima nelle superfici endosteali adiacenti il midollo. Nell'osso corticale si può osservare il distacco della corteccia accompagnata da un allargamento dei canali Haversiani. Nell'osso spugnoso, a causa dello squilibrio dell'eccesso di riassorbimento relativo alla formazione nel rimodellamento osseo, si arriva alla perforazione o alla perdita di trabecole. Così la superficie disponibile per la formazione dell'osso viene persa, con un effetto netto di perdita di massa e architettura ossea. Ciò ha come conseguenza la perdita di robustezza e connettività trabecolare [71][20].

La perdita della massa e dell'architettura ossea, insieme ai cambiamenti nel contenuto di collagene, nella dimensione e nella conformazione dei cristalli di apatite di calcio, la rottura delle cellule ossee che coinvolgono attività osteoclastiche e osteoblastiche, portano ad un generale deterioramento della qualità dell'osso con l'età [14].

## Progeria

La progeria o sindrome di Hutchinson-Gilford (HGFS) è una condizione genetica caratterizzata da un rapido invecchiamento che ha inizio durante l'infanzia. I bambini affetti da questa malattia, alla nascita e durante la prima infanzia, appaiono normali, ma ben presto, circa entro massimo i due anni, ci si rende conto della loro crescita rallentata rispetto al tasso atteso. Essi sviluppano un aspetto caratteristico del viso, con occhi prominenti, naso e labbra sottili, il mento piccolo e le orecchie sporgenti [93].

La sindrome provoca inoltre perdita di capelli (alopecia), invecchiamento della pelle, anomalie articolari e perdita di grasso sottocutaneo; questa condizione non pregiudica lo sviluppo intellettuale o quello motorio, come il sedersi o il camminare.

Le persone affette da progeria presentano un grave indurimento delle arterie (arteriosclerosi) che inizia sin dall'infanzia; questo stato di salute aumenta considerevolmente la probabilità di avere un infarto o un ictus in giovane età, ovviamente queste gravi complicanze possono peggiorare nel tempo.

L'età media di sopravvivenza è di circa 13.5 anni, con aspettativa di vita tra gli 8 e i 21 anni.

La frequenza di insorgenza di tale condizione è molto bassa; solo 1 su 4 milioni di neonati in tutto il mondo ne è affetto con incidenza uniforme; non ci sono infatti predisposizioni di sesso, geografiche o etniche. Più di 130 casi sono stati riportati in letteratura da quando fu descritta per la prima volta nel 1886 da Jonathan Hutchinson e nel 1897 da Hastings Gilford [81]. La causa di tale sindrome è da ricercarsi nei cambiamenti genetici.

I due danni molecolari noti che inducono progeria sono il gene LMNA mutato [93] e/o il processo post-traslazionale anomalo (mutazioni nel gene ZMPSTE24) [1]. Il gene LMNA fornisce istruzioni per la fabbricazione di proteine chiamate Lamin A/C, queste ultime giocano un ruolo fondamentale nel determinare la forma del nucleo cellulare e sono componenti essenziali di sostegno per la membrana nucleare [25].

Le mutazioni che causano la sindrome di Hutchinson-Gilford comportano la produzione di una versione anomala della proteina in questione, la quale rende l'involucro nucleare instabile con conseguente danneggiamento progressivo del nucleo stesso, questo implica un invecchiamento precoce oltre che una morte cellulare prematura.

La progeria è considerata una condizione dominante autosomica, ciò significa che una copia del gene alterato in ogni cellula è sufficiente a provocare il disordine. Infine, si verifica in persone senza storia del disturbo nella loro famiglia.

Al fine di sviluppare una migliore comprensione della patogenesi e della progressione della sindrome oltre che per progredire in potenziali terapie, gli scienziati a livello globale hanno sviluppato modelli animali con stessa patologia, un esempio sono i topi omozigoti che trasportano mutazione autosomica recessiva del gene LMNA oppure i



topi *Zmpste24*<sup>-/-</sup> che appaiono normali alla nascita ma presto sviluppano sintomi progeroidi [19][38].

Attualmente non ci sono trattamenti disponibili per bambini con la sindrome HGPS. Alcuni pazienti con HGPS sono stati trattati con ormoni della crescita, i quali hanno portato ad un aumento del peso corporeo e di altezza, ma questo trattamento aiuta solo parti del fenotipo e non è considerato una cura. Recentemente è stata avviata una sperimentazione clinica con inibitori della farnesiltransferasi (FTI) su bambini con HGPS. FTI, precedentemente usati per la terapia anticancro, bloccano il processo di farnesilazione e quindi inibiscono la formazione della progerina. Il trattamento di cellule affette da HGPS con FTI ha portato ad un miglioramento nella morfologia cellulare e ad una redistribuzione della progerina dall'involucro nucleare al nucleoplasma o ai foci intranucleari.

Inoltre, modelli murini per HGPS e laminopatie, *Zmpste24* - / - e *Lmna*HG / +, sono stati trattati con FTI. Entrambi i modelli hanno mostrato un fenotipo più mite, con un maggiore peso corporeo, meno fratture costali e un aumento nel tasso di sopravvivenza rispetto agli animali non trattati dello stesso genotipo, ma dato che il trattamento è stato effettuato prima dell'inizio di una malattia pronunciata, è difficile giudicare se il trattamento sarebbe altrettanto efficace su uno sviluppo fenotipico completo. Strategie di trattamento aggiuntive, tra cui l'interferenza dell'RNA e targeting dell'oligonucleotide modificato, hanno dimostrato di avere effetti benefici sulle cellule HGPS in vitro [43][79].

## **Modelli murini per la ricerca**

A partire dagli anni 70' i modelli animali vengono sempre più usati per indagare la fisiopatologia dell'osteoporosi, in particolare, il topo da laboratorio (*Mus musculus*) è l'animale più utilizzato per studiare in generale la fisiologia umana e le malattie a livello cellulare, molecolare e genetico a causa del suo breve periodo di gestazione di tre settimane, l'alta capacità riproduttiva (~ 5-6 animali / lettiera), la somiglianza con la fisiologia umana e la facilità di manipolazione genetica.

A differenza dello scheletro umano, tuttavia, quello murino continua a crescere dopo la pubertà, che è indice di maturità sessuale, e manca di rimodellamento osteonale dell'osso corticale. Come per gli esseri umani invece, i topi presentano diminuzione di osso trabecolare, assottigliamento dell'osso corticale e aumento della porosità corticale con l'avanzare dell'età.

I modelli murini di progeria mostrano inoltre perdita di tessuto osseo e difetti scheletrici associati alla senescenza degli osteoblasti precoci come vale ugualmente per i modelli murini dell'aterosclerosi, suggerendo così l'idea che le malattie comuni dell'invecchiamento condividano gli stessi percorsi fisiopatologici.

Per distinguere risultati clinicamente rilevanti da risultati specifici del modello è necessario valutare a pieno le differenze nella fisiologia degli scheletri umani e murini.

Ad oggi, le prove ottenute indicano che le caratteristiche e le tempistiche della perdita di tessuto osseo correlata all'età nei topi sono molto simili a quelle degli esseri umani.

Parameter	Humans	Mice
Longitudinal bone growth	Ceases at sexual maturity	Slow growth after sexual maturity
Cancellous bone turnover	~0.1% per day (iliac crest)	~0.7% per day (distal femur)
Life span of bone multicellular unit	6–9 mo	~2 wk
Osteonal bone remodeling	Present	Absent
Age-related cancellous bone loss	Begins between 20 and 30 y of age	Begins at ~3 mo of age
Pathophysiology of cancellous bone loss	Decline in wall width, indicating inadequate osteoblasts	Decline in wall width, indicating inadequate osteoblasts
Age-related cortical bone loss	Increased porosity leading to trabecularization and cortical thinning	Increased porosity, cortical thinning
Pathophysiology of cortical bone loss	Enlargement and coalescence of osteonal canals	Development of intracortical remodeling associated with blood vessels

*Tabella 1: Confronto nella fisiologia scheletrica tra essere umano e modello murino [45].*

# CAPITOLO 2

## Tecniche di imaging per la caratterizzazione della struttura ossea

### **Principali tecniche di imaging applicate al tessuto osseo**

La perdita della massa ossea è caratterizzata da un decremento della densità ossea e da una alterazione della struttura trabecolare dell'osso. L'osteoporosi è una malattia demineralizzante sistemica caratterizzata da un ridotto volume di tessuto osseo, la cui composizione minerale rimane nella norma. In generale, le anomalie osteoporotiche comprendono l'assottigliamento corticale, una maggiore porosità dei canali Haversiani, nonché alterazioni dell'osso spugnoso con riduzione nel numero e nelle dimensioni delle trabecole.

La presenza di uno o più fattori di rischio non è sufficiente a stabilire se un individuo ha un apparato scheletrico ipomineralizzato e più fragile della norma; un parametro che ci permette di definire il grado di mineralizzazione dell'apparato scheletrico è il contenuto minerale di tutto lo scheletro o di alcuni distretti particolarmente esposti alla perdita.

Le raccomandazioni dell'OMS per la valutazione del rischio di frattura osteoporotica sono basate su misure densitometriche [90]. Negli ultimi 25 anni si è assistito allo sviluppo di diverse tecniche densitometriche per la misurazione non invasiva della massa ossea. L'indagine strumentale adeguata a una diagnosi precoce di osteoporosi sulla base di misure densitometriche, è la Densitometria Ossea, conosciuta anche come MOC (Mineralometria Ossea Computerizzata) o l'assorbimento di raggi X a doppia energia (dall'inglese Dual Energy X-ray Absorptiometry - DEXA). È basato su immagini di proiezione a raggi X che forniscono il contenuto minerale (BMC, Bone Mineral Content) o la densità minerale (BMD, Bone Mineral Density) del tessuto osseo esaminato.

Questa tecnica si basa sul principio di attenuazione differenziale di un fascio di raggi X, a due livelli energetici, nel passaggio attraverso il distretto scheletrico da esaminare. La misura di attenuazione tuttavia, non consente la determinazione del volume nel quale l'osso minerale è distribuito, quindi non è in grado di distinguere tra osso corticale e spugnoso o anche eventuali formazioni calciche delle parti molli. Inoltre, sebbene la DEXA possa prevedere il rischio di frattura, non si è in grado di identificare gli individui che potranno realmente incorrere in fratture [56][57][32].

Un ulteriore metodo per indagare il possibile rischio di frattura si basa sui *finite elements models*, FEM, una simulazione computerizzata di sforzi e stress indotti dal carico meccanico su un oggetto, descritto come un insieme collegato di elementi dalla forma semplice a cui sono attribuite proprietà elastiche.

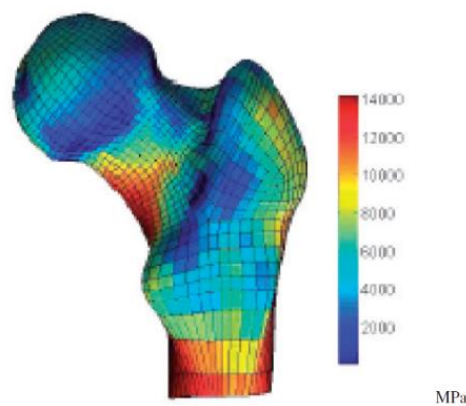


Figura 6: Esempio di distribuzione del modulo di Young (MPa) computato a partire dal BMD nei singoli elementi della rete.

Le tecniche proiettive come la DEXA si basano tutte sulla rappresentazione bidimensionale della struttura ossea esaminata.

Altre tecniche di imaging non distruttive, come la tomografia a raggi X (CT) e la risonanza magnetica (MRI), permettono di esaminare la struttura tridimensionale dell'osso. L'apparecchiatura standard, tuttavia, ha fattori limitanti per la visualizzazione delle caratteristiche microscopiche dell'osso, in particolare per l'imaging in vivo. Queste limitazioni sono in primo luogo date dalla risoluzione spaziale e, nel caso della CT, anche dall'esposizione del paziente alla radiazione a raggi X.

Se per la visualizzazione della superficie di un osso di grandi dimensioni è di solito sufficiente una risoluzione di 1 mm, le caratteristiche dell'osso spugnoso, come la separazione trabecolare, richiedono almeno 100  $\mu\text{m}$  di risoluzione, mentre altre caratteristiche, come il numero trabecolare o lo spessore, possono richiedere risoluzioni ancora più alte [61]. Sono stati sviluppati speciali sistemi, come la micro-CT e la micro-MRI, che consentono di esaminare strutture e dettagli molto piccoli in tre dimensioni e sono adatti per l'imaging della struttura trabecolare.

Nella tabella sono riassunte le risoluzioni nominali tipiche di alcune procedure di imaging 3D.

CT (in-vivo)	500 x 500 x 1000 $\mu\text{m}$
3D-pQCT (in-vivo)	165 x 165 x 165 $\mu\text{m}$
Micro-CT (in-vitro)	14 x 14 x 14 $\mu\text{m}$
Micro-CT (in-vivo)	28 x 28 x 28 $\mu\text{m}$
Synchrotron-CT (in-vivo)	8 x 8 x 8 $\mu\text{m}$
Synchrotron-CT (in-vitro)	2 x 2 x 2 $\mu\text{m}$
MRI (in-vivo)	150 x 150 x 700 $\mu\text{m}$
Micro-MRI (in-vitro)	40 x 40 x 40 $\mu\text{m}$

*Tabella 2: Risoluzioni nominali tipiche di alcune procedure di imaging 3D.*

## Tomografia Computerizzata

La Tomografia Computerizzata (dal greco tomos = taglio/sezione, TC in italiano e CT dall'inglese Computed Tomography), nota anche come Tomografia Assiale Computerizzata (TAC), è una tecnica radiologica che sfrutta l'interazione dei raggi X con la materia al fine di ottenere immagini dettagliate di organi interni, ossa, tessuti leggeri e vasi sanguigni o in generale informazioni riguardanti la composizione interna del campione da investigare.

Si ricordi che l'immagine radiografica è una proiezione bidimensionale di un oggetto tridimensionale e non permette di dare interpretazioni di profondità sulla struttura dell'oggetto, in quanto più sezioni dell'oggetto concorrono a formare un'unica immagine, quindi per poter ottenere informazioni sulla tridimensionalità dell'oggetto indagato è necessario radiografarlo da più angoli.

La CT dunque permette, mediante algoritmi matematici, di ottenere la ricostruzione di sezioni trasversali dell'oggetto investigato, comunemente dette slice, combinando le informazioni provenienti da diversi angoli di rotazione del sistema sorgente-rivelatore rispetto all'oggetto.

Nel corso degli anni c'è stata un'evoluzione dei sistemi tomografici, partendo dal primo modello che fu costruito tra il 1967 e il 1971 dall'ingegnere inglese G. Hounsfield, presso i Laboratori di ricerca della Thorn EMI. Per questo lavoro Hounsfield vinse il Premio Nobel per la Medicina nel 1979, assieme al fisico sudafricano A. Cormack, che giunse a risultati simili in maniera indipendente.

Nell'ottobre del 1971 presso l'Atkinson Morley's Hospital (Wimbledon, Londra) fu realizzata la prima immagine TAC di un paziente e fornì una prova incredibile di efficienza del metodo riuscendo a localizzare un tumore cerebrale nel lobo frontale; da allora sono stati notevolmente ridotti sia i tempi di acquisizione che i tempi di ricostruzione delle immagini.



*Figura 7: Il primo tomografo (EMI Mark 1) impiegato in medicina, di lato l'ingegnere G. Hounsfield.*



*Figura 8: La prima immagine TAC di un paziente.*

L'apparecchio di CT, nella sua realizzazione più semplice, come sono i sistemi così detti di "I generazione", è costituito da una sorgente radiogena e da un rivelatore, allineati e contrapposti. Il complesso tubo-rivelatore effettua una scansione lineare sul piano tomografico lungo tutta la sezione trasversale del campione (o del paziente) in esame, seguita da una rotazione del sistema di misura di un grado alla quale succede una nuova scansione lineare; questo procedimento viene ripetuto finché non è stata completata una rotazione di almeno  $180^\circ$ , con tempi di acquisizione di 5-6 minuti per strato.

Durante il procedimento di scansione il segnale di misura, ottenuto da un fascio finemente collimato (pencil-beam), viene campionato, digitalizzato e trasmesso ad un computer, che, mediante un software di ricostruzione, calcola la distribuzione bidimensionale dei valori di assorbimento dello strato in esame, con successiva

rappresentazione dell'immagine della sezione sul monitor, con valori espressi in scala di grigi.

Sebbene i risultati clinici provenienti da scanner di I generazione fossero promettenti, rimaneva il problema grave della qualità delle immagini associato al movimento del paziente durante l'acquisizione dati. Per ridurre il tempo di acquisizione dati, si sviluppò un nuovo sistema in cui i raggi X sono emessi su un fascio piano a ventaglio (fan-beam) e al posto di un singolo rivelatore si contrappongono al tubo prima due rivelatori, mantenendo il movimento di traslazione/rotazione del complesso tubo-rivelatori (apparecchi di "II generazione") e con acquisizione di due strati per volta, e successivamente da 8 a 30 rivelatori disposti su di un arco di cerchio o lungo un array lineare.

Uno dei tipi di scanner più popolare è lo scanner CT di "III generazione". In questa configurazione, molte celle di rivelatori sono posizionate su un arco concentrico opposto alla sorgente a raggi X. Le dimensioni dell'array di rivelatori sono sufficientemente grandi affinché l'intero oggetto sia entro il campo visivo dei rivelatori per ogni angolo di acquisizione. Questi scanner hanno consentito di abolire il movimento di traslazione e di avere, con il solo movimento di rotazione del complesso tubo-rivelatori, tempi di scansione che nell'arco di un decennio sono scesi da 4-5 secondi a meno di un secondo.

Negli apparecchi di "IV generazione" i rivelatori sono disposti lungo tutto un cerchio di 360° e il solo tubo radiogeno ruota attorno al campione.

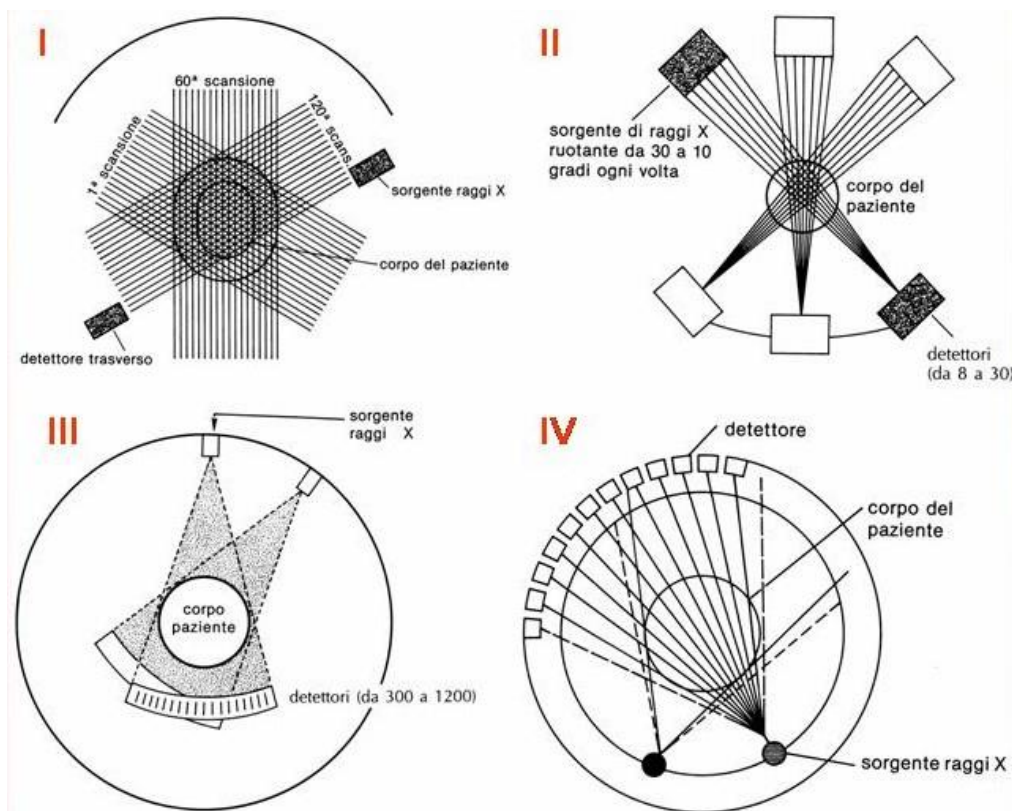


Figura 9: Rappresentazione schematica di funzionamento di tomografi di I, II, III e IV generazione.

Un'ulteriore evoluzione è data dall'utilizzo di più rivelatori impacchettati insieme invece di un singolo array di rivelatori, in tal caso si parla della cosiddetta tomografia MultiSlice CT (MSCT). Con questa tecnica è possibile acquisire più slice contemporaneamente. Il numero di strati può variare da 2 fino a più di un centinaio. La MSCT permette quindi acquisizioni più veloci rispetto agli scanner precedenti.

Nel caso di una roto-traslazione contemporanea del campione si ha la cosiddetta "CT spirale". In questo tipo di scansione si può utilizzare un singolo array di rivelatori oppure un rivelatore multistrato (MSCT spirale).

Altri sistemi utilizzano invece un rivelatore planare: l'immagine viene prodotta da un ampio fascio a cono (cone beam), su di un rivelatore bidimensionale il quale può essere un flat panel o uno schermo scintillante letto da un sensore digitale. Con questo tipo di sistema, una radiografia digitale dell'intero oggetto viene prodotta con un'unica emissione di radiazioni; ciò permette tempi di acquisizione brevi e una riduzione importante della dose. Questa tecnica va sotto il nome di "Cone Beam CT" (CBCT).

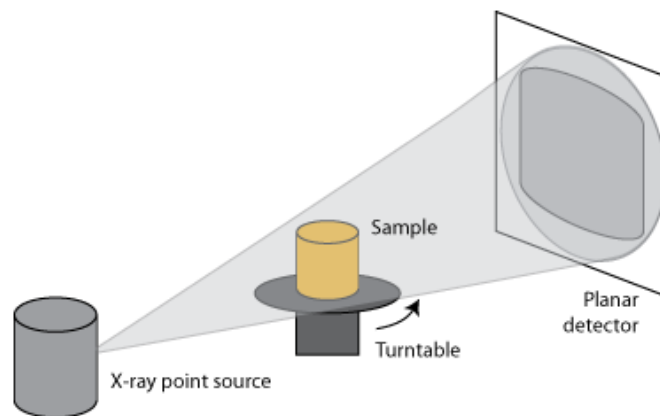


Figura 10: Configurazione della tecnica Cone Beam.

Lo scanner a fascio elettronico, alcune volte chiamato scanner di "V generazione", usato nella tomografia computerizzata a fascio elettronico (EBCT), o tomografia a fascio elettronico (EBT), fu realizzato tra il 1980 e il 1984 per applicazioni cardiache. Per "congelare" il moto cardiaco, un set completo di proiezioni deve essere raccolto entro 20-50 ms. Questo è chiaramente molto difficile per scanner di III o IV generazione a causa dell'enorme forza centripeta immessa sul tubo a raggi X e il rivelatore. Nello scanner a fascio elettronico, la rotazione della sorgente è fornita dal movimento del fascio elettronico (invece del movimento meccanico del tubo a raggi X).



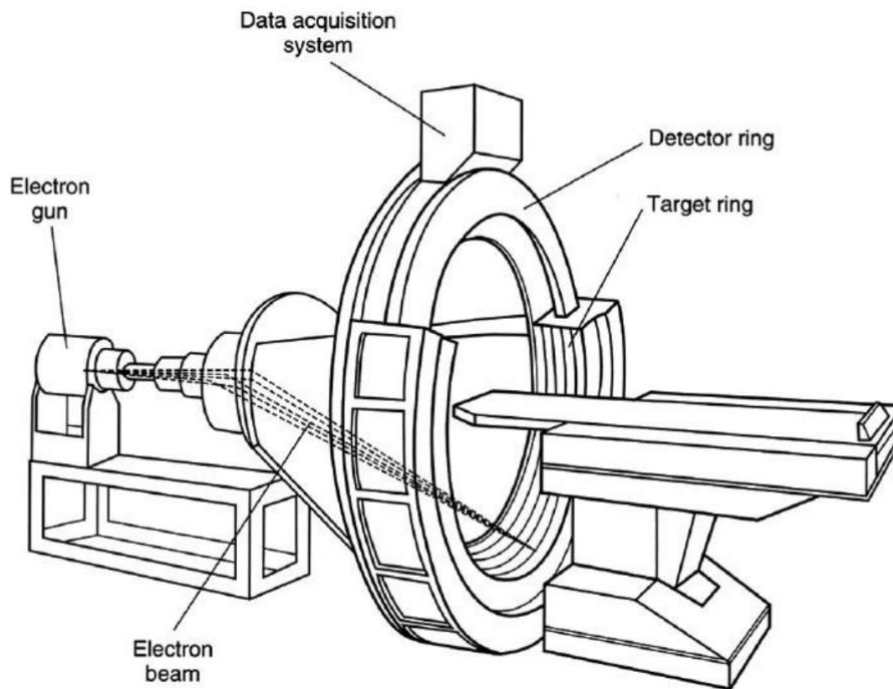


Figura 11: Rappresentazione schematica di un tomografo di "V generazione" o scanner a fascio elettronico.

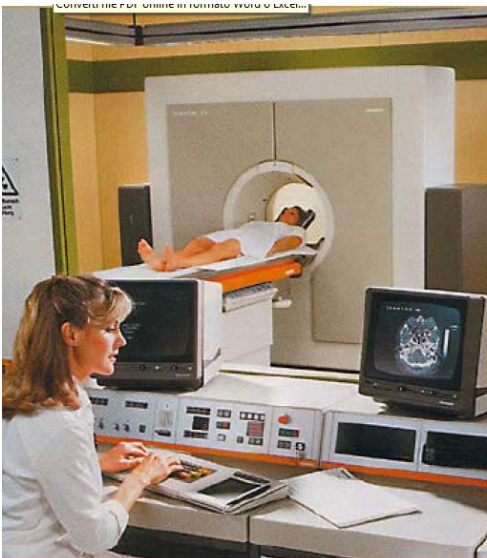


Figura 12: A sinistra un esempio di sistema CT clinico e a destra un'immagine di sezione trasversale dell'anca.

## CT Quantitativa (QCT) e CT Quantitativa Periferica (pQCT)

La tomografia computerizzata quantitativa è una tecnica medica non invasiva che misura la reale densità minerale del tessuto osseo (BMD) usando una CT con calibrazione standard capace di convertire unità Hounsfield (HU) di una immagine CT in valori di BMD.

La QCT è usata principalmente per valutare la densità minerale della colonna vertebrale lombare e dell'anca oltre che per la diagnosi e il monitoraggio dell'osteoporosi.

Inoltre, un ruolo importante è ricoperto dalla tomografia computerizzata quantitativa periferica pQCT che, come lo stesso nome dice, implica l'indagine su zone periferiche del corpo quali radio e tibia [60][59]. A differenza delle altre metodologie densitometriche planari, la pQCT fornisce una misura tridimensionale volumetrica e permette la valutazione di altri parametri di tipo biomeccanici relativi all'architettura del tessuto osseo. Infatti, con la pQCT è possibile valutare *in vivo* la superficie della componente spugnosa, il numero delle trabecole per singola sezione, il numero di "nodi" (incroci tra le trabecole) ed "end-point" (inizio e fine delle trabecole) e la resistenza del tessuto osseo alla torsione [53].

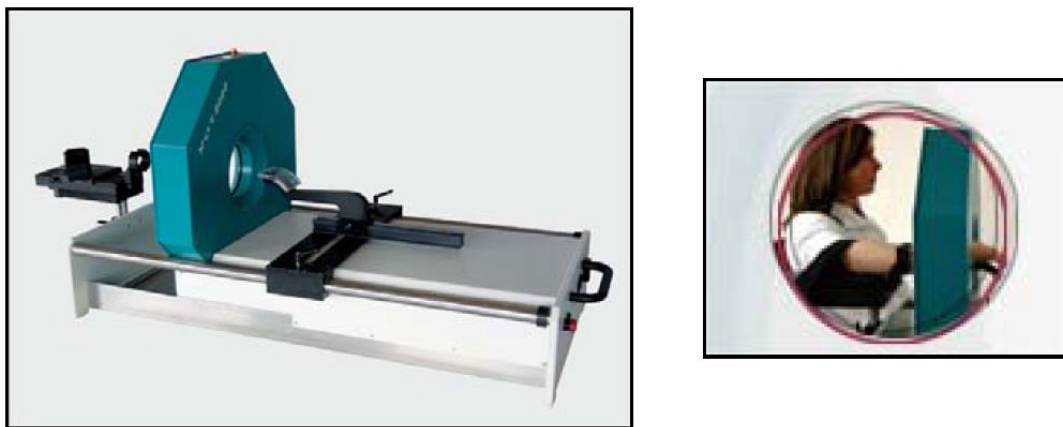


Figura 13: A sinistra un esempio di sistema pQCT e a destra un paziente sottoposto ad esame dell'avambraccio.

## Micro-CT

Il primo sistema microtomografico a raggi X è stato idealizzato e costruito da Jim Elliott nei primi anni '80 e ha alla base gli stessi principi fisici della tradizionale Tomografia Assiale Computerizzata.

Il sistema è costituito da un tubo a raggi X microfoco, un portacampione rotante su cui viene posizionato l'oggetto e un sistema di rivelazione per l'acquisizione dell'immagine. Una delle principali differenze della micro-CT rispetto alla TAC clinica è che il sistema sorgente-rivelatore resta fisso durante la scansione mentre il portacampione ruota, permettendo l'acquisizione delle immagini su diversi angoli.

Esistono sistemi micro-CT sia per lo studio *in vivo* di animali da laboratorio, sia per l'analisi *in vitro* di piccoli campioni.

La risoluzione spaziale, usando una geometria cone beam, risulta strettamente legata alle dimensioni dell'oggetto in esame; attualmente sono disponibili sistemi con risoluzione spaziale dell'ordine di pochi  $\mu\text{m}$ .

Per lo studio *in vitro* di provini di osso trabecolare, ad esempio, i campioni di 8-10 mm hanno una risoluzione spaziale dai 14 ai 30  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ .

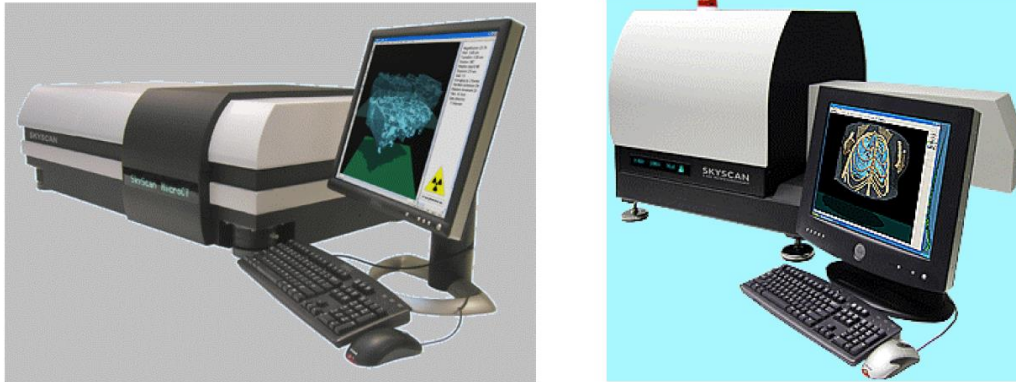


Figura 14: A sinistra un esempio di sistema micro-CT per imaging in-vitro di campioni d'osso, a destra un sistema micro-CT per imaging in-vivo di piccoli animali da laboratorio.

## Microtomografia con luce di Sincrotrone (SR- $\mu$ CT)

Oltre all'utilizzo di sorgenti commerciali a raggi X, per la tomografia computerizzata può essere utilizzata anche la radiazione di sincrotrone. Questa radiazione viene prodotta quando elettroni relativistici vengono accelerati da un campo magnetico. Utilizzando monocromatori, è possibile produrre bande energetiche molto strette, ottenendo un fascio a raggi X quasi monocromatico. La divergenza del fascio di radiazione X è tipicamente molto piccola, quindi è possibile utilizzare la ricostruzione per fascio parallelo. Questo rende la radiazione di sincrotrone la sorgente radiografica ideale per l'imaging tomografico. La sezione trasversale del fascio può essere dell'ordine di alcuni centimetri, pertanto è adatta per l'esame di campioni ossei [66][75][78]. Ci sono tuttavia delle limitazioni soprattutto a causa dell'accesso limitato a tali sistemi ingombranti, tipicamente situati in grandi centri di ricerca (ad esempio presso ELETTRA, Basovizza, Trieste, Italia o all'ESRF, Grenoble, Francia).

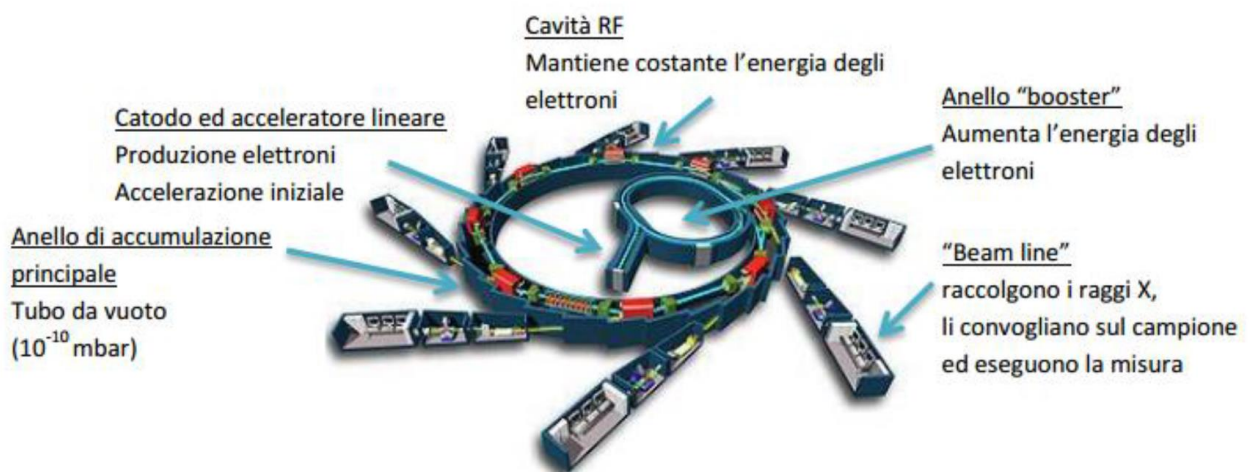


Figura 15: Schema di funzionamento di un sincrotrone. Il diametro dell'anello di accumulazione misura in genere 100 m o più.

## Ultrasonografia ossea quantitativa

L'Ultrasonografia Ossea Quantitativa (QUS), è stata introdotta nella pratica clinica ormai da più di 10 anni. L'interesse per questa metodica è legato ad alcune sue caratteristiche: si tratta di una metodica relativamente semplice, poco costosa, facile da attuare, trasportabile e non utilizza radiazioni ionizzanti [37].

I siti di misura che vengono analizzati tramite ultrasonografia ossea quantitativa sono tutti periferici: falange, metacarpo, omero, calcagno, radio, tibia. L'architettura ossea (osso compatto o trabecolare), il tipo di osso (osso lungo o osso piatto), le sedi diafisarie, epifisarie o metafisarie, sono fattori da cui dipende la sensibilità metabolica del tessuto osseo analizzato e in ultima analisi determinano le prestazioni delle apparecchiature.

Nei numerosi studi clinici presenti in letteratura, si dimostra che la correlazione lineare fra i valori ultrasonografici e quelli densitometrici è positiva e statisticamente significativa, tuttavia non è sufficiente per poter risalire in maniera affidabile attraverso la QUS al valore della BMD assiale o femorale. Queste osservazioni dimostrano che la QUS non può sostituire la densitometria ossea, ma può integrarsi ad essa [34].

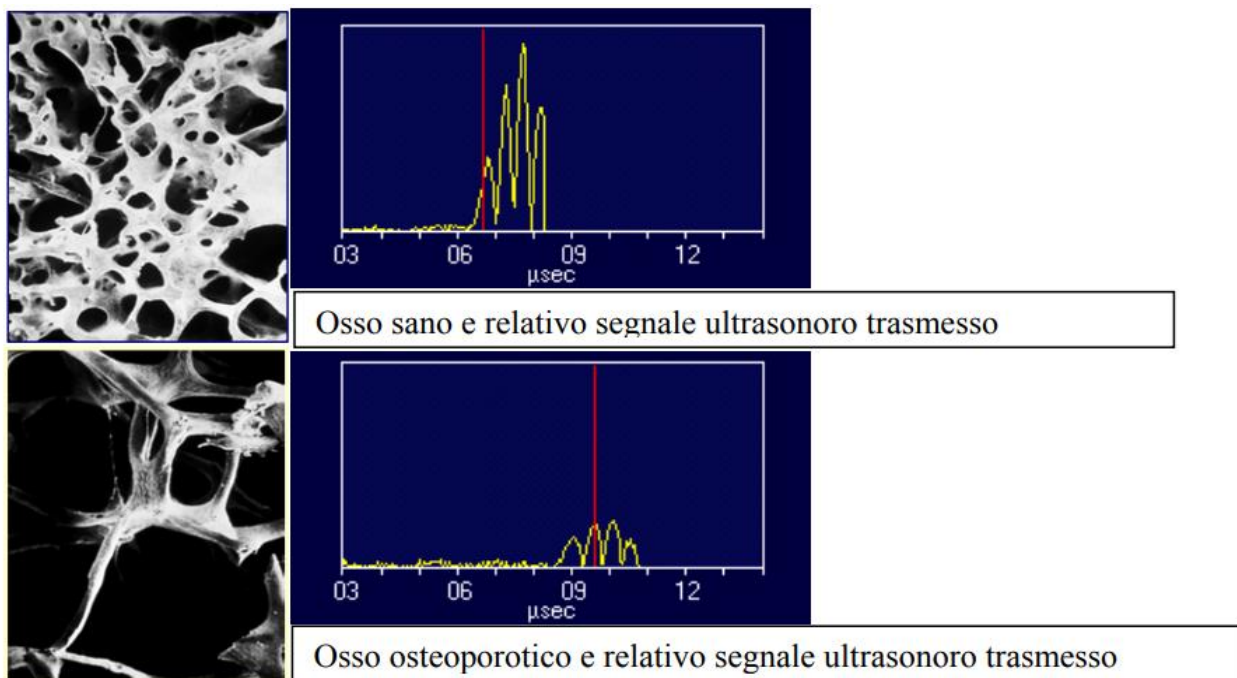


Figura 16: Traccia segnale acquisito con ultrasonografia ossea a livello delle falangi in osso sano e osteoporotico.

## Risonanza magnetica e $\mu$ MRI

L'imaging a risonanza magnetica nucleare (NMR, spesso chiamato solo imaging a risonanza magnetica, MRI) è fondamentalmente diverso da quello CT. Invece di utilizzare le radiazioni ionizzanti, l'MRI utilizza campi magnetici, il che rappresenta un enorme vantaggio in termini di esposizione del paziente nelle applicazioni mediche. È particolarmente indicata per visualizzare i tessuti molli, i muscoli, il midollo osseo, che sono principalmente composti da acqua. Riferendosi all'immagine dell'osso, si potrebbe dire che l'MRI è complementare alla CT.

L'esame in vivo tipico degli esseri umani, eseguito con attrezzature standard, utilizza un campo magnetico di intensità pari a 1,5 Tesla. In generale, una limitazione per la risoluzione spaziale in MRI-imaging è data dal tempo di misurazione. Pertanto, per ottenere una risoluzione spaziale sufficiente con un tempo di misurazione accettabile, sono preferiti siti di esame periferici come il dito, il radio o il calcagno e vengono utilizzate bobine e metodi di imaging specializzati.

Come detto precedentemente, sia la QCT che la DEXA sono perfettamente in grado di valutare il rischio di fratture osteopeniche indagando il fattore densità ossea come strettamente collegato alla resistenza meccanica. Restano tuttavia da valutare altre variazioni come quella della micro-architettura trabecolare, lo spazio inter-trabecolare e la distribuzione delle trabecole; la Risonanza Magnetica rappresenta una nuova tecnica non invasiva capace di valutare queste variazioni ed è inoltre capace di evidenziare sottili linee di frattura (linee ipointense nelle immagini pesate in T1 ed iperintense nelle immagini pesate in T2), di porre diagnosi differenziale tra fratture traumatiche e patologiche, tra collasso vertebrale maligno e benigno.

La micro-RM, con risoluzioni spaziali fino a 40  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , viene utilizzata nello stesso modo della micro-CT per estrarre parametri morfometrici dall'osso trabecolare.



Figura 17: Esempio di sistema microMRI a sinistra e scanner MRI per uso clinico sulla destra.

# CAPITOLO 3

## Principi di tomografia a raggi X

### Produzione di raggi X e loro interazione con la materia

I raggi X sono radiazioni elettromagnetiche ionizzanti di lunghezza d'onda variabile, compresa approssimativamente tra 10 nm e 0.001 nm, ovvero nel range che va dai raggi UV ai raggi Gamma. A questo intervallo corrisponde quello delle frequenze,  $3 \cdot 10^{16} \div 3 \cdot 10^{20}$  Hz e quello delle energie, da qualche decimo di KeV a migliaia di KeV.

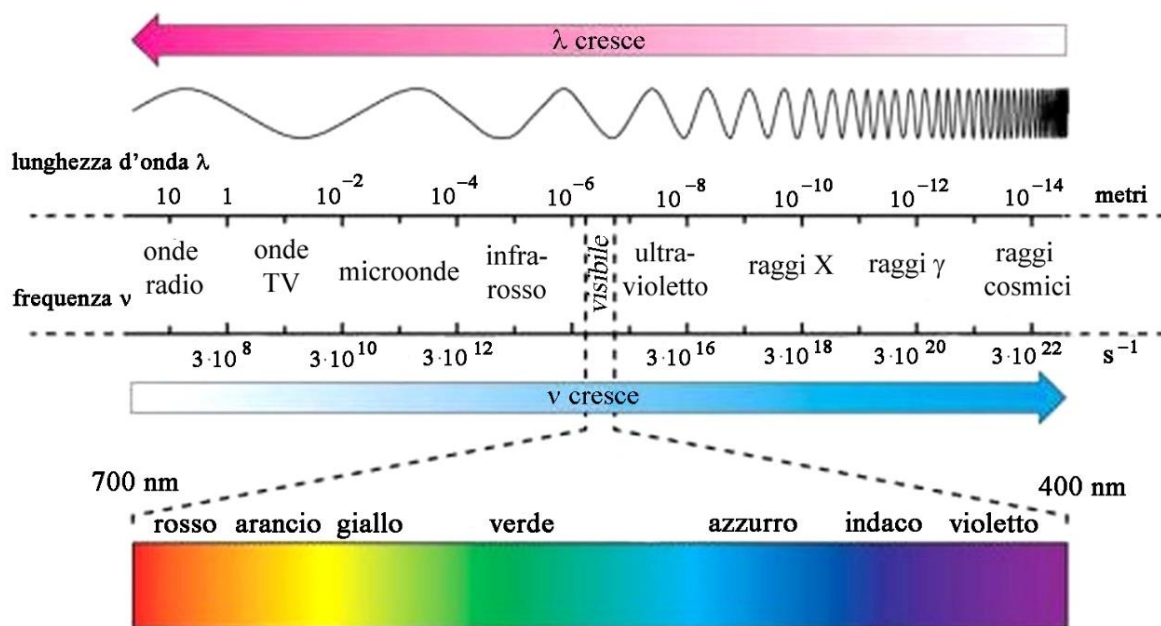


Figura 18: Spettro elettromagnetico.

Vista una lunghezza d'onda così ridotta e quindi una notevole energia trasportata, i raggi X hanno un potere di penetrazione molto elevato e per questo sono largamente usati per indagare all'interno di oggetti in maniera non distruttiva; trovano applicazione in campo medico, nel settore dei beni culturali e in campo industriale.

Il termine “radiazione-X” fu coniato nel 1895 dal suo scopritore, Wilhelm Konrad Röntgen, al fine di connotare una radiazione di cui non si conoscevano esattamente la natura e i meccanismi di generazione [77].

I sistemi più utilizzati per la produzione di raggi X sono i tubi a raggi X, indicati anche come tubi radiogeni [47].

Il tubo radiogeno è un dispositivo che deve comprendere:

- Un luogo (catodo) dove vengono resi disponibili per effetto termico gli elettroni che costituiscono i proiettili con i quali colpire il metallo che rappresenta il bersaglio (anodo) sede della generazione dei raggi X;
- L’anodo costituito da materiale metallico idoneo a sopportare elevate temperature;
- Un involucro entro il quale sia effettuato un vuoto sufficientemente elevato (minore di  $10^{-6}$  mmHg) affinché sia facilitata la corsa degli elettroni che percorrono il tragitto tra catodo e anodo accelerati da un campo elettrico.

Il catodo è l’elettrodo negativo e comprende il filamento che si può rendere incandescente, contenuto in una particolare armatura metallica.

Gli elettroni liberi si originano dal filamento quando questo viene percorso da corrente elettrica. La produzione degli elettroni avviene, quindi, per effetto termoionico. Quando la temperatura di un metallo conduttore raggiunge un valore notevolmente superiore a quello normale, l’energia cinetica degli elettroni aumenta e un certo numero di questi acquista l’energia necessaria a sfuggire dal metallo. La produzione di elettroni liberi è tanto maggiore quanto più elevato è il grado di incandescenza del filamento.

Nei tubi radiogeni, la superficie emittente è costituita da un filamento metallico avvolto a spirale (spiralina catodica); il metallo utilizzato è il tungsteno, che ha il punto di fusione molto elevato ( $3400^{\circ}$  C) e un alto numero atomico ( $Z = 74$ ).

Applicando l’alta tensione, l’anodo assume un potenziale positivo elevato e tra il catodo e l’anodo si stabilisce un flusso elettronico al quale si dà il nome di corrente anodica o corrente del tubo.

L’anodo è l’elettrodo positivo del tubo radiogeno contro il quale avviene l’impatto del fascio elettronico che provoca la generazione dei raggi X.

È bene ricordare che nell’urto tra elettroni e anodo, solo il 5% dell’energia cinetica degli elettroni è disponibile per la produzione di raggi X, mentre il resto viene convertita in energia termica che può causare il deterioramento o addirittura la fusione dell’anodo.

La superficie anodica sulla quale viene concentrato il fascio elettronico proveniente dal filamento, viene identificata con il nome di area focale, ed è inclinata di un angolo di circa  $20^{\circ}$ .

Un parametro molto importante da valutare è il cosiddetto “focal spot”, che è l’effettiva dimensione dell’area dalla quale viene emesso il fascio. La dimensione della macchia focale è molto importante per la definizione dell’immagine. Più piccola è la macchia focale, più nitida sarà la forma prodotta dal fascio di raggi X sul rivelatore, mentre per macchie focali estese si crea una penombra detta “unsharpness”.

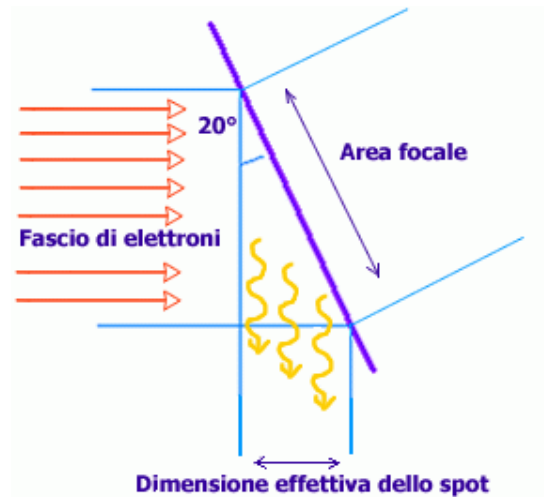


Figura 19: Macchia focale di un tubo a raggi X.

Le dimensioni della penombra sono calcolabili secondo la formula:

$$P = f \cdot \frac{D}{d} \quad (1)$$

Dove:

- $f$  è l'effettiva dimensione della macchia focale;
- $D$  è la distanza tra oggetto e piano dell'immagine;
- $d$  è la distanza tra sorgente e oggetto.

Il fatto che il fascio non sia formato da raggi tra loro paralleli, determina una magnificazione dell'oggetto. Si ricordi che un oggetto di spessore infinitesimo viene ingrandito di un fattore di magnificazione  $M$ , dato dal rapporto delle distanze sorgente-rivelatore e sorgente-oggetto.

Tale fattore può essere utilizzato per migliorare la risoluzione delle immagini radiografiche a parità del rivelatore utilizzato. L'effetto penombra è legato al rapporto di magnificazione dalla seguente espressione:

$$P = f(M - 1) \quad (2)$$

Il blurring o unsharpness aumenta quindi con la magnificazione e, a parità di  $M$ , risulta essere direttamente proporzionale alle dimensioni della macchia focale  $f$ .

È pertanto necessario raggiungere un compromesso tra l'ingrandimento dato dal fattore di magnificazione e la perdita di nitidezza. Questo fenomeno è presente in entrambe le dimensioni dell'immagine, ma non necessariamente in maniera isotropa, in quanto difficilmente le dimensioni dello spot sono simmetriche.

Per avere un'alta risoluzione spaziale (piccola "penombra"), si usano tubi a raggi X detti microfocuse in cui il punto focale è dell'ordine di pochi  $\mu\text{m}$ . Questo consente di



aumentare il fattore di magnificazione con un effetto di blurring praticamente trascurabile. Sono disponibili anche tubi a raggi X con macchie focali che possono raggiungere dimensioni di  $0.5 \mu\text{m}$  (nanofocus).

Nei tubi microfoco o nanofoco, la corrente è bassa nell'ordine di 1 mA e la tensione massima non supera i 150 kV. Utilizzando questi tubi, è possibile ottenere CT di piccoli oggetti con un'alta risoluzione spaziale.

L'efficienza della produzione di raggi X è indipendente dalla corrente del tubo, ma aumenta con l'aumentare della tensione. A 60 keV, solo lo 0.5% dell'energia cinetica degli elettroni è convertita in radiazione X; a 120 MeV, risulta essere il 70%.

Lo spettro dei raggi X ha essenzialmente due componenti:

- radiazione continua di frenamento (*Bremsstrahlung*);
- radiazione caratteristica.

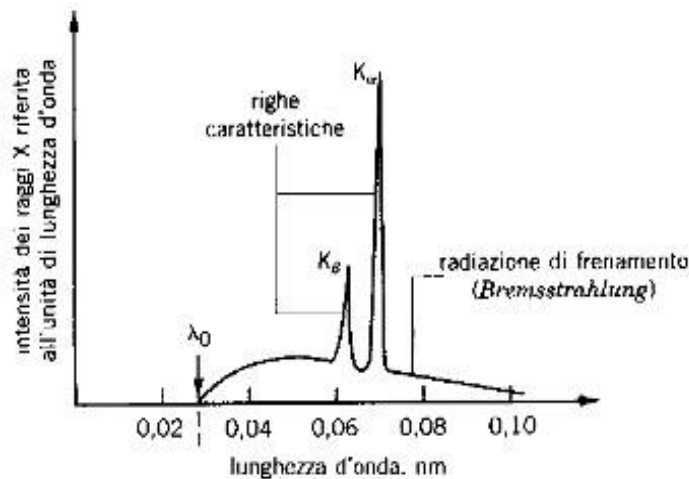


Figura 20: Spettro X con righe caratteristiche per un bersaglio di tungsteno bombardato con elettroni da 100 keV.

La radiazione continua di frenamento viene emessa quando un elettrone libero in moto, interagendo con il campo elettrico del nucleo di un atomo, subisce una brusca decelerazione. Tale decelerazione comporta una perdita di energia che viene emessa sotto forma di fotoni X. Lo spettro della radiazione emessa risulta essere continua poiché l'energia dei raggi X prodotti dipende dalla distanza dell'elettrone dal nucleo e può variare in maniera continua da 0 fino a un valore massimo uguale all'energia cinetica degli elettroni.

Quando invece un elettrone accelerato interagisce con uno degli elettroni più interni dell'atomo bersaglio, viene prodotto uno spettro a righe, specifico per ogni elemento e la radiazione prodotta viene detta caratteristica.

Lo spettro risultante di un tubo a raggi X è dato dalla sovrapposizione della componente continua e dello spettro a righe.

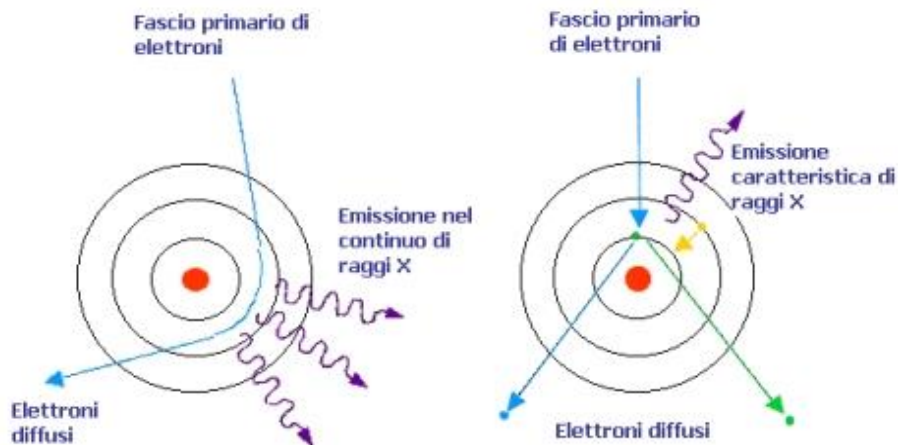


Figura 21: Rappresentazione schematica del processo di produzione dei raggi X.

I raggi X appartengono alla categoria delle radiazioni indirettamente ionizzanti, nell'interazione con la materia cedono la loro energia a particelle cariche secondarie. Nell'attraversare uno spessore di materiale, vi è una probabilità che un singolo fotone del fascio venga assorbito, diminuendo così il numero (intensità) dei fotoni del fascio uscente. Esistono diversi tipi di interazione possibili: l'effetto fotoelettrico, l'effetto Compton, la creazione di coppie, la diffusione coerente (Rayleigh) e l'effetto fotonucleare.

La probabilità che avvenga un particolare tipo di interazione dipende dal numero atomico degli atomi urtati, dall'energia dei fotoni e dalla densità del materiale bersaglio [51].

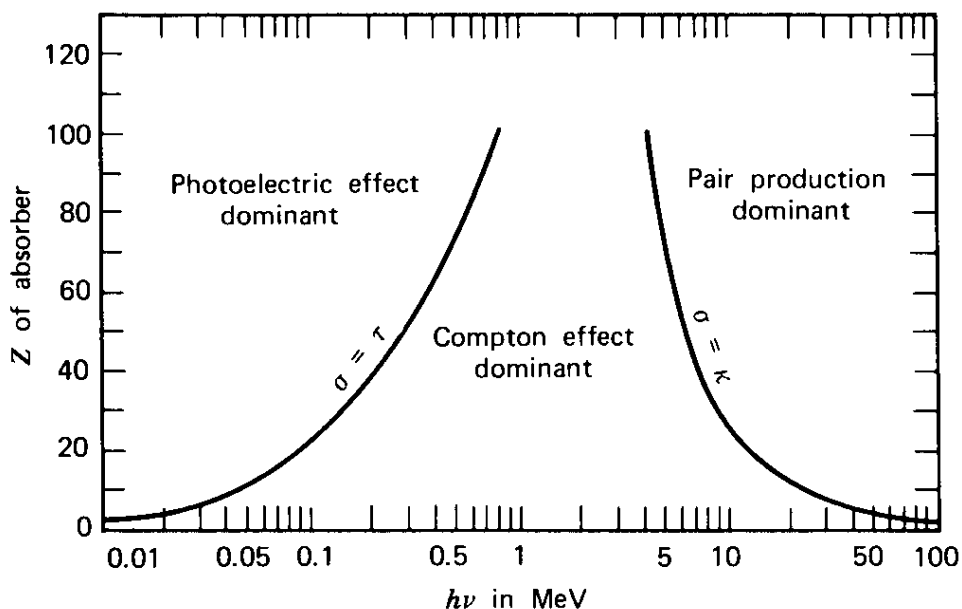


Figura 22: Regioni di dominanza per effetto fotoelettrico, effetto Compton e produzione di coppie, al variare dell'energia del fotone incidente  $E_\gamma = h\nu$  e al variare del numero atomico  $Z$  dell'assorbitore. Lungo la linea  $\sigma = \tau$ , l'effetto fotoelettrico e l'effetto Compton hanno la stessa probabilità di verificarsi. Analogamente, lungo la linea  $\sigma = \kappa$  l'effetto Compton e la produzione di coppie è ugualmente probabile. Dalla figura è evidente che l'effetto fotoelettrico è dominante alle basse energie, l'effetto Compton prevale nella zona delle energie intermedie, mentre la produzione di coppie è predominante alle alte energie.

Una misura della probabilità di interazione tra i fotoni e gli atomi del materiale attraversato è data dalla sezione d'urto  $\sigma$ , una grandezza intrinseca del singolo processo che può essere interpretata come l'area misurata attorno a una particella bersaglio, all'interno della quale, la presenza di una seconda particella, genera fenomeni di interazione tra i due corpi [2].

La sezione d'urto totale è data dal contributo di tutti gli effetti:

$$\sigma_{tot} = \sigma_{p.e.} + \sigma_{incoh} + \sigma_{p.p} + \sigma_{coherent} + \sigma_{nuc} \quad (3)$$

dove:

- $\sigma_{p.e.}$  è la sezione d'urto relativa all'effetto fotoelettrico;
- $\sigma_{incoh}$  è la sezione d'urto relativa all'effetto Compton;
- $\sigma_{p.p}$  è la sezione d'urto relativa alla produzione di coppie;
- $\sigma_{coherent}$  è la sezione d'urto relativa alla diffusione coerente;
- $\sigma_{nuc}$  è la sezione d'urto relativa all'effetto fotonucleare.

## Attenuazione del fascio

Come detto precedentemente, quando i raggi X sono diretti su un oggetto, alcuni fotoni interagiscono con le particelle di materia e la loro energia può essere assorbita o scatterata. Questi fenomeni determinano un'attenuazione dell'intensità del fascio a raggi X.

Nello specifico, se sul campione incide una radiazione di intensità  $I_0$ , in uscita l'intensità si ridurrà secondo la legge esponenziale di Lambert-Beer:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (4)$$

dove  $x$  è lo spessore dell'oggetto e  $\mu$  è detto coefficiente di assorbimento lineare.

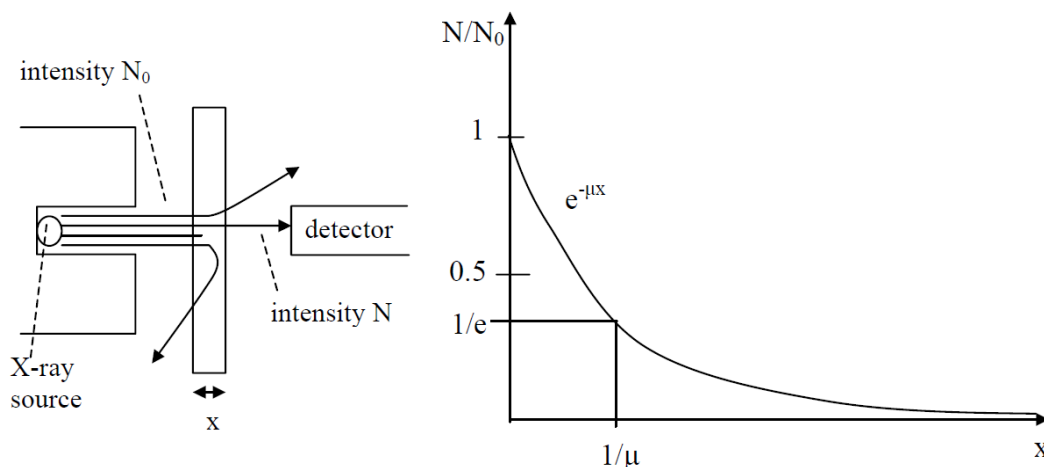


Figura 23: Schema di attenuazione dei raggi X di intensità iniziale  $N_0$  che attraversano un materiale assorbente di spessore  $x$ .

Il fascio di raggi X attraversando un oggetto, verrà attenuato tanto più quanto attraverserà materiali ad alto numero atomico ed elevata densità, quanto più bassa sarà l'energia e maggiore lo spessore attraversato.

Nel caso in cui il materiale investigato non sia omogeneo, ma di composizione e spessore variabile, l'intensità del fascio rivelato presenterà una distribuzione spaziale che dipenderà dall'oggetto stesso.

Tale intensità è calcolabile con l'integrale di linea del coefficiente di attenuazione lineare lungo la direzione del fascio e ci permette di ottenere informazioni sulla composizione dell'oggetto:

$$I = I_0 e^{-\int_a^b \mu(x) dx} \quad (5)$$

Tale formula non è esatta nel caso di un fascio policromatico come quello prodotto da un tubo a raggi X.

Se l'energia E varia, l'espressione precedente non è più valida, ma deve essere sostituita da:

$$I = \int_0^{E_{max}} I_0(E) \cdot e^{-\int_a^b \mu(x,E) dx} dE \quad (6)$$

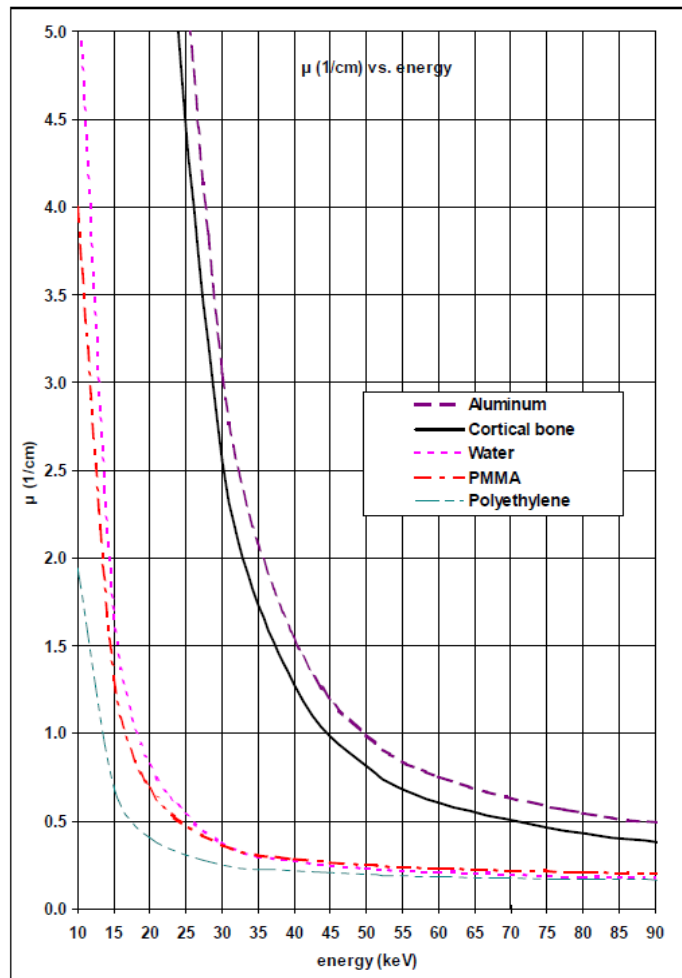


Figura 24: Il grafico mostra i coefficienti di attenuazione per diversi materiali al variare dell'energia [44].

## Metodi di ricostruzione tomografica

Una scansione tomografica consiste nell'acquisizione di molte proiezioni radiografiche dell'oggetto a diversi angoli. Terminata la fase di acquisizione, inizia la fase di ricostruzione dalla quale si ottengono le diverse slice elaborando le immagini acquisite. Si vuole focalizzare l'attenzione sul seguente concetto: ogni singola slice ricostruita è una immagine bidimensionale, la quale rappresenta una sezione interna dell'oggetto studiato. Bisogna però tenere conto del fatto che fisicamente la slice ha uno spessore non nullo, in quanto rappresenta una sezione di volume. Entrando nel dettaglio di un singolo pixel, esso nella realtà rappresenta un elemento di volume e viene chiamato voxel.

Nella descrizione del metodo di ricostruzione ipotizzeremo, per semplicità, di avere un fascio di raggi X paralleli che attraversa un singolo piano dell'oggetto; dopo averlo attraversato, i raggi X giungono su un rivelatore costituito da  $n$  elementi.

L'idea di base è quella di suddividere idealmente ogni slice in una griglia di  $n \times n$  pixels ciascuno di coefficiente di attenuazione  $\mu_{ij}$  e dimensioni  $w \times w$  date dalla grandezza di un singolo elemento del rivelatore.

L'intensità  $I_j$  misurata da ogni elemento del rivelatore risulta essere:

$$I_j = I_0 e^{-|\mu_{1j} + \mu_{2j} + \dots + \mu_{nj}|w} \quad j = 1, 2, \dots, n \quad (7)$$

ovvero:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I_j}\right) = \sum_{i=1}^n \mu_{ij}w \quad (8)$$

Questa quantità viene chiamata proiezione  $p_j$  e costituisce l'informazione base a partire dalla quale l'immagine può essere ricostruita. Al fine di ottenere tutti i coefficienti  $\mu_{ij}$  è necessario possedere altre proiezioni, ottenute dalla rotazione dell'oggetto.

Nel momento in cui viene a mancare la perpendicolarità tra il fascio parallelo di raggi X e la griglia in cui è idealmente suddiviso l'oggetto, il calcolo della proiezione si rivela più complicato: infatti, i fotoni giungono sul rivelatore avendo attraversato spessori di pixel  $w_{ij}$  variabili da pixel a pixel e dipendenti dalla proiezione.

In generale, adottando un sistema di coordinate  $(x, y)$  per i punti dell'oggetto e  $(r, s)$  per il percorso lineare dei raggi del fascio quando il sistema è ruotato di un angolo  $\theta$  rispetto all'asse  $y$ , le proiezioni  $p_1 \dots p_n$  possono essere espresse come integrale di linea della distribuzione dei coefficienti di attenuazione  $f(x, y)$ :

$$p(r, \varphi) = \int_{r, \varphi} f(x, y) ds \quad (9)$$

Questo integrale non è altro che la trasformata di Radon:

$$P_{\theta}(t) = \int_L f(x, y) dl \quad (10)$$

dove L ha equazione  $x \cos \theta + y \sin \theta = t$  [46].

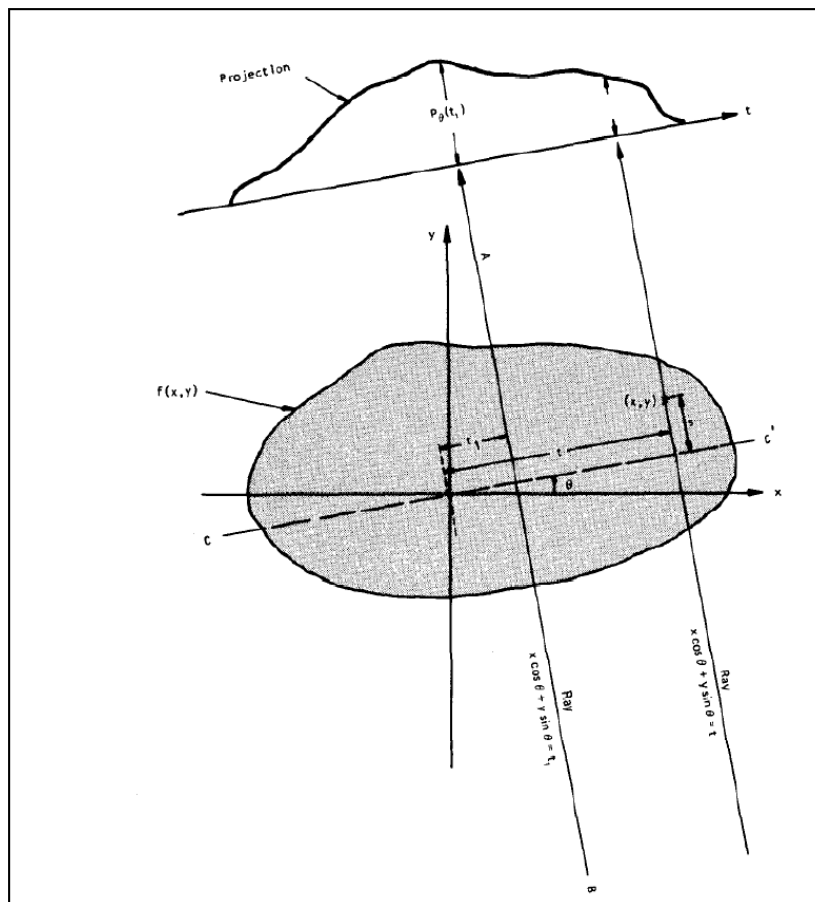


Figura 25: Schema di un oggetto  $f(x, y)$  e la sua proiezione  $P_{\theta}(t)$ , per un angolo  $\theta$ .

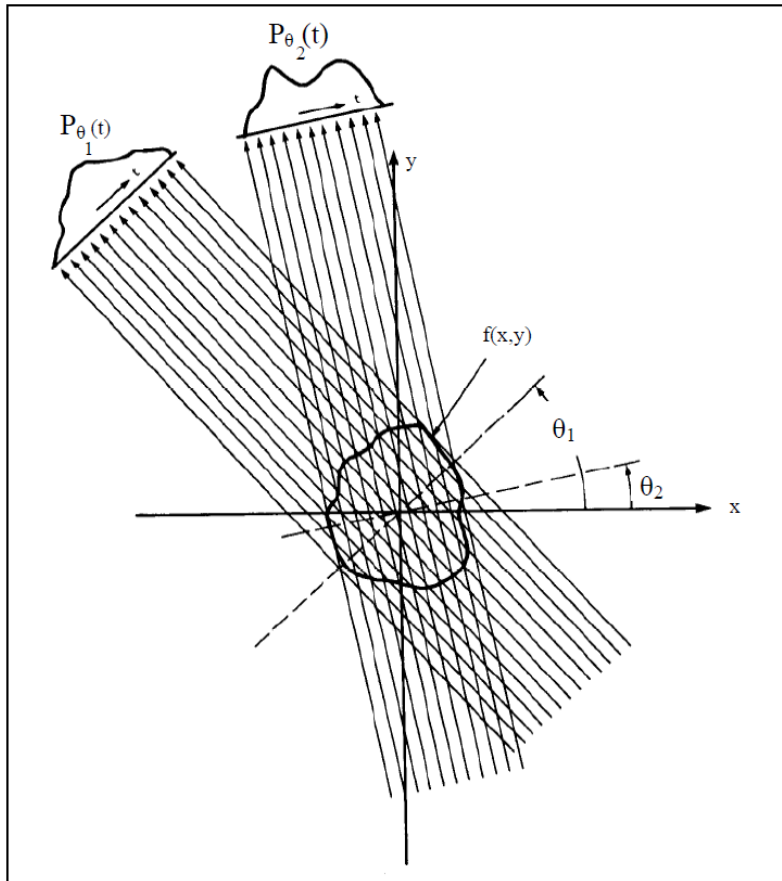


Figura 26: Raccolta di proiezioni parallele ottenute misurando un set di raggi paralleli, presi a diversi angoli di rotazione.

L'insieme completo dei dati per la ricostruzione di una singola slice consiste di  $m$  acquisizioni a diversi angoli  $\theta$  di rotazione equispaziati, ognuna delle quali contiene, a sua volta,  $n$  proiezioni a intervalli di  $w$ . Per ottenere un numero sufficiente di dati indipendenti, è necessario che sia  $m > n$ . La matrice  $n \times m$  ottenuta dagli  $n$  pixels delle  $m$  proiezioni radiografiche, viene detta "sinogramma": l'immagine ottenuta contiene una sinusoide per ogni particolare dell'oggetto e l'ampiezza di detta sinusoide dipende dalla distanza del particolare dal centro di rotazione dell'oggetto.

Il primo a risolvere il problema della determinazione dei valori di una funzione  $f(x, y)$  in un piano a partire dagli integrali di linea fu Radon, agli inizi del Novecento, e la gran parte degli algoritmi per la ricostruzione delle immagini utilizzano la tecnica di "retroproiezione" (back projection). L'algoritmo di retroproiezione agisce in modo da proiettare indietro sul piano della slice i valori di ogni proiezione ai vari angoli.

Per ciascun pixel, i contributi delle  $m$  proiezioni sono sommati assieme secondo la formula:

$$\hat{f}(x, y) = \sum_{j=1}^m p_j \Delta\varphi \quad (11)$$

dove  $\hat{f}(x, y)$  è la distribuzione dei coefficienti di attenuazione ottenuti con questo algoritmo.

Se, ad esempio, si considera la retroproiezione di un oggetto circolare, ogni profilo proietta sul piano una striscia e questo determina un artefatto a stella. Aumentando il numero delle proiezioni, esso diminuisce, ma rimane, attorno all'oggetto, un alone di intensità decrescente allontanandosi dal centro dell'oggetto stesso. Per eliminare questo effetto, si utilizzano dei filtri applicabili sia alle proiezioni prima che vengano retroproiettate, sia all'immagine finale.

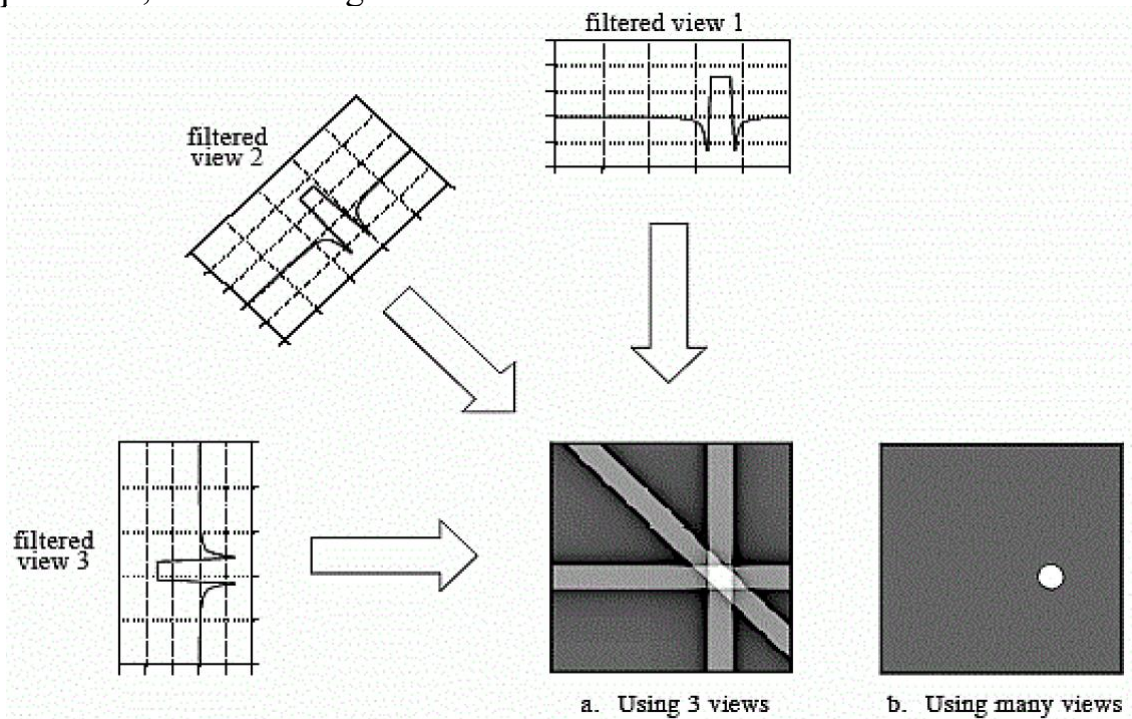


Figura 27: Filtered Backprojection.

Il metodo attualmente considerato standard per la ricostruzione di immagini tomografiche è l'algoritmo di retroproiezione filtrata (dall'inglese filtered backprojection FBP) che ha il vantaggio di essere semplice e veloce nell'esecuzione. Questo algoritmo si basa sul "teorema della sezione centrale di Fourier", che è fondamentale in quanto mette in relazione le trasformate di Fourier unidimensionali delle proiezioni acquisite, con una riga nello spazio bidimensionale della trasformata di Fourier dell'immagine da ricostruire. Per ricavare l'immagine occorre quindi eseguire l'antitrasformata di Fourier bidimensionale nello spazio delle trasformate di Fourier delle proiezioni acquisite. Da questa antitrasformazione si evince che l'algoritmo è composto da due fasi distinte ed entrambe necessarie: una di filtraggio delle proiezioni e una di retroproiezione. Da qui il nome dell'algoritmo "filtered backprojection".

La fase di filtraggio può essere fatta sia nello spazio reale che nello spazio trasformato di Fourier, di solito si utilizzano filtri passa-basso che permettono di ridurre il rumore nelle immagini acquisite.



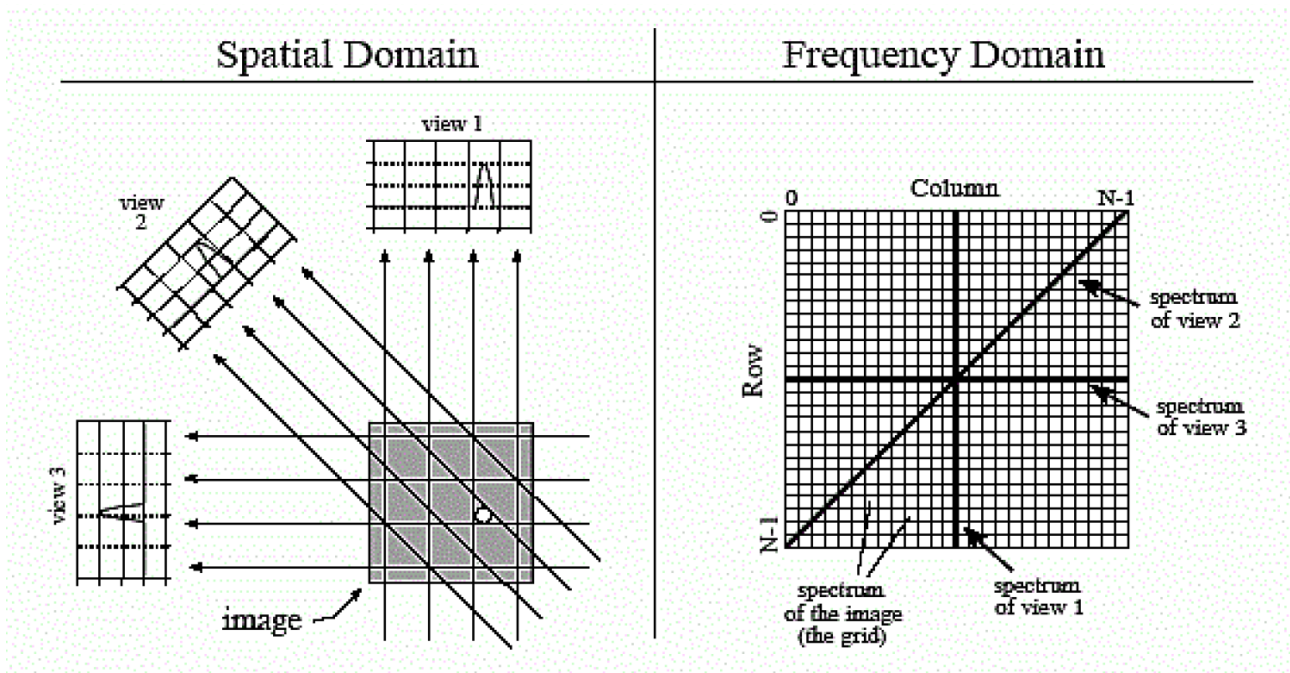


Figura 28: Fourier slice theorem.

## Scala delle unità Hounsfield

Per quantificare alcune delle proprietà del tessuto osseo, è necessario determinare la calibrazione standard dell'attenuazione dei raggi X. Ad ogni pixel nell'immagine è assegnato un valore numerico (numero CT) corrispondente al coefficiente di attenuazione medio del voxel corrispondente. Questi numeri CT sono confrontati con il valore di attenuazione dell'acqua e mostrati su una scala di unità arbitrarie definita scala delle unità Hounsfield (HU). In pratica si tratta di una trasformazione lineare della misura del coefficiente di attenuazione lineare originale rispetto alla radiodensità dell'acqua distillata ad una temperatura e pressione standard (STP) che è definita come 0 HU, mentre la radiodensità dell'aria a STP è definita come -1000 HU.

Per un materiale X con un coefficiente di attenuazione lineare  $\mu_x$ , il corrispondente valore HU è dato da:

$$\text{NumeroCT (HU)} = 1000 \times \frac{\mu_x - \mu_{\text{water}}}{\mu_{\text{water}} - \mu_{\text{air}}} \quad (12)$$

Dove  $\mu_{\text{water}}$  e  $\mu_{\text{air}}$  sono rispettivamente i coefficienti di attenuazione lineare di acqua e aria.

In tabella 3 sono riportati i valori HU di sostanze comuni.

È importante sottolineare che il numero di Hounsfield di un tessuto varia in accordo con la densità del tessuto stesso; così, più alto è il numero, più denso è il tessuto e HU può essere usato direttamente per determinare le alterazioni della qualità ossea.

Sostanza	HU
Aria	-1000
Polmone	-500
Tessuto adiposo	da -100 a -50
Acqua	0
Fluido cerebrospinale	15
Rene	30
Sangue	da +30 a +45
Tessuto muscolare	da +10 a +40
Materia grigia	da +37 a +45
Materia bianca	da +20 a +30
Fegato	da +40 a +60
Mezzo di contrasto, Tessuto molle	da +100 a +300
Osso	da +700 (osso spugnoso) a +3000 (osso denso)

Tabella 3: Unità Hounsfield per alcune sostanze.

## Artefatti tomografici

### Beam Hardening

Il coefficiente di attenuazione dipende dalla composizione del materiale esaminato e dall'energia dei fotoni incidenti [46]. L'attenuazione dei raggi X a basse energie è maggiore di quella ad alte energie. Quindi, nel caso di un fascio policromatico di raggi X che attraversa un materiale uniforme, i fotoni emergenti dal materiale avranno uno spettro energetico differente da quello dei fotoni entranti, con le componenti a basse energie più attenuate. Questo comporta un fascio "più energetico" emergente dal materiale, un fascio "più duro" ("harder" in inglese) [5]. Di conseguenza l'attenuazione prodotta da un dato materiale, definita come il logaritmo negativo del rapporto tra intensità trasmessa e incidente, non è strettamente proporzionale al suo spessore.

Idealmente, in una sezione di una immagine ricostruita di un oggetto di materiale omogeneo, tutti i pixel del materiale dovrebbero avere lo stesso coefficiente di attenuazione. In presenza del beam hardening, i pixel della parte più interna dell'oggetto mostreranno valori di attenuazione differenti rispetto a quelli più esterni, come se fossero di materiali diversi. Questo è dovuto ai fotoni di basse energie, che sono in gran parte assorbiti rispetto a quelli ad alte energie.

La figura 30 mostra un esempio di questo effetto [46]; l'aumento dei valori di attenuazione vicino al portacampione (effetto sbiancamento), dovuto alla natura policromatica del fascio di raggi X, è evidente.

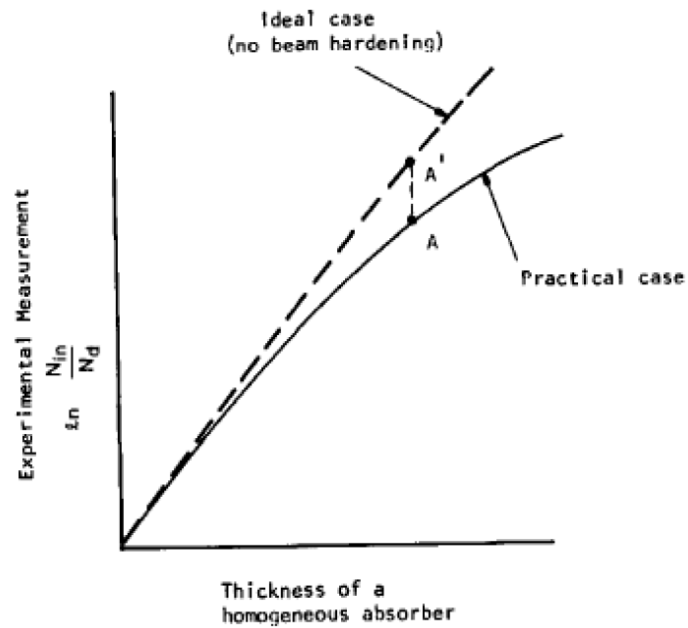


Figura 29: Misura dell'attenuazione di un raggio X,  $\ln(N_{in}/N_d)$ , con  $N_{in}$  numero di fotoni entranti nel materiale,  $N_d$  numero di fotoni uscenti dal materiale. Il caso in cui è presente il beam hardening è rappresentato dalla linea continua, mentre il caso ideale dalla linea tratteggiata. Nel caso in cui è presente il beam hardening, l'attenuazione dipende non-linearmente dallo spessore dell'assorbitore.

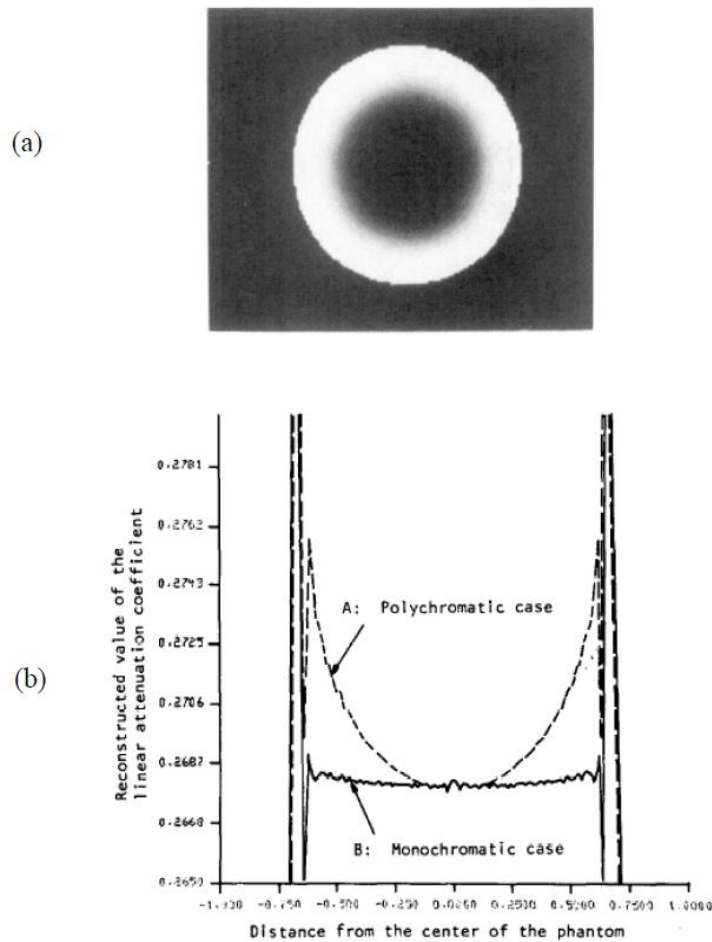


Figura 30: (a) Ricostruzione CT di un fantoccio d'acqua all'interno di un portacampione, (b) profilo di attenuazione per entrambi i casi, policromatico e monocromatico.

Per minimizzare questo fenomeno, sono state sviluppate soluzioni hardware e software [46]. Un esempio di soluzione hardware è l'utilizzo di una lastra sottile di materiale assorbente, come può esserlo l'alluminio, che abbia spessore dell'ordine di qualche millimetro, posto tra la sorgente a raggi X e l'oggetto. L'effetto è quello di filtrare intenzionalmente le componenti di energie più basse dello spettro, che altrimenti sarebbero già state rimosse dagli strati più esterni del materiale in esame. La figura 31 mostra lo spettro a raggi X emesso da un tubo di tungsteno per due diversi voltaggi, in presenza e in assenza del filtro hardware 1mm-Al.

Tra le soluzioni software rientra un secondo metodo basato su una procedura di linearizzazione. Come si è visto precedentemente, per oggetti omogenei e per una sorgente monocromatica esiste una relazione di tipo lineare tra lo spessore attraversato dalla radiazione e le attenuazioni misurate; in realtà, a causa della policromaticità del fascio, si nota una deviazione dal trend lineare, si può quindi definire una relazione di tipo non lineare, ad esempio tramite delle polinomiali che andranno a correggere il beam hardening mediante l'utilizzo della retta che si otterrebbe in caso di monocromaticità del fascio [40][35][8].

Per piccoli artefatti, come avviene nei tessuti molli, risulterà sufficiente l'applicazione di una curva polinomiale del secondo ordine; per i materiali più densi saranno invece richieste polinomiali di ordine maggiore.

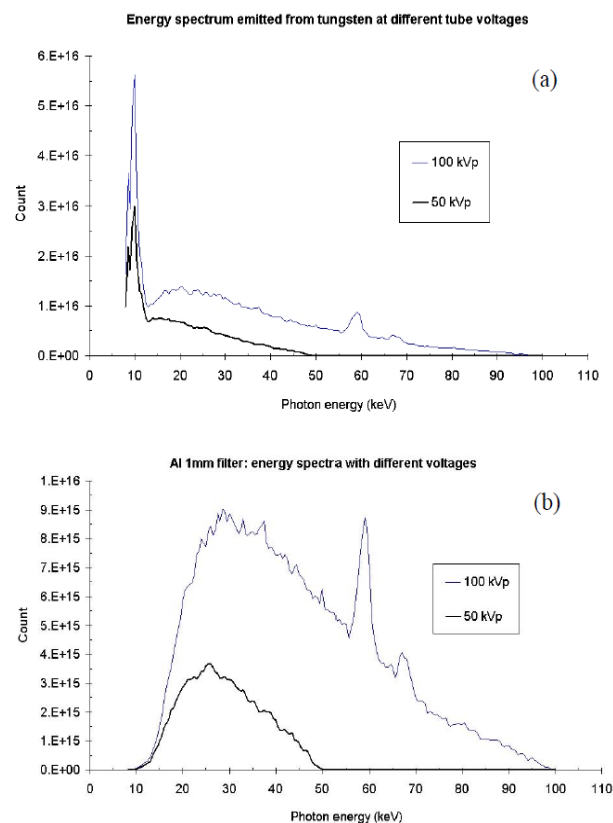


Figura 31: (a) Spettro dei raggi X per un tubo di tungsteno a due diversi voltaggi; (b) spettro dei raggi X dopo l'inserimento di un filtro in Alluminio di 1 mm di spessore. Le componenti a bassa energia (< 10 keV) sono state tagliate fuori dal filtro. In ogni caso, l'intensità fotonica è inferiore dopo il filtraggio, come si può ben vedere dai conteggi nel grafico (Spettri forniti dalla Skyscan, Aartselaar, Belgio).

## Ring artifact

Occasionalmente, problemi minori come un pixel difettoso sul CCD, un difetto nello scintillatore che converte i raggi X in luce visibile o della polvere nel sistema di rilevazione creeranno un artefatto simile ad anelli o mezzi anelli attorno al centro di rotazione dell'immagine ricostruita. Pulire il sistema a volte può eliminare questo artefatto. Per i pixel difettosi, alcuni sistemi hanno la possibilità di sostituire il pixel elettronicamente utilizzando una media di pixel vicini. Anche se i dati per i pixel difettosi andranno persi, la media effettivamente rimuoverà l'artefatto ad anello.

## Artefatti metallici

Materiali con coefficienti di attenuazione lineare molto alti (come i metalli) possono causare l'assorbimento totale del fascio di raggi X, dando luogo ad artefatti a forma di stella nelle immagini ricostruite. Questo effetto può essere prevenuto solo escludendo i materiali ad alto assorbimento dalla scansione. Metalli come l'acciaio possono essere sostituiti da alluminio o titanio, che hanno coefficienti di attenuazione lineari molto inferiori e non dovrebbero causare questo tipo di artefatto.

## Artefatti di movimento

Durante la scansione, un campione viene in genere ruotato rispetto alla fonte di radiazioni per ottenere proiezioni da più angolazioni. Se l'oggetto si muove all'interno del tubo di scansione durante questa rotazione, le proiezioni non si incastreranno correttamente durante la ricostruzione, con conseguente distorsione dell'oggetto. Per questo motivo è importante stabilizzare correttamente il campione in modo che non si verifichi alcun movimento durante la scansione. Un disallineamento del centro di rotazione può anche apparire come un artefatto da movimento. In questo caso, una misurazione del fantoccio (che presumibilmente non avrebbe avuto possibilità di movimento) deve essere eseguita per distinguere tra le due diverse possibili origini dell'artefatto.

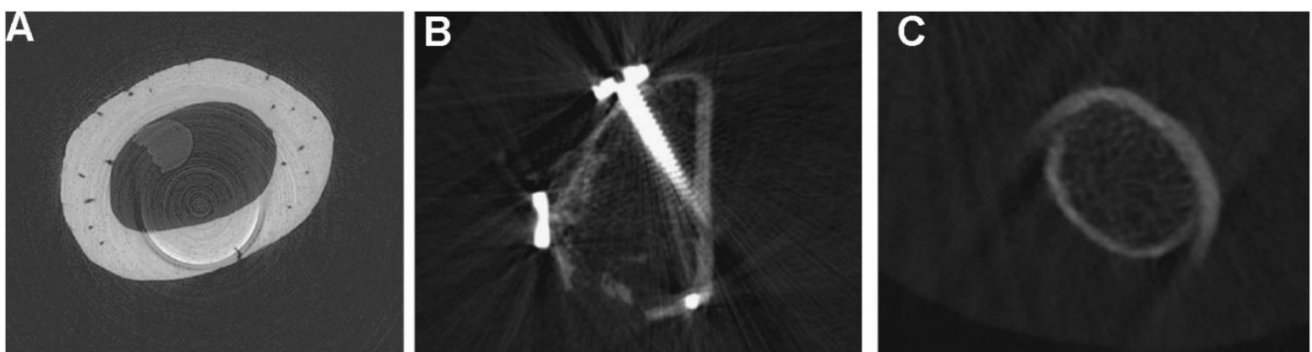


Figura 32: Esempi di comuni artefatti di scansione: (A) ring artifact; (B) artefatto metallico; e (C) artefatto da movimento. Il ring artifact in questa immagine è stato causato da un difetto dello scintillatore che converte i raggi X in luce visibile. La vite in B assorbe molta radiazione, il che si traduce in artefatti a forma di stella e anche in distorsioni dell'immagine. In C si mostra la scansione dell'ulna di un paziente il quale ha spostato il braccio durante la misurazione. Per questa ragione, la corteccia non è un anello chiuso, ma piuttosto composta da due semianelli che si uniscono nelle due code [83].

# CAPITOLO 4

## Microtomografia a raggi X del tessuto osseo

La microtomografia a raggi X, come la tomografia standard utilizza i raggi X per creare delle sezioni trasversali di un oggetto fisico per poi ricreare un modello virtuale (modello 3D) senza distruggere l'oggetto originale. Il prefisso micro- (simbolo  $\mu$ ) viene utilizzato per indicare che le dimensioni dei pixel delle sezioni trasversali sono nel range del micrometro.

La micro-CT ha applicazioni sia in campo medico che in quello industriale. A differenza della CT medica, nella micro-CT, il sistema sorgente-rivelatore è fisso, mentre le immagini sono acquisite con il campione posto su un piatto rotante.

### Il sistema microtomografico a raggi X

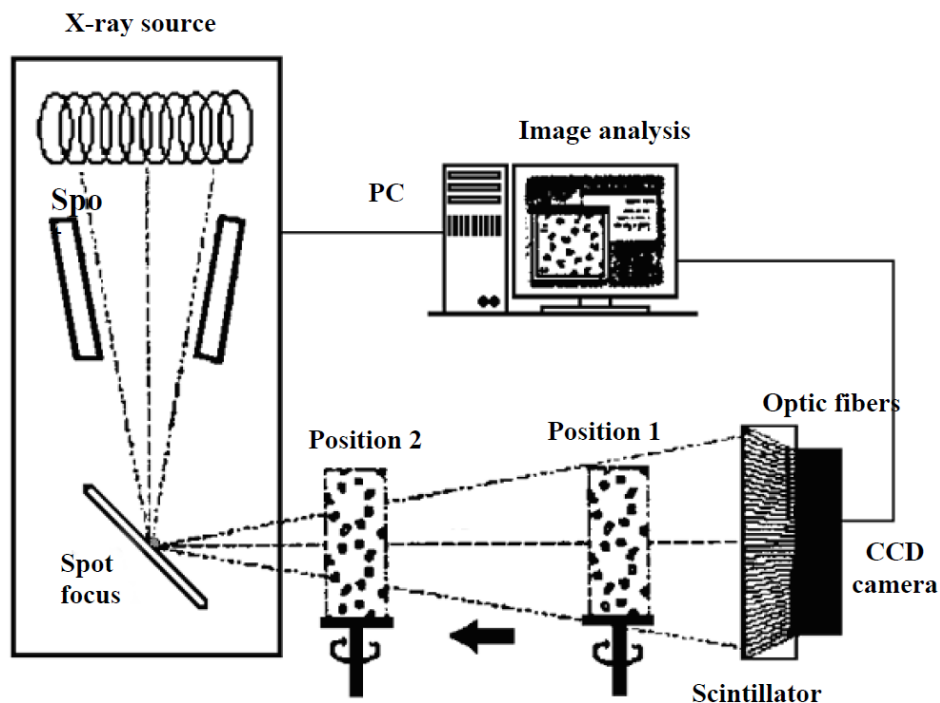


Figura 33: Schema di un sistema micro-CT, sono mostrate le componenti principali.

Gli elementi principali che compongono un sistema microtomografico sono:

- La sorgente di raggi X;
- Il sistema di rotazione dei campioni;
- Il rivelatore.

### **La sorgente di raggi X**

Le modalità di produzione di raggi X sono molteplici e si caratterizzano in base alle energie di lavoro:

- Tubi a raggi X (da 5 keV a 450 keV);
- Luce di sincrotrone (da 5 keV a 100 keV).

I moderni sincrotroni rappresentano la miglior sorgente di raggi X, in quanto forniscono fasci monocromatici e flussi elevati, consentono di ottenere immagini a elevata risoluzione (dell'ordine di qualche micrometro) e un rapporto segnale-rumore alto. In alternativa ai sincrotroni, che ricordiamo presentano lo svantaggio di essere molto costosi e non facilmente accessibili, sono utilizzati tubi a raggi X.

### **Il sistema di rotazione dei campioni**

Mentre per i sistemi clinici la sorgente e il rivelatore ruotano in maniera solidale attorno al paziente, nei sistemi sperimentali e in campo industriale, è il campione a ruotare mentre sorgente e rivelatore non compiono alcun movimento.

Un sistema di movimentazione è composto da una base rotativa su cui verrà poggiato il campione ed eventualmente può essere presente un secondo asse meccanico di traslazione, che consente movimenti verticali.

L'asse rotativo è indispensabile per poter acquisire il set di radiografie per la ricostruzione tomografica, mentre la traslazione non sempre è necessaria, ma può rivelarsi utile per posizionare con precisione l'oggetto davanti al rivelatore.

### **Il rivelatore**

La funzione di un rivelatore è quella di misurare l'intensità dei raggi X trasmessi dopo che questi hanno interagito col campione in esame. Attualmente esiste una vasta gamma di sistemi con proprietà anche molto differenti fra loro; la prima distinzione si ha sul metodo di rivelazione che può essere diretta o indiretta.

Nel caso di rivelazione diretta, la radiazione X crea direttamente in un opportuno materiale un segnale elettrico proporzionale all'intensità del fascio incidente.

Nel caso di rivelazione indiretta, la radiazione X viene prima “convertita” in luce visibile per mezzo di uno scintillatore e successivamente viene letta da un rivelatore digitale.

Le tecnologie più diffuse sono:

- CCD (Charge Coupled Devices - Rivelatori ad accoppiamento di carica);
- FPD (Flat Panel Detectors - Rivelatori a pannelli piatti).

## **Il microtomografo Skyscan 1072**

Micro-CT Skyscan 1072 è caratterizzato da un tubo a raggi X microfoco alimentato ad alta tensione, un supporto campioni con manipolatore di precisione, una camera CCD a due dimensioni connessa al dispositivo di cattura e un computer con un monitor a colori.

La sorgente è costituita da un tubo radiogeno con anodo in tungsteno da 10 W (Microfocus X-ray Source L7901-01, Hamamatsu) raffreddato ad aria che lavora con correnti e tensioni che assumono valori di 0-250  $\mu$ A e 20-100 kVp rispettivamente, per una massima potenza di 4 W.

Il microtomografo in questione utilizza una geometria cone beam la quale permette l'introduzione di un fattore di ingrandimento ottico dell'oggetto da investigare.

Un oggetto di spessore infinitesimo e largo  $x_0$  viene ingrandito di un fattore M che dipende dalle distanze sorgente/oggetto (SO) e sorgente/rivelatore (SR); si definisce la magnificazione come:

$$M = \frac{x_i}{x_0} = \frac{SO}{SR} \quad (13)$$

Tale fattore può essere utilizzato per migliorare la risoluzione delle immagini radiografiche a parità di rivelatore utilizzato. A seconda della magnificazione scelta, il campo di vista (FOV) può variare da 20 mm a 2 mm con una risoluzione spaziale nominale isotropica che varia da 20  $\mu$ m/pixel a 2  $\mu$ m/pixel rispettivamente.

La camera CCD è costituita da un sensore CCD raffreddato ad alta risoluzione (1024 x 1024 pixels) connesso tramite fibre ottiche (3.7:1 riduzione dell'immagine) allo scintillatore a raggi X.

Il sistema è munito di un filtro di Alluminio di 1 mm di spessore che può essere usato al fine di minimizzare l'effetto del beam hardening, tramite posizionamento di fronte allo scintillatore.





Figura 34: Sistema micro-CT Skyscan 1072 installato presso il Laboratorio di Tecnologia Medica – Istituto Ortopedico Rizzoli.

## Parametri strutturali del tessuto osseo

In seguito alla scansione e ricostruzione del campione e dopo aver stabilito opportuni profili volumetrici, è possibile, tramite software dedicati, ottenere informazioni riguardo la caratterizzazione strutturale del tessuto osseo, eseguendo in automatico il calcolo di parametri istomorfometrici.

Le misure di solito sono effettuate tramite algoritmi dedicati. Questi, a seconda della modalità di processamento del campione solido, possono far uso di modelli 2D o 3D. Alcuni parametri possono essere calcolati esclusivamente in uno dei due metodi, 2D o 3D; altri invece, possono essere calcolati in entrambe le modalità.

Il nome dei parametri seguono due diverse nomenclature, “General Scientific” o “American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR)”, quest’ultima basata su un articolo elaborato da Parfitt nel 1987 [70].

Tutte le misure dei parametri morfometrici in 2D e 3D sono eseguiti su immagini segmentate o binarizzate. La segmentazione, anche chiamata “thresholding”, deve essere eseguita prima dell’analisi morfometrica [82].

Sono di seguito elencati alcuni dei principali parametri, classificati secondo la nomenclatura ASBMR, in riferimento alla struttura del tessuto osseo:

- Total Volume (TV), ( $mm^3$ )

Rappresenta il volume di interesse, ad esempio il volume totale soggetto all’analisi, per una ROI (region of interest) includendo sia gli spazi occupati dal materiale osseo, sia gli spazi vuoti; può essere calcolato in 2D o in 3D ed è basato sul semplice conteggio dei voxels contenuti in modello volumetrico selezionato.

- Bone Volume (BV), ( $mm^3$ )

Rappresenta la parte di volume di interesse occupata unicamente dalla materiale osseo solido; può essere calcolato in 2D o in 3D ed è basato sul conteggio dei voxels riconosciuti come materiale solido.

- Bone Volume Fraction (BV/TV), (%)

Rappresenta la percentuale di volume occupato dal materiale osseo rispetto al volume totale considerato; può essere calcolato in 2D o in 3D, semplicemente tramite il rapporto dei parametri BV e TV.

- Bone Surface (BS), ( $mm^2$ )

Rappresenta la superficie di delimitazione delle regioni di occupate dal materiale osseo solido; la misura 2D è basata sulla superficie “a passi”, è perciò affetta da inaccuratezza dovuta unicamente all’elaborazione dei perimetri delle sezioni trasversali; la misura 3D è riferita alla superficie triangolata ottenuta tramite l’algoritmo di Marching Cubes.

- Bone Specific Surface (BS/BV), (1/mm)

Rappresenta il rapporto tra la superficie e il volume del materiale osseo; è calcolato in 2D e in 3D in riferimento ai parametri BS e BV.

- Bone Surface Density (BS/TV), ( $mm/mm^2$ )

Rappresenta la densità di superficie che è il rapporto tra l’area di superficie e il volume totale di interesse; può essere calcolata in 2D o in 3D, tramite il rapporto dei parametri BS e TV.

- Trabecular Thickness (Tb.Th), (mm)

Rappresenta lo spessore delle trabecole; può essere calcolato in 2D o in 3D. Il calcolo di questo parametro tramite analisi 2D è condotto basandosi su alcune assunzioni circa l’organizzazione strutturale dell’oggetto considerato; in questo senso possono essere usati tre differenti modelli strutturali: Parallel Plate Model, Cylinder Rod Model e Sphere Model.

Nel primo caso avremo:

$$Tb.Th = 2 \frac{BV}{BS} \quad (14)$$

Nel secondo caso invece:

$$Tb.Th = 4 \frac{BV}{BS} \quad (15)$$

Ed infine, nel terzo caso:

$$Tb.Th = 6 \frac{BV}{BS} \quad (16)$$

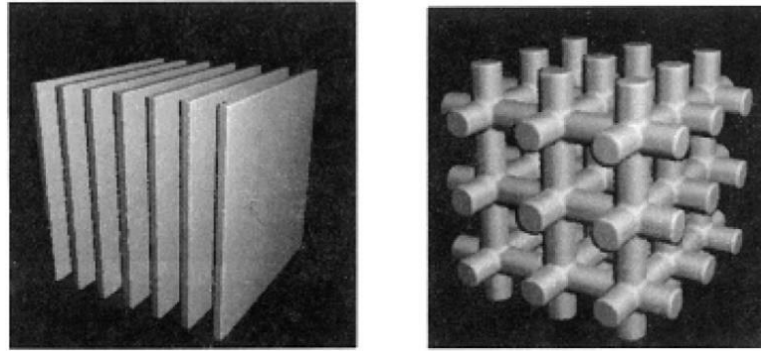


Figura 35: Esempi di una struttura ideale plate-like (sinistra) e rod-like (destra).

L'analisi 3D invece permette di derivare il parametro Tb.Th indipendentemente dal modello. La trabecular thickness infatti è definita dalla media tra tutti gli spessori locali all'interno dei voxel che costituiscono il solido considerato; lo spessore locale in un generico punto di un solido è definito come il diametro massimo della sfera contenente il punto preso in considerazione, non necessariamente il centro geometrico, ed è interamente contenuto in un volume pieno. Il software usato fornisce il valore medio di Tb.Th per l'intero campione [42].

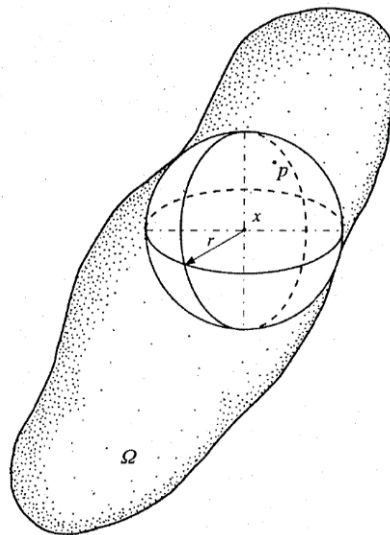


Figura 36: Sfera contenente il punto  $p$  ed avente raggio massimo, interamente contenuta nella struttura  $\Omega$ . In questo modo lo spessore locale nel punto  $p$  è uguale al diametro della sfera.

- Trabecular Separation (Tb.Sp), (mm)

Rappresenta lo spessore degli spazi interposti tra le trabecole; può essere calcolato tramite analisi 2D con i modelli Parallel Plate e Cylinder Rod, per i quali si ottengono rispettivamente le seguenti relazioni:

$$Tb.Sp = \frac{1}{Tb.N} - Tb.Th \quad (17)$$

$$Tb.Sp = Tb.Th \cdot \left\{ \left[ \left( \frac{4}{\pi} \right) \cdot \left( \frac{BV}{TV} \right) \right] - 1 \right\} \quad (18)$$

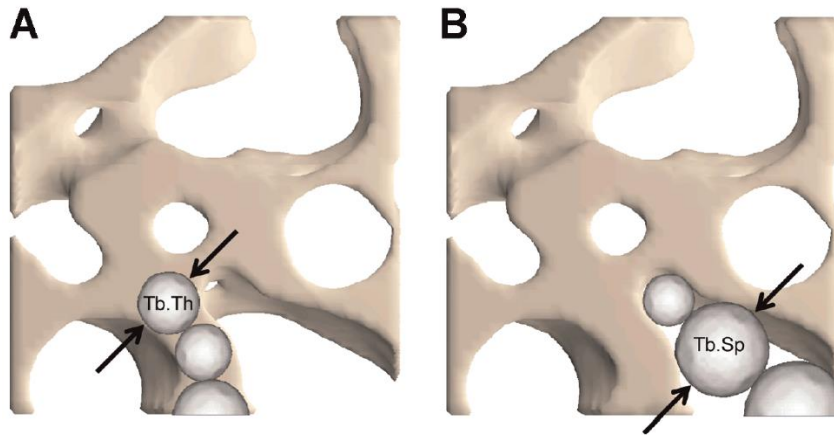


Figura 37: Rappresentazione schematica dell'algoritmo utilizzato per il metodo 3D diretto per il calcolo dello spessore (A) e della separazione (B) trabecolare. Il diametro medio delle sfere rappresenta lo spessore dell'oggetto e la deviazione standard del diametro rappresenta la variabilità nello spessore dell'oggetto.

- Trabecular Number (Tb.N), (1/mm)

È il numero di intersezioni, per unità di lunghezza, su un percorso lineare casuale all'interno del VOI, all'interno di una struttura trabecolare o solida. Viene definita dall'analisi 2D usando i modelli Parallel Plate e Cylinder Rod in accordo con le seguenti relazioni:

$$Tb.N = \frac{BV}{TV} \cdot \frac{1}{Tb.Th} \quad (19)$$

$$Tb.N = \sqrt{\left[\left(\frac{4}{\pi}\right) \cdot \left(\frac{BV}{TV}\right)\right]} \cdot \frac{1}{Tb.Th} \quad (20)$$

Anche in questo caso le difficoltà di calcolo introdotte dall'analisi 2D sono eliminate tramite un'analisi 3D. In questo caso, il numero di trabecole è definito dalla stessa equazione usata per il calcolo in 2D con l'assunzione di un modello Parallel Plate, con l'importante differenza che lo spessore dell'osso trabecolare è formato non tramite il modello ma tramite analisi 3D.

- Structure Model Index, SMI

Structure Model Index indica la prevalenza relativa di strutture rod-like o plate-like in un complesso 3D quale può essere un osso trabecolare. Lo SMI comporta una misura della convessità superficiale. Questo parametro è di grande importanza nella degradazione osteoporotica dell'osso trabecolare che è caratterizzato da una transazione da un'architettura plate-like ad una rod-like. Una lamina, un cilindro e una sfera ideali hanno valori SMI di 0, 3 e 4 rispettivamente [82]. Il calcolo per lo SMI è basato sulla dilatazione del modello voxel 3D, cioè aggiungendo artificialmente uno spessore del voxel a tutte le superfici dell'oggetto digitalizzato [42].

$$SMI = 6 \cdot \frac{(S' \cdot V)}{(S^2)} \quad (21)$$

Dove  $V$  è il volume iniziale dell'oggetto,  $S$  è l'area della superficie dell'oggetto prima della dilatazione,  $S'$  è la variazione della superficie dopo la dilatazione.

- Mean Intercept Length, MIL

L'isotropia è una misura di simmetria 3D o di presenza o assenza di un orientamento preferenziale delle strutture lungo un particolare asse direzionale.

Si consideri una regione o un volume contenente due fasi (fase solida e spazio), entrambe con una architettura complessa, come può esserlo una regione d'osso trabecolare. Possiamo quindi studiare questo volume per determinare l'isotropia. Se il volume è isotropico allora una linea che passa attraverso il volume con qualsiasi orientamento 3D produrrà un numero di intercette simile attraversando la fase solida. La figura 38 mostra la differenza nel numero di intercette in diverse direzioni attraverso un gruppo anisotropico di strutture allineate.

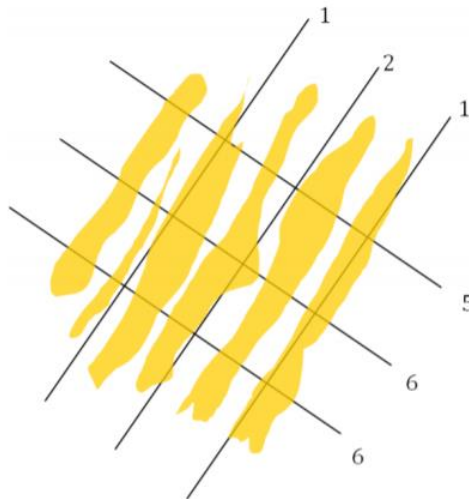


Figura 38: Un gruppo di strutture allineate ha un'alta anisotropia: linee test producono poche intercette attraverso gli oggetti solidi nella direzione dell'asse longitudinale delle strutture, ma perpendicolarmente alle strutture, le linee producono molte più intercette (il numero di intercette è mostrato per ogni linea).

L'analisi della mean intercept length misura l'isotropia. È trovata mandando diverse linee, formando una griglia equispaziata con un'orientazione  $\Theta$ , attraverso un'immagine volumetrica tridimensionale contenente oggetti binarizzati, e dividendo la lunghezza delle linee test attraverso il volume analizzato per il numero di volte,  $I$ , che la linea attraversa o intercetta parte della fase solida.

$$MIL(\theta) = \frac{L}{I(\theta)} \quad (22)$$

dove  $L$  è la lunghezza totale della linea.

Notare che in questo calcolo MIL, la lunghezza dell'intercetta può essere correlata allo spessore dell'oggetto in una data orientazione ma non lo misura direttamente.

Per l'analisi MIL, una griglia di linee test è inviata attraverso il volume per un vasto numero di angoli 3D. Il MIL per ogni angolo è calcolato come la media su tutte le linee della griglia.

Ciò richiede che venga definita dapprima una regione sferica entro cui verrà eseguita l'analisi, poiché le linee devono tutte attraversare il centro della sfera e avere una distribuzione equa delle lunghezze, ricoprendo tutti gli angoli 3D ma distribuite in maniera random.

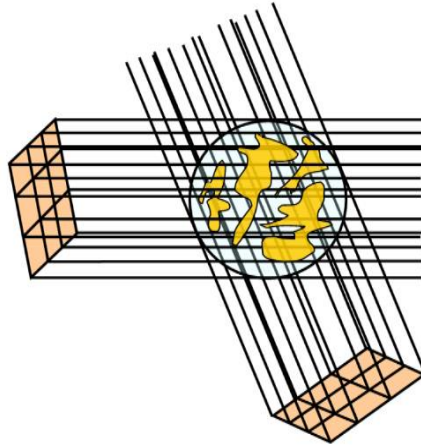


Figura 39: Per l'analisi MIL, una griglia di linee è mandata attraverso il volume per un gran numero di angoli 3D (qui ne sono mostrati solo due). Il MIL per ogni angolo è calcolato come la media su tutte le linee della griglia.

Il passo successivo prevede la visualizzazione della distribuzione 3D delle lunghezze MIL come un ellissoide. Tutte le linee sono disegnate attraversanti un punto e la lunghezza di ogni linea rappresenta la fase ossea MIL per quella linea.

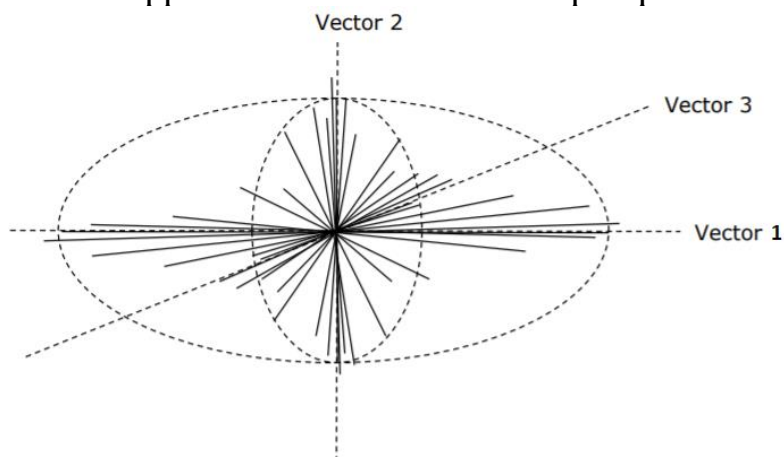


Figura 40: Un ellissoide è adattato alla distribuzione MIL 3D misurata su un range completo di angoli. Questo ellissoide è misurato statisticamente ed ha tre vettori ortogonali tra loro. Una matrice (3 X 3) di 9 autovettori descriverà le direzioni per i tre vettori.

- Degree of anisotropy, DA

L'isotropia è una misura di simmetria 3D. L'anisotropia, in opposizione all'isotropia, è un termine usato quando le proprietà della materia non sono le stesse se misurate da diverse direzioni. Nel caso di una struttura anisotropa, il plot del MIL dà un ellissoide,

nel quale gli assi principali rappresentano l'orientazione trabecolare principale. Il rapporto tra le lunghezze degli assi principali fornisce informazioni riguardo l'anisotropia della struttura, ad esempio il grado di anisotropia [33]

$$DA = \frac{\max MIL}{\min MIL} \quad (23)$$

Solitamente il valore del grado di anisotropia è 1 quando la struttura è interamente isotropica e 0 quando è interamente anisotropa.

- **Connectivity**

La connettività è definita come una misura del grado di connessione di una struttura per unità di volume [67].

In un network è la misura di quante connessioni possono essere tagliate prima che l'intera struttura collassi in due parti. L'osso trabecolare è uno di questi network e la sua densità di connettività (Conn.D) può essere calcolata dividendo la connettività stimata per il volume del campione; è molto importante perché la connettività trabecolare può contribuire in maniera significativa alla robustezza della struttura. Al fine di fornire una misura della densità di connettività, si ricorre all'analisi di Eulero, in particolare al numero di Eulero, le cui componenti sono costituite da tre numeri di Betti.

$$X(x) = B_0 - B_1 + B_2 \quad (24)$$

Questa è la formula di Eulero-Poincarè per un oggetto tridimensionale, dove  $B_0$  è il numero di oggetti,  $B_1$  è la connettività e  $B_2$  è il numero delle cavità chiuse.

- **Total Porosity, (%)**

La total porosity è il volume di tutti i pori, chiusi e aperti, espressa come una percentuale sul volume totale della VOI. Un poro chiuso in 3D è un'aggregazione connessa di voxels spaziali (nero) che è circondata da ogni lato in 3D da voxels solidi (bianco). Un poro aperto è definito come un qualsiasi spazio locato all'interno di un oggetto solido o tra oggetti solidi, che ha una qualsiasi connessione in 3D nello spazio al di fuori dell'oggetto o degli oggetti [82][67].

Abbreviation	Variable	Description	Standard unit
TV	Total volume	Volume of the entire region of interest	mm <sup>3</sup>
BV	Bone volume	Volume of the region segmented as bone	mm <sup>3</sup>
BS	Bone surface	Surface of the region segmented as bone	mm <sup>2</sup>
<b>BV/TV</b>	<b>Bone volume fraction</b>	Ratio of the segmented bone volume to the total volume of the region of interest	%
BS/TV	Bone surface density	Ratio of the segmented bone surface to the total volume of the region of interest	mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup>
BS/BV	Specific bone surface	Ratio of the segmented bone surface to the segmented bone volume	mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup>
Conn.D	Connectivity density	A measure of the degree of connectivity of trabeculae normalized by TV	1/mm <sup>3</sup>
SMI	Structure model index	An indicator of the structure of trabeculae; SMI will be 0 for parallel plates and 3 for cylindrical rods <sup>(72)</sup>	
<b>Tb.N</b>	<b>Trabecular number</b>	Measure of the average number of trabeculae per unit length	1/mm
<b>Tb.Th</b>	<b>Trabecular thickness</b>	Mean thickness of trabeculae, assessed using direct 3D methods	mm
<b>Tb.Sp</b>	<b>Trabecular separation</b>	Mean distance between trabeculae, assessed using direct 3D methods	mm
Tb.Th.SD	Standard deviation of trabecular thickness	Measure of the homogeneity of trabecular thickness, assessed using direct 3D methods	mm
Tb.Sp.SD	Standard deviation of trabecular separation	Measure of the homogeneity of trabecular separation, assessed using direct 3D methods	mm
DA	Degree of anisotropy	1 = isotropic, >1 = anisotropic by definition; DA = length of longest divided by shortest mean intercept length vector	a
MIL	Mean intercept length	Measurements of structural anisotropy	a

Tabella 4: Definizioni e descrizioni delle variabili per la caratterizzazione della microarchitettura dell'osso trabecolare [4] (a=variabile adimensionale).

## Densità minerale delle ossa e del tessuto

Anche se la  $\mu$ CT viene utilizzata principalmente per generare informazioni sulla struttura ossea, può anche essere usata per stimare la densità minerale ossea (BMD) e del tessuto (TMD).

La densità minerale è definita come la densità volumetrica di idrossiapatite di calcio (CaHA) in un tessuto biologico in  $g \cdot cm^{-3}$  e viene calibrata tramite fantocci di CaHA di densità nota, con cui vengono effettuate tipicamente due diverse misurazioni:

- La densità combinata di un volume ben definito che contiene una miscela di ossa e tessuti molli, come ad esempio un volume selezionato di osso trabecolare midollare in un femore o tibia, è misurata come “Densità minerale ossea” o BMD. Questo parametro si riferisce alla quantità di osso all’interno di una regione mista di tessuto molle-ossa, ma non fornisce informazioni sulla densità dell’osso in sé;
- La misurazione della densità limitata entro il volume di tessuto osseo calcificato, come l’osso corticale, escluso il tessuto molle circostante, è chiamata “Densità minerale del tessuto” o TMD. Al contrario del BMD, essa ci dà informazioni sulla densità dell’osso stesso e ignora i tessuti molli circostanti.

Si sottolinea che in presenza di osso trabecolare, effetti di volume parziale potranno compromettere la misura di TMD tranne che per micro-CT a risoluzioni molto alte. Come regola generale, la risoluzione dovrebbe essere tale che lo spessore delle strutture ossee risulti essere pari o superiore a 10 pixel.



# CAPITOLO 5

## Ripetibilità e accuratezza

Negli ultimi anni, l'uso dell'imaging micro-tomografico ad alta risoluzione per l'indagine della morfologia ossea trabecolare e corticale negli animali e nell'uomo è cresciuto immensamente. Attualmente sono disponibili diversi sistemi  $\mu$ CT e di conseguenza, ci sono diversi approcci per l'acquisizione e valutazione delle immagini, oltre che nell'esposizione dei risultati. Questo rende difficile l'interpretazione dei risultati e il confronto degli stessi tra diversi studi.

Fino a poco tempo fa, le tecniche istologiche quantitative erano considerate lo standard per la valutazione dell'architettura ossea trabecolare e corticale. Sebbene le analisi istologiche forniscano informazioni uniche sulla cellularità e sugli indici dinamici del rimodellamento osseo, hanno limitazioni rispetto alla valutazione della microarchitettura ossea poiché i parametri strutturali sono derivati dall'analisi stereologica di poche sezioni 2D, supponendo solitamente che la struttura sottostante sia plate-like [70]. Le tecniche di imaging 3D ad alta risoluzione, come la  $\mu$ CT, invece, misurano direttamente la microarchitettura ossea senza basarsi su modelli stereologici. Attualmente la  $\mu$ CT è considerata il *gold standard* per la valutazione della morfologia ossea e della microarchitettura nei topi e in altri piccoli modelli animali ex-vivo ed in-vivo. Gli scanner  $\mu$ CT attualmente disponibili raggiungono una dimensione isotropica del voxel pari a pochi micrometri, sufficiente per studiare strutture come le trabecole del topo che hanno una ampiezza che va dai 30 ai 50  $\mu$ m.

La precisione delle misure morfologiche  $\mu$ CT è stata valutata confrontando queste ultime con le misure tradizionali provenienti dalla istomorfometria di esemplari animali e umani. Questi studi dimostrano che le misurazioni morfologiche 2D e 3D nella  $\mu$ CT sono fortemente correlate con quelle della istomorfometria 2D. Ad esempio, Muller et al. hanno riportato correlazioni molto elevate ( $r = 0.84 - 0.92$ ) e una bassa differenza percentuale tra i due metodi nelle misurazioni di biopsie iliache umane [62]. La risoluzione delle immagini, così come la soglia usata per segmentare l'osso dal tessuto molle, influenzano questi confronti. Alcuni studi riportano che le misure  $\mu$ CT

sovrastimano lo spessore trabecolare rispetto alle misure istomorfometriche. Questa osservazione è attribuibile a più fattori: una risoluzione inadeguata delle immagini  $\mu$ CT relativa alla dimensione trabecolare, l'uso di un modello plate-like per la stima dello spessore trabecolare nella istomorfologia 2D rispetto ai metodi 3D diretti in  $\mu$ CT, una selezione inaccurata della soglia e/o il fatto che le misurazioni 3D in  $\mu$ CT dello spessore trabecolare comprendono le intersezioni trabecolari (o nodi), che tendono ad aumentare il valore dello spessore trabecolare rispetto alle misurazioni effettuate solo su montante trabecolare [11]. Tuttavia, l'alta correlazione tra le due tecniche fornisce una forte motivazione per l'utilizzo della  $\mu$ CT nel valutare la morfometria scheletrica. La  $\mu$ CT presenta numerosi vantaggi nella valutazione della massa ossea e della morfologia nei campioni asportati:

1. Permette una misura 3D diretta della morfologia trabecolare, come ad esempio lo spessore trabecolare e la separazione, piuttosto che desumere questi valori basandoci su modelli 2D stereologici come avviene con valutazioni istologiche standard;
2. Rispetto all'istologia 2D viene analizzato un volume di interesse significativamente maggiore;
3. Le misurazioni possono essere eseguite in tempi molto più rapidi rispetto alle tipiche analisi istologiche dei parametri istomorfometrici utilizzando esemplari ossei non calcificati;
4. La valutazione della morfologia ossea mediante scansione  $\mu$ CT non è distruttiva, per cui i campioni possono essere utilizzati successivamente per altre analisi, come l'istologia o prove meccaniche.
5. È possibile utilizzare scansioni  $\mu$ CT per fornire una stima della mineralizzazione del tessuto osseo confrontando l'attenuazione a raggi X nell'osso con quella standard di idrossiapatite. Questo tuttavia deve essere fatto con molta attenzione dati i vincoli della sorgente policromatica di raggi X, tipici della strumentazione da laboratorio [4].

## **Preparazione del campione e posizionamento**

I primi passi nell'acquisizione delle immagini riguardano la preparazione e il posizionamento del campione all'interno del portacampione. La preparazione del campione varia da esemplare a esemplare, mentre un concetto chiave risulta essere l'orientamento del campione all'interno dello scanner e sul supporto. Di solito i campioni sono allineati con l'asse verticale dello scanner, ma è possibile anche l'allineamento con l'asse orizzontale. Della schiuma a bassa densità (ad esempio polistirolo morbido) risulta utile per posizionare saldamente il provino nel campione perché è fondamentale che non ci sia alcun movimento durante la scansione.

## Mezzo di scansione

È possibile eseguire la scansione dei campioni in diversi mezzi, tra cui soluzione salina, etanolo; in alternativa, la scansione può avvenire in aria. Quest'ultima offre il massimo contrasto tra il campione e il mezzo circostante e può essere necessaria in determinate situazioni. Tuttavia, il mezzo di scansione influenza in modo significativo l'attenuazione dei raggi X, per cui le misurazioni in aria sono significativamente diverse da quelle in soluzione salina o etanolo. Questa osservazione porta a due raccomandazioni:

1. Ogni volta che vengono eseguite le misurazioni quantitative della densità minerale del tessuto, è opportuno scansionare gli esemplari in un mezzo liquido come acqua, soluzione salina o EtOH (Etanolo), che simuli la presenza di tessuto molle;
2. All'interno di un esperimento, occorre utilizzare lo stesso mezzo di scansione e lo stesso volume per tutti i campioni che devono essere confrontati.

## Intensità

Il contenuto informativo di un voxel dipende dal rapporto segnale/rumore (SNR), e questo dipende a sua volta dal numero di fotoni incidenti e dalla sensibilità del dispositivo rivelatore (CCD). Il numero totale di fotoni per ogni proiezione durante una scansione tomografica dipende dalla corrente del tubo ( $\mu\text{A}$ ) e dal tempo di integrazione per ogni proiezione (ms). Il tempo di integrazione e il numero di frame per proiezione influenza direttamente la durata della scansione.

## Calibrazione

La calibrazione normalmente eseguita dal costruttore riguarda la misura di un filo sottile (di solito di tungsteno) per determinare la risoluzione spaziale nel piano tramite la funzione di trasferimento di modulazione (MTF). La calibrazione dovrebbe essere eseguita regolarmente secondo le raccomandazioni dei costruttori.

Per quanto riguarda invece la calibrazione densitometrica, è necessario un fantoccio per relazionare i valori CT con un valore minerale equivalente, normalmente in milligrammi per centimetro cubo ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) di idrossiapatite di calcio (HA), ricavato a sua volta da un fantoccio a stato solido.

Un valido lavoro che indaga l'accuratezza dei parametri tridimensionali quantitativi usati in microtomografia a raggi X per descrivere le strutture ossee, è quello di Perilli et al. [73]. In questo studio è stato usato un fantoccio costruito ad hoc per valutare l'osso trabecolare, costituito da vari inserti d'alluminio ( $\mu_{Al}(30\text{ KeV}) = 3.04\text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_{osso\text{ corticale}}(30\text{ keV}) = 2.56\text{ cm}^{-1}$ ) dalla geometria nota (fili, lamine, maglie e sfere) e spessore noto, incorporati in un cilindro di polimetilmetacrilato ( $\mu_{PMMA}(30\text{ keV}) = 0.36\text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_{acqua}(30\text{ keV}) = 0.38\text{ cm}^{-1}$ ) che ben simulano le condizioni di acquisizione dell'osso trabecolare immerso nell'acqua.

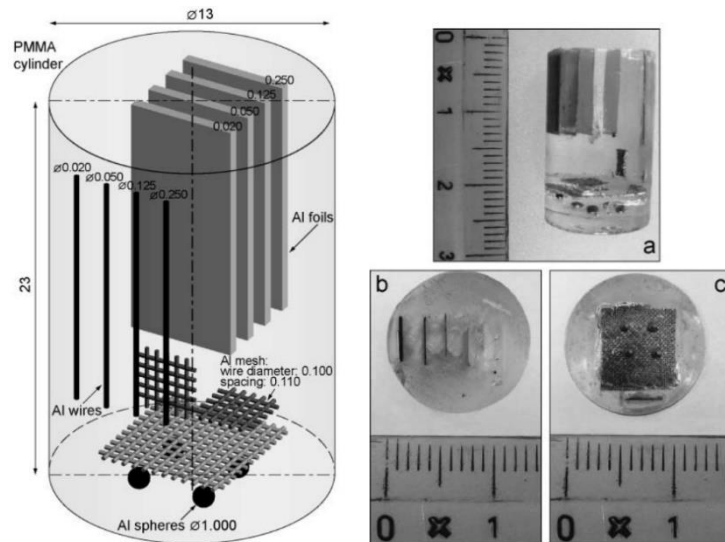


Figura 41: Schema del fantoccio con relative dimensioni degli inserti (mm) e del cilindro di PMMA (sinistra); fantoccio di calibrazione finale nelle viste frontale (a), dall'alto (b) e dal basso (c).

Il fantoccio di calibrazione è stato quindi scansionato cinque volte in giorni diversi mantenendo le stesse impostazioni di scansione e riposizionando il fantoccio ogni volta. Le piccole deviazioni standard riportate nell'immagine sottostante mostrano che i risultati erano influenzati minimamente dal riposizionamento del fantoccio nello scanner.

Object	Tb.Th*				Object	SMI		
	Nominal value ± tolerance	Tolerance (%)	Mean measured value ± SD (µm)	Error (%)		Nominal value	Mean measured value ± SD	Error
Sphere	1000 ± 50	5	1025.4 ± 4.0	2.5	Sphere	4	3.90 ± 0.05	-0.10
Foil (250 µm)	250 ± 25	10	264.5 ± 1.4	5.8	Foil (250 µm)	0	0.69 ± 0.02	0.69
Foil (100 µm)	100 ± 10	10	105.1 ± 0.8	5.1	Foil (100 µm)	0	0.28 ± 0.01	0.28
Foil (50 µm)	50 ± 7.5	15	50.3 ± 1.1	0.6	Foil (50 µm)	0	0.19 ± 0.04	0.19
Foil (20 µm)	20 ± 3	15	Not segmented		Foil (20 µm)	0	Not segmented	
Wire (250 µm)	250 ± 25	10	250.1 ± 0.7	0.04	Wire (250 µm)	3	2.88 ± 0.01	-0.12
Wire (125 µm)	125 ± 12.5	10	111.7 ± 1.5	-10.6	Wire (125 µm)	3	2.90 ± 0.01	-0.10
Wire (50 µm)	50 ± 5	10	Not segmented		Wire (50 µm)	3	Not segmented	
Wire (20 µm)	20 ± 2	10	Not segmented		Wire (20 µm)	3	Not segmented	
Mesh (small horizontal)	100 ± 10	10	89.1 ± 0.7	-10.9	Mesh (small horizontal)	3	2.66 ± 0.12	-0.34
Mesh (large horizontal)	100 ± 10	10	74.4 ± 1.0	-25.6	Mesh (large horizontal)	3	3.09 ± 0.02	0.09
Mesh (small vertical)	100 ± 10	10	100.9 ± 0.9	0.9	Mesh (small vertical)	3	2.48 ± 0.16	-0.52

Figura 42: Misure della model-independent thickness (Tb.Th\*) e structure model index (SMI) ottenute da microtomografia a raggi X sul fantoccio di calibrazione dopo 5 scansioni ripetute (dimensione pixel 15 µm).

Per completezza si riporta lo studio effettuato da Particelli et al. nel 2012 [72] sull'effetto del PMMA nelle scansioni di campioni d'osso corticale incorporate in esso seguito a quello del 2007 di Perilli et al. [74]. Sono stati effettuati confronti per la porosità corticale, il diametro e separazione del canale Haversiano tra le sezioni istologiche e le sezioni della tomografia microcomputerizzata, prima in aria e poi incorporate in polimetilmetacrilato: non sono state riscontrate differenze significative.

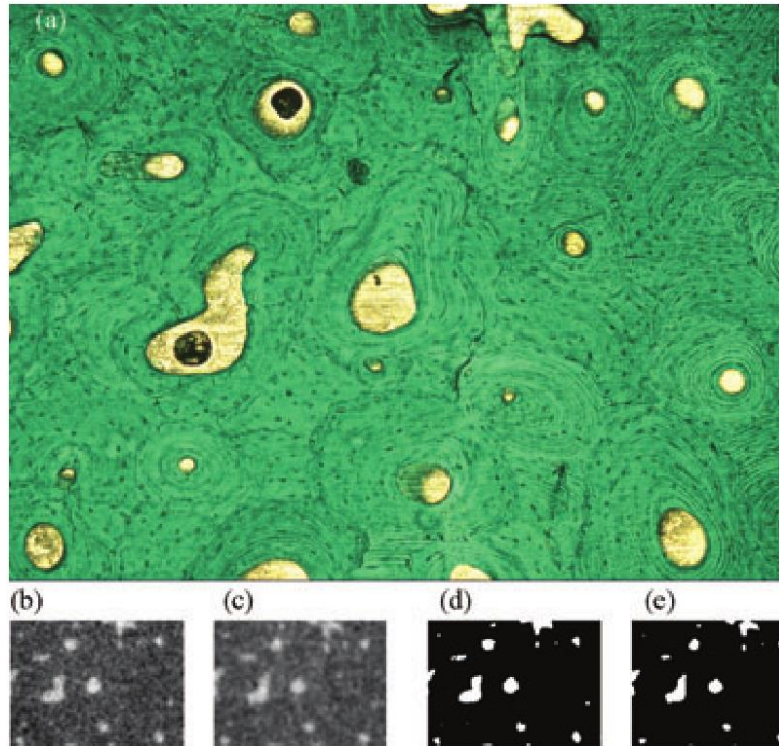


Figura 43: Immagini di una sezione (ROI 1.5 X 1 mm<sup>2</sup>). (a) Immagine ottenuta tramite istologia, (b) immagine ottenuta tramite  $\mu$ CT e acquisita in aria, (c) immagine ottenuta tramite  $\mu$ CT con campione corticale incluso in PMMA. (d) e (e) sono le corrispondenti ROI binarizzate della scansione  $\mu$ -CT in aria e con il campione incluso (osso = pixel neri).

Inoltre, per una misurazione accurata della densità minerale del tessuto TMD, in campioni di disuguali dimensioni o quantità di minerale osseo utilizzando sistemi  $\mu$ CT policromatici possiamo fare riferimento allo studio di Fajardo et al. [23].

L'obiettivo era determinare l'influenza delle differenze relative alla massa, alle dimensioni e all'algoritmo BHC usato nelle misurazioni  $\mu$ CT di densità minerale del tessuto. Si sono utilizzate (1) barre di idrossiapatite (HA) in diverse concentrazioni, (2) schiume di alluminio prodotte con precisione che simulano la struttura ossea trabecolare e (3) cubetti di osso corticale bovino (BCt).

Le misurazioni di densità equivalenti delle aste da 500, 1000 e 1500 mg di  $HA / cm^3$  diminuivano ( $r^2 > 0.96, p < 0.05$  per tutte) all'aumentare del diametro dell'asta HA nei dati BHC di 200  $mg/cm^3$ . Gli errori erano in media dell'8,2% su questi campioni e raggiungevano il 29.5%. Le analisi di regressione non hanno suggerito effetti della dimensione nei dati BHC di 1200  $mg/cm^3$ , ma le differenze tra le dimensioni successive hanno raggiunto anche il 13%. I coefficienti di attenuazione lineare delle schiume in Alluminio aumentavano fino a circa il 6% con l'aumento delle frazioni di volume ( $r^2 > 0.81, p < 0.05$  per tutti), ma l'errore correlato alle dimensioni era anche dipendente da BHC. I valori di densità equivalenti erano inversamente correlati alla dimensione del cubo BCt ( $r^2 > 0.92, p < 0.05$ ). L'uso della BHC da 1200  $mg/cm^3$  ha migliorato l'artefatto legato alla dimensione rispetto alla BHC da 200  $mg/cm^3$  ma gli errori con questa BHC erano ancora significativi e compresi tra il 5% e il 12%.

## Dimensione del voxel e risoluzione dell'immagine

Un voxel è l'unità discreta del volume di scansione che è il risultato della ricostruzione tomografica. Si tratta di un volume 3D rappresentante le due dimensioni all'interno della fetta e lo spessore della stessa. Tipicamente i voxels delle immagini  $\mu$ CT hanno tutte e tre le dimensioni uguali e pertanto sono descritti come voxels isotropici. Idealmente, la dimensione del più piccolo voxel (ossia la più alta risoluzione di scansione) è utilizzata per tutte le scansioni; tuttavia, le scansioni a risoluzione più elevata richiedono tempi di acquisizione più lunghi perché si devono raccogliere più proiezioni, generando grandi set di dati. Pertanto, il compromesso tra la dimensione del voxel e il tempo di scansione deve essere attentamente considerato. Le differenze nella dimensione del voxel (ad esempio, da 10 a 20  $\mu\text{m}$ ) hanno un piccolo effetto sulla valutazione di strutture con spessore relativamente elevato (vale a dire, dai 100 ai 200  $\mu\text{m}$ ), come l'osso corticale o trabecolare nell'uomo o nei grandi animali. Tuttavia, analizzando strutture più piccole quali trabecole di topo o ratto con dimensioni approssimativamente dai 20 ai 60  $\mu\text{m}$ , la dimensione del voxel può avere effetti significativi sui risultati. Una scansione a bassa risoluzione (dimensione voxel  $> 100 \mu\text{m}$ ) rispetto alla dimensione della struttura di interesse può essere causa di una sottovalutazione della densità minerale ossea dovuta ad effetti di volume parziale e sovrastima dello spessore dell'oggetto. In maniera generale, al diminuire del rapporto tra dimensione voxel e dimensione degli oggetti diminuisce l'errore di misura, indipendentemente dalla scala (ad esempio, dal topo all'uomo).

Infine, dovrebbe essere chiaro che la dimensione del voxel non è equivalente alla risoluzione spaziale dell'immagine  $\mu$ CT. In radiologia, la risoluzione spaziale è tipicamente riportata dalla misura della Modulation Transfer Function (MTF) [86]. Tuttavia, non esiste un approccio standardizzato per i produttori di dispositivi  $\mu$ CT nella segnalazione della risoluzione spaziale. La relazione tra la risoluzione spaziale e la dimensione del voxel dipende da diversi fattori: assorbimento medio del campione, rumore del rilevatore, algoritmo di ricostruzione, dimensione e forma del focal spot e geometria di scansione. Si dovrebbe pertanto riportare la risoluzione isotropica nominale o la dimensione del voxel isotropico per intendere che questa non è la vera risoluzione spaziale.

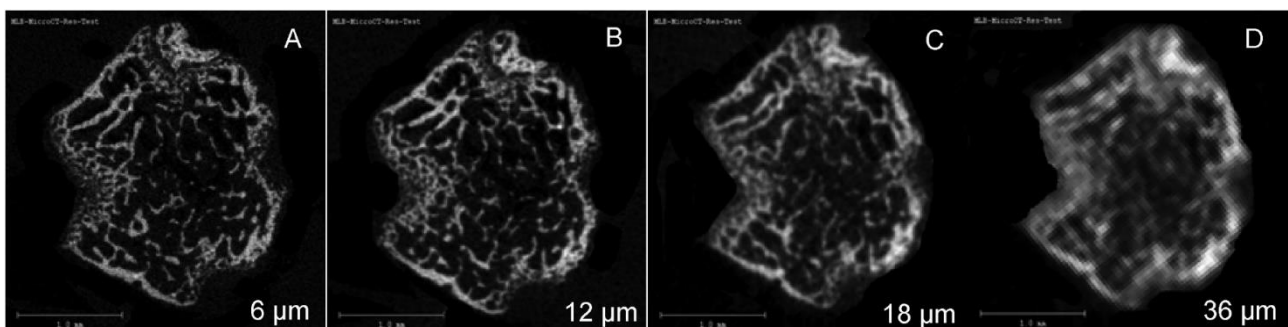


Figura 44: Effetto della dimensione del voxel sulla qualità dell'immagine. Immagini 2D in scala di grigi del femore distale di un topo adulto scansionato con dimensione voxel di (A) 6  $\mu\text{m}$ , (B) 12  $\mu\text{m}$ , (C) 18  $\mu\text{m}$ , (D) 36  $\mu\text{m}$ .

Uno studio per valutare l'effetto della dimensione del voxel sull'accuratezza della ricostruzione 3D e ripetibilità dei dati provenienti da CT cone beam è quello svolto da parte del gruppo di Maret [55] su 10 mandibole umane che ha mostrato differenze trascurabili nelle misure per dimensioni voxel fino a 200  $\mu\text{m}$ , sebbene fosse presente una leggera tendenza alla sottovalutazione, la quale, oltre i 300  $\mu\text{m}$ , diventava statisticamente rilevante.

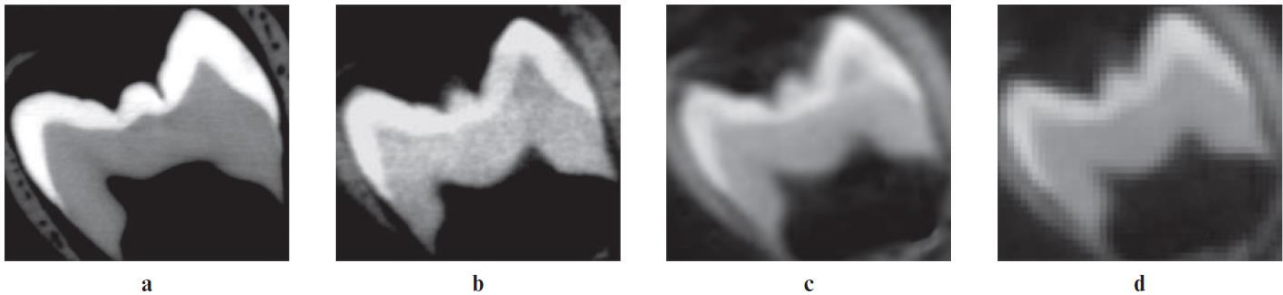


Figura 45: Lo stesso dente è visualizzato con un voxel size di (a) 41  $\mu\text{m}$ , (b) 76  $\mu\text{m}$ , (c) 200  $\mu\text{m}$ , (d) 300  $\mu\text{m}$ .

Lo studio effettuato dal gruppo di Cooper et al. [13] si è occupato di indagare l'effetto della dimensione del voxel sull'analisi tridimensionale della porosità corticale. Nelle immagini sottostanti è possibile apprezzarne le differenze.

Il confronto visivo delle immagini 2D ha dimostrato qualitativamente che l'ingrandimento della scansione aveva un impatto considerevole. Il massimo ingrandimento della scansione ha fornito i dettagli più nitidi e, con l'aumentare delle dimensioni del voxel, le immagini sono diventate progressivamente distorte (figura 46). In contrasto, il dettaglio è stato mantenuto fino alla dimensione del voxel più grande (40  $\mu\text{m}$ ) nelle immagini degradate artificialmente. Il rendering 3D ha dimostrato lo stesso schema generale, con dettaglio ridotto, perdita della continuità 3D nei canali e la crescente presenza di rumore al diminuire dell'ingrandimento della scansione. Di nuovo, i set di dati generati artificialmente sono risultati nel rendering 3D relativamente migliori rispetto ai corrispondenti dataset di scansione effettivi e gli effetti negativi di pixellazione non erano particolarmente evidenti fino alla dimensione del voxel pari a 40  $\mu\text{m}$ .

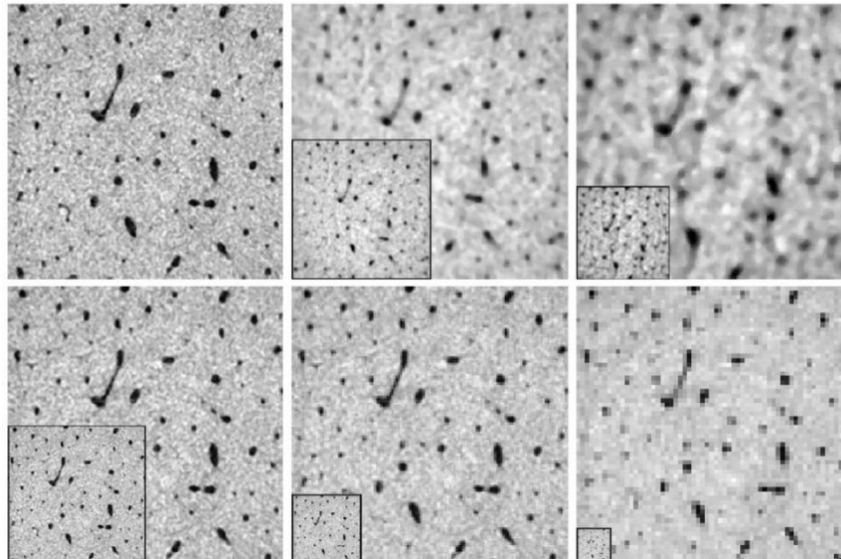


Figura 46: Sezioni 2D micro-CT rappresentative con ingrandimenti abbinati (in scala senza interpolazione). L'inserto in basso a sinistra rappresenta le dimensioni dell'immagine originale rispetto a 5  $\mu\text{m}$  dell'immagine scansionata. Set di dati scansionati lungo la riga superiore: dimensioni voxel 5 (sinistra), 10 (centro) e 15 (destra)  $\mu\text{m}$ . Dataset artificialmente degradati riga in basso: dimensioni voxel 10 (a sinistra), 20 (al centro) e 40 (a destra)  $\mu\text{m}$ .

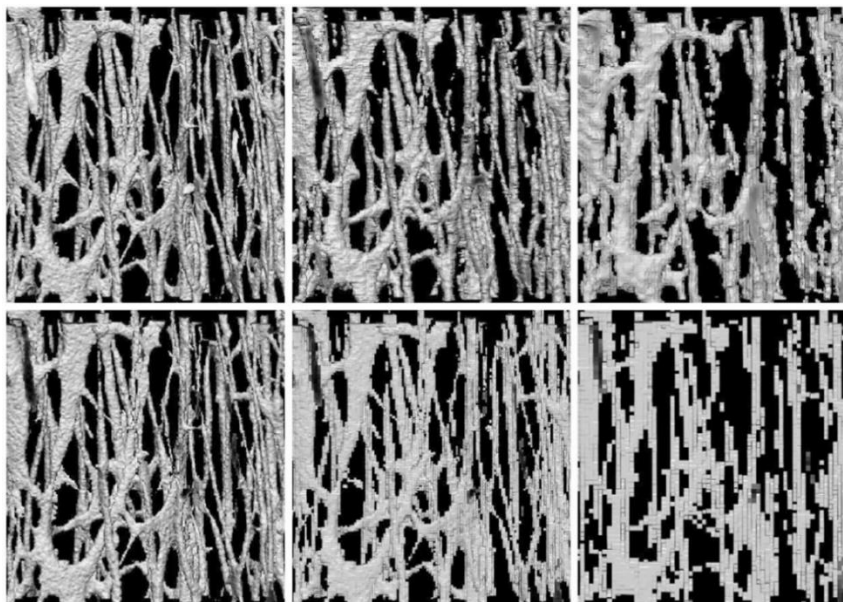


Figura 47: Rendering 3D rappresentativo di un sottovolume di 1000  $\mu\text{m}$  di spessore (orientata longitudinalmente). Set di dati scansionati lungo la riga superiore: dimensioni voxel 5 (sinistra), 10 (centro) e 15 (destra)  $\mu\text{m}$ . Dataset artificialmente degradati riga inferiore: dimensioni voxel 10 (sinistra) 20 (centro) e 40 (a destra)  $\mu\text{m}$ .

## Regione di interesse

Quando si imposta l'acquisizione di scansione, è fondamentale assicurarsi che una quantità sufficiente del campione venga scansionata per avere affidabilità e ripetibilità nelle misure morfologiche e di densità. Il punto di partenza dovrebbe essere definito come una distanza assoluta (millimetri) o relativa (percentuale) da un punto di riferimento ripetibile, ad esempio il plateau prossimale tibiale, il piano di



accrescimento metafisiario, la diafisi mediana, o un altro sito anatomico adatto. La dimensione della regione di scansione dovrebbe essere definita come la distanza (ad esempio, prossimale o distale) da quel punto di partenza. Le distanze devono essere segnalate in unità SI (millimetri o micrometri); il numero di fette può essere determinato facilmente conoscendo la dimensione del voxel.

La valutazione dell'osso trabecolare richiede una ROI adatta, prestando particolare attenzione alle ROI che si estendono nella diafisi di ossa lunghe (composte soprattutto da osso corticale). L'estensione eccessiva della ROI nella diafisi diminuirà la frazione relativa del volume osseo medio simulando una ROI contenuta nella regione metafisaria. Per rappresentare l'architettura ossea trabecolare con precisione, la ROI dovrebbe contenere almeno dalle tre alle cinque lunghezze intertrabecolari.

Nelle diafisi mediane, le misurazioni dello spessore corticale 3D devono basarsi su ROI più lunghe dello spessore della corteccia; altrimenti lo spessore sarà sottovalutato. (Misure di spessore corticale con il modello plate-like non sono soggette a questa restrizione.) È importante che l'intero campione si inserisca all'interno della regione scansionata.

Un'altra questione importante riguarda la definizione della ROI quando si confrontano esemplari ossei di varia grandezza. L'obiettivo consueto è quello di scegliere una ROI anatomicamente e biomeccanicamente paragonabile tra esemplari. A volte può essere più appropriato definire la ROI come percentuale di lunghezza ossea o tramite punti di riferimento facilmente identificabili piuttosto che tramite una dimensione costante.

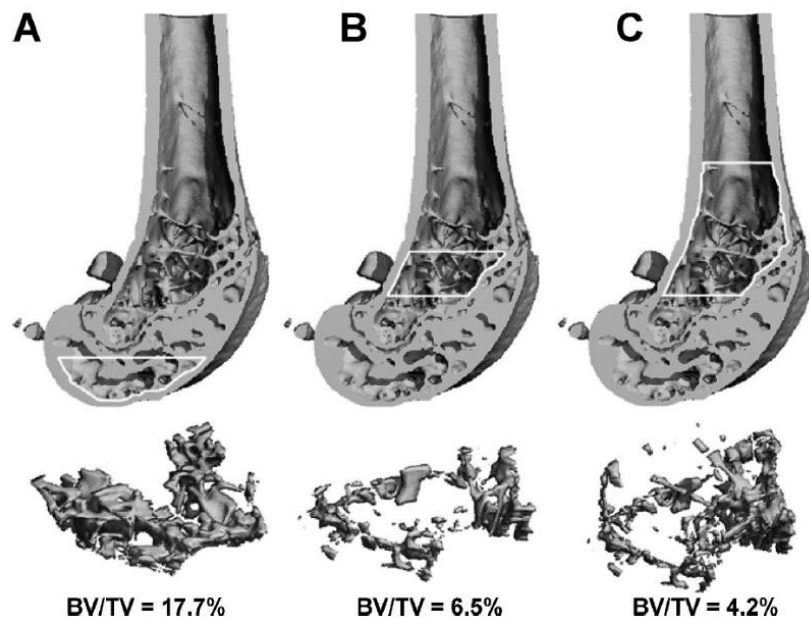


Figura 48: Influenza del volume di interesse sul BV/TV trabecolare nel femore distale di topi C57BL/6 femmine di 24 settimane. La valutazione dell'osso trabecolare epifisario (A) produrrà un BV/TV tipicamente più alto rispetto alla valutazione dell'osso trabecolare metafisario (B, C). Allo stesso modo, un volume di interesse limitato all'osso trabecolare metafisario vicino alla piastra di accrescimento (B) produrrà un BV/TV più alto rispetto ad un ROI maggiore che include una grande quantità di "spazio vuoto" nella diafisi che contiene poche trabecole (C) [12].

## Filtraggio

I dati  $\mu$ CT ricostruiti includono intrinsecamente il rumore che dovrebbe essere ridotto filtrando e mantenendo allo stesso tempo un forte contrasto tra ossa e midollo. La rimozione del disturbo nell'immagine viene eseguita al meglio da un filtro passa-basso che essenzialmente offusca l'immagine. Il miglioramento dei bordi richiede un filtro passa-alto, tuttavia questo potrebbe causare un aumento del rumore. Generalmente, un filtro gaussiano riesce a bilanciare bene questi obiettivi in competizione, è facile da implementare ed è veloce anche per grandi set di dati. È forse il filtro più comunemente usato, ma altre opzioni come il filtraggio mediano forniscono buoni risultati. In alternativa, esempi di filtri che preservano i bordi includono il filtro anisotropico di diffusione e filtro Laplace-Hamming.

Per un filtro gaussiano, i parametri chiave sono le dimensioni del kernel Gaussiano discreto (finestra) e la deviazione standard ( $\sigma$ ). Spesso un supporto di uno o due voxel (ad esempio una finestra  $3 \times 3 \times 3$  o  $5 \times 5 \times 5$  rispettivamente) e una deviazione standard tra 0.5 e 2.0 sarà sufficiente a seconda del rumore e delle dimensioni del voxel, ma ogni applicazione avrà diversi requisiti.

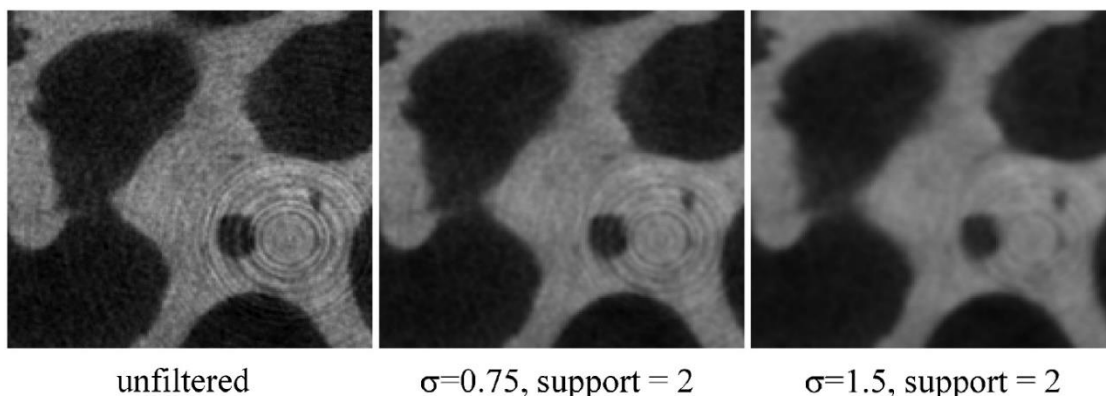


Figura 49: Effetto della filtrazione gaussiana sulla chiarezza e sul contrasto dell'immagine. Con l'aumentare della larghezza del filtro gaussiano, il rumore viene ridotto e anche gli artefatti ad anello possono essere rimossi. Le immagini tuttavia risultano sfuocate e il contrasto ridotto [83].

## Segmentazione

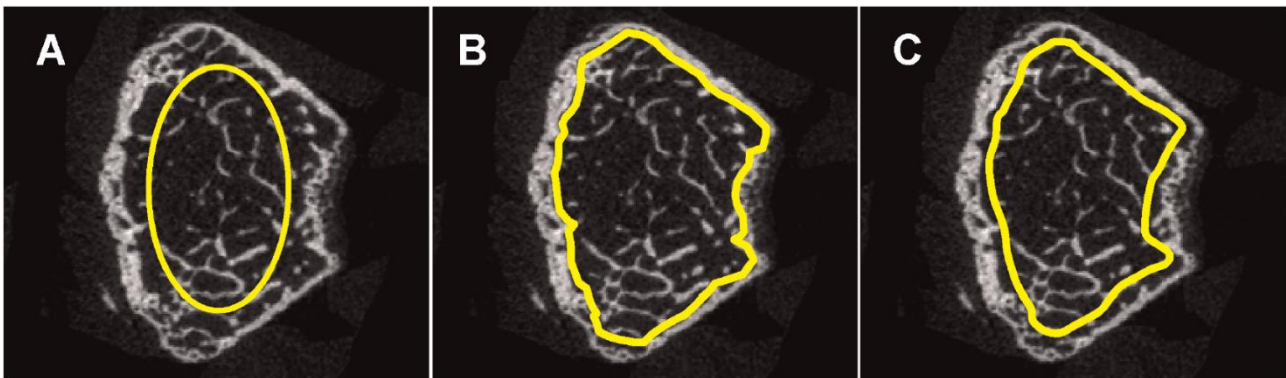
Il processo di segmentazione è un passo fondamentale nell'analisi e comporta generalmente la separazione delle strutture mineralizzate da quelle non mineralizzate per la successiva analisi quantitativa. Un errore in questa fase avrà un impatto sistematico su tutti i risultati successivi. È essenziale confrontare le immagini 2D originali con quelle segmentate per alcune (se non tutte) scansioni  $\mu$ CT al fine di assicurare che l'osso estratto sia una buona rappresentazione della struttura effettiva. Fallire in questo può causare errori nell'interpretazione dei dati morfometrici, si potrebbe infatti riportare un volume osseo trabecolare o connettività alterati quando i cambiamenti apparenti sono un artefatto dovuto alla segmentazione inesatta.

Un problema importante nella segmentazione riguarda il metodo utilizzato per definire l'area in ciascuna fetta da includere per la segmentazione e per le successive misurazioni morfologiche.

L'approccio più semplice è quello di creare un'area circolare costante o rettangolare che catturi tutto l'osso di interesse. Questo approccio non consente tuttavia la separazione tra osso corticale e osso trabecolare e lo spazio extra incluso nella zona esterna della struttura ossea preclude un calcolo accurato della frazione del volume osseo (BV/TV) e altri parametri morfologici.

Contorni più precisi per regioni ossee specifiche, corticali e trabecolari, sono quindi tipicamente garantiti e possono essere ottenuti manualmente fetta per fetta tramite algoritmi automatizzati.

Ci sono diversi approcci per delineare la regione trabecolare, ad esempio una ROI uniforme, un contorno anatomico irregolare adiacente alla superficie endocorticale, o un contorno anatomico irregolare lontano pochi pixel dal confine endocorticale.



*Figura 50: Metodi di contornatura usati per delineare la regione d'osso trabecolare. La figura mostra tre differenti approcci per identificare la regione di interesse di osso trabecolare: (A) regione di interesse di forma regolare, uniforme, (B) regione di interesse anatomica, irregolare, adiacente il contorno endocorticale, disegnata usando un algoritmo automatico, e (C) regione di interesse anatomica, irregolare, disegnata manualmente restando pochi voxel lontano dalla superficie endocorticale.*

Una volta identificata la regione da analizzare, ci sono diverse opzioni per la segmentazione, tutte hanno l'obiettivo generale di estrarre una rappresentazione "fisiologicamente e anatomicamente accurata" del tessuto osseo (vale a dire, simile all'istologia). L'approccio più semplice è quello di utilizzare una soglia globale che estragga tutti i voxels dai dati  $\mu$ CT superiori ad un dato valore di densità. Il vantaggio di utilizzare una soglia globale è che è efficiente e richiede l'impostazione di un solo parametro. In pratica, la soglia è spesso impostata utilizzando o un valore di densità fisso o una percentuale nel range di valori.

In alcuni casi, è necessario utilizzare una segmentazione più sofisticata, comprese soglie specifiche per ogni campione e/o metodi di segmentazione locale, dove l'inclusione di ogni voxel si basa sui suoi vicini.

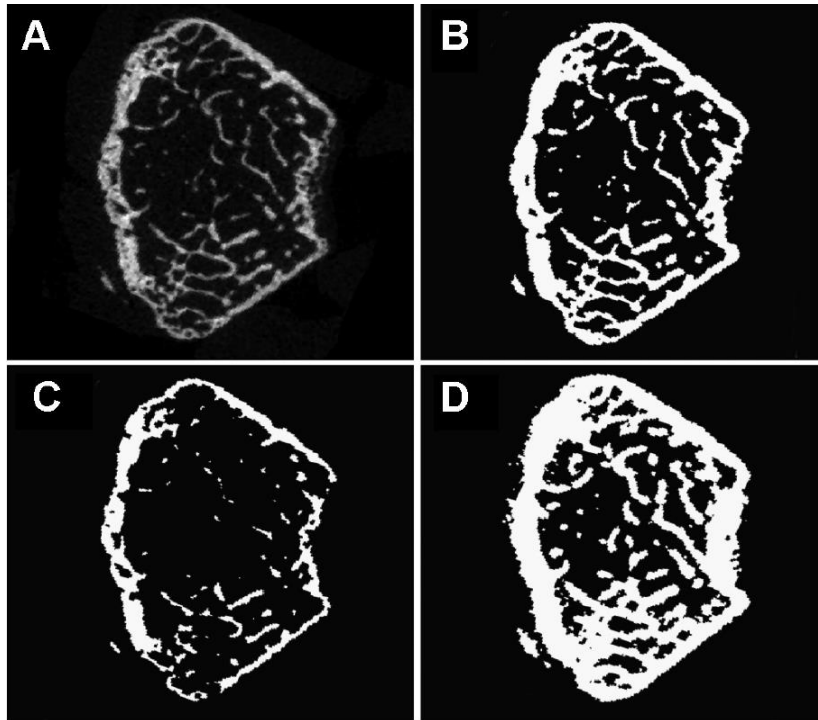


Figura 51: Effetto della differente sogliatura sulla segmentazione dell'immagine. (A) originale, immagine non segmentata di un femore distale di topo. (B) Immagine correttamente segmentata che mostra una binarizzazione ragionevole della struttura ossea. (C) Immagine segmentata con un valore di soglia troppo alto tale da perdere informazioni riguardo le strutture chiave del tessuto osseo o sono rese troppo sottili rispetto a quelle presenti nell'immagine originale non segmentata. (D) Immagine segmentata con un valore di soglia troppo basso tale da rendere le strutture ossee troppo spesse rispetto all'immagine originale non segmentata. Una segmentazione accurata richiede una ispezione visiva ed un confronto tra immagini binarizzate 2D e 3D con l'immagine originale in scala di grigi. Immagini acquisite a 70kV, 114 mA, 200 ms come tempo di integrazione.

Il tracciamento manuale della ROI da parte dell'uomo è stato esercitato a lungo ed è, ad ora, il metodo più semplice disponibile per la segmentazione delle immagini cliniche. Lo svantaggio maggiore della segmentazione manuale è la variabilità intra e interpersonale che la rende un metodo poco ripetibile. Questo metodo è inoltre molto laborioso e implica più tempo di altre tecniche di segmentazione disponibili.

Il metodo di sogliatura basata sulla selezione visiva dell'intensità nell'istogramma ha un gran effetto sulla ripetibilità e accuratezza, inoltre è spesso utilizzato un singolo livello di soglia e questo limita la sua applicabilità su regioni anatomiche a diverso contrasto come nelle ossa lunghe.

Lo studio effettuato dal gruppo di E. Nagele [64] è stato progettato proprio al fine di indagare l'impatto del riposizionamento (ripetibilità), scelta del volume di interesse (VOI) (spostamento), e parametri di scansione su campioni asportati d'osso trabecolare umani. Il gruppo di K. Rathnayaka [76] invece ha quantificato l'accuratezza di tre metodi di segmentazione, due basati sulla sogliatura dell'intensità e l'altro sulla *Canny edge detection*.

In aggiunta alla grande ripetibilità, il vantaggio della *edge detection* è che considera i cambiamenti locali di intensità in una piccola regione, ideale per la segmentazione di un oggetto con differenti contrasti in differenti regioni. Una pecca di questo metodo è la sensibilità agli artefatti e abbastanza spesso, i cambiamenti di intensità dovuti al rumore sono erroneamente rivelati come bordi. Tecniche di segmentazione

automatiche utilizzano *fuzzy logic* e *artificial neural network*. Il vantaggio delle tecniche completamente automatizzate è l'intervento minimo dell'utente con conseguenti minori inaccuratezze dipendenti da esso.

Il confronto su tutti i modelli ossei del contorno esterno generati dai dati CT, rispetto ai modelli di riferimento, ha mostrato che gli errori associati ai modelli basati su più soglie erano i più bassi (0.18 mm), mentre il metodo basato su soglia singola aveva gli errori più grandi (0.24 mm). Statisticamente, era evidente una differenza significativa tra i metodi a soglia singola e multi-soglia ( $p = 0.041$ ), mentre non c'era alcuna differenza tra soglia singola e metodo *Canny edge detection* ( $p = 0.262$ ).

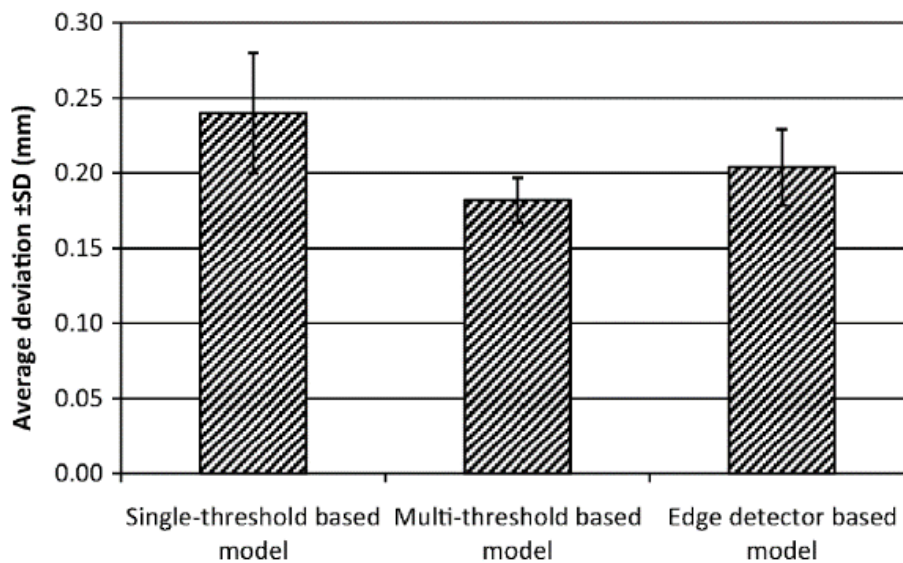


Figura 52: Confronto tra modelli di superficie corticale esterna con i modelli di riferimento.

Quando diverse regioni anatomiche dei modelli CT sono state confrontate con le corrispondenti regioni dei modelli di riferimento, i modelli basati su più soglie hanno fornito precisioni comparabili per la regione prossimale (0.14 mm), diafisi (0.13 mm) e regione distale (0.11 mm) mentre la testa del femore e la regione articolare distale presentava errori più alti (0.19 mm e 0.30 mm). In termini di statistiche, differenze significative erano presenti tra le regioni articolari prossimali, diafisi, distali e distali del modello multi-soglia rispetto a corrispondenti regioni del modello a soglia singola ( $p = 0.018$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$  e  $p = 0.036$  rispettivamente). Per il prossimale ( $p = 0.001$ ) e distale ( $p < 0.001$ ), anche i modelli basati su più soglie erano significativamente più accurati rispetto ai modelli generati con filtro *Canny*.

Il metodo *Canny edge detection* e il metodo a soglia singola hanno presentato errori simili per tutte le regioni tranne la diafisi, per la quale il metodo *Canny* era significativamente ( $p = 0.001$ ) più preciso. Con il metodo *Canny* la regione diafisaria ha generato una deviazione media di 0.09 mm risultando più preciso rispetto alle altre regioni degli stessi modelli ossei e alla regione diafisaria di modelli generati usando gli altri due metodi di segmentazione.

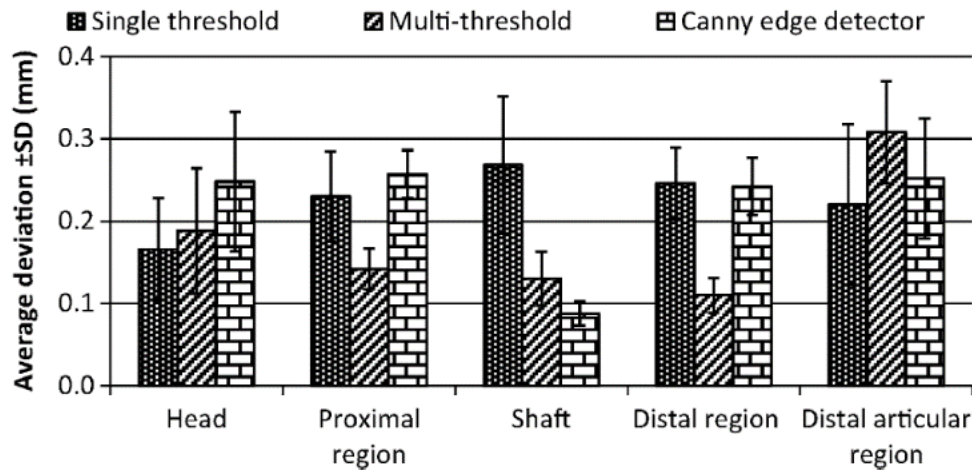


Figura 53: Confronto tra differenti regioni anatomiche dei modelli ricostruiti con il modello di riferimento.

Per tutti i modelli ossei, il metodo a più soglie ha generato i modelli più precisi (errore medio 0.18 mm) seguito dal filtro *Canny* (errore medio di 0.20 mm), mentre il metodo a singola soglia è risultato il meno accurato (errore medio 0.24 mm). Sebbene ci sia una differenza significativa tra la precisione dei metodi a soglia singola e multipla, la grandezza dell'intervallo 0.18-0.24 mm è considerevolmente piccola. Anche per il modello meno accurato generato con un approccio a soglia singola, l'errore medio di 0.30 mm è ancora al di sotto della risoluzione di scansione CT di 0.38 mm × 0.38 mm × 0.5 mm.

Per quanto riguarda la ripetibilità dei metodi di segmentazione, l'approccio del filtro *Canny* ha generato differenze molto piccole tra gli errori medi per le tre ripetizioni di segmentazione dello stesso osso. Dall'altra parte, il metodo a soglia singola ha mostrato la maggiore variabilità con errori medi nell'intervallo 0.23-0.30 mm.

Anche il metodo multi-soglia ha dimostrato un'elevata ripetibilità.

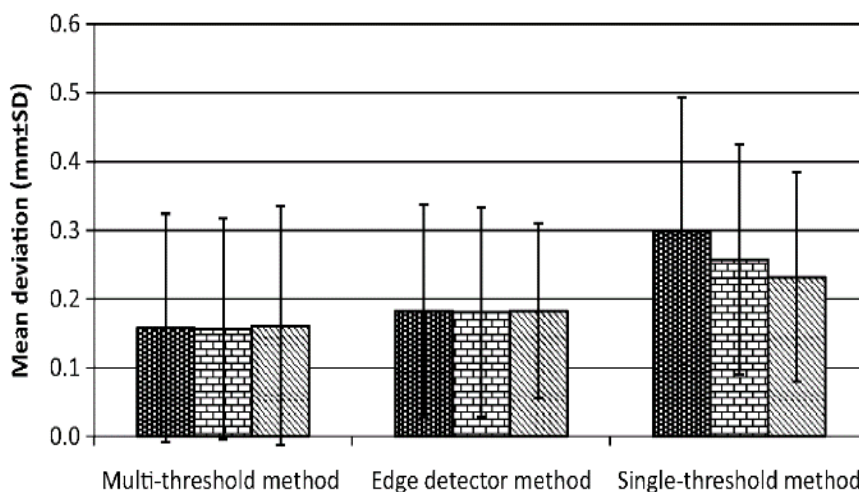


Figura 54: Confronto dei modelli generati tramite ripetizione dello stesso metodo di segmentazione sullo stesso campione.

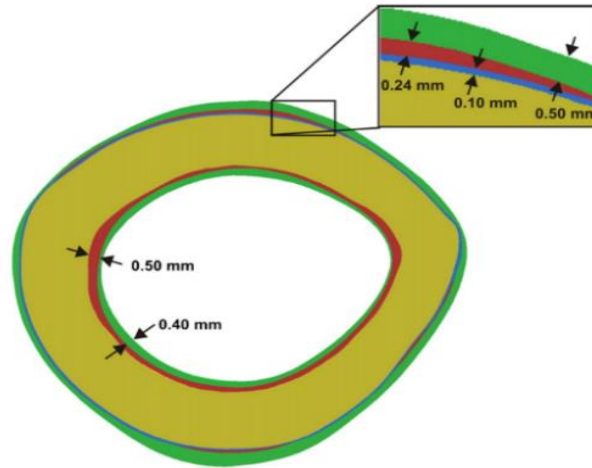


Figura 55: Sezione trasversale del fusto femorale che mostra le differenze geometriche tra modelli 3D ricostruiti tramite i diversi metodi di segmentazione: CT a soglia singola (verde), edge detection CT (rosso), micro-CT (giallo) e modelli di riferimento (blu). Le frecce mostrano la differenza tra due modelli in quel punto.

Uno studio simile è stato effettuato dal gruppo di P. E. Palacio-Mancheno [69] sulla tibia di ratto al fine di valutare gli effetti della risoluzione e del metodo di soglia utilizzato sulle misure di porosità corticale e sulla TMD. I risultati hanno evidenziato la risoluzione come principale fonte di variazione ed aveva influenza su tutti i parametri studiati.

## Parametri e metodi di indagine a confronto in merito a ripetibilità e accuratezza.

I PE (Precision Error) sono stati definiti per caratterizzare al meglio la ripetibilità di una data tecnica di misurazione ossea. In questo approccio, la precisione di un soggetto ( $SD_j$ ) è definita come la deviazione standard di  $n$  misurazioni ripetute su uno stesso soggetto  $j$ . I PE possono essere espressi come valori assoluti o come coefficienti di variazione ( $\%CV_j$ ) di misure ripetute su base percentuale.

Poiché solo le varianze individuali misurate ( $SD_j^2$ ) possono essere considerate come stime imparziali del parametro  $\sigma^2$  di una distribuzione normale Gaussiana, queste varianze individuali devono essere mediate aritmeticamente per ottenere gli errori di precisione quadratici della tecnica,  $SD^2$  e  $\%CV^2$ , rispettivamente.

$$SD = \sqrt{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^{n_j} \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{df}} \quad (25)$$

$$\%CV = \sqrt{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^{n_j} \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{df \cdot x_j^2}} \cdot 100\% \quad (26)$$

Il risultato della  $i$ -esima misura per il soggetto  $j$  è  $x_{ij}$ , e  $\bar{x}_j$  è la media di tutte le  $x_{ij}$  per il soggetto  $j$ . Il numero totale di gradi di libertà ( $df$ ) per una tecnica è la somma dei gradi di libertà ( $df_j$ ) delle misure nei soggetti singoli:

$$df = \sum_{j=1}^m df_j = \sum_{j=1}^m (n_j - 1) \quad (27)$$

In sintesi, possiamo scrivere:

$$PE_{SD} = \sqrt{\sum_{j=1}^m \frac{SD_j^2}{m}} \quad (28)$$

$$PE_{\%CV} = \sqrt{\sum_{j=1}^m \frac{\%CV_j^2}{m}} \quad (29)$$

Per determinare quanto siano precisi i valori di PE, sono anche determinati gli intervalli di confidenza, CI, per ciascuno dei valori di  $PE_{\%CV}$ . La stima corretta del 95% di CI non è dato da  $\pm 2$  volte la SD osservata di tutti i PE dei soggetti singoli.

Dal momento che il PE non può diventare negativo ma non ha limite superiore, il CI deve essere asimmetrico. Per questo, viene usata la distribuzione chi-quadro ( $\chi^2$ ). Questa distribuzione è asimmetrica e dipende dal numero totale di gradi di libertà ( $df$ ). La formula per  $(1 - \alpha) \cdot 100\%$  CI del vero errore di precisione  $\sigma$  è la seguente:

$$\frac{df}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}, df}} \%CV^2 < \sigma^2 < \frac{df}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}, df}} \%CV^2 \quad (30)$$

Un altro termine solitamente usato in studi di ripetibilità è il coefficiente di correlazione intraclasse (ICC).

ICC è definito come il rapporto tra la varianza intersoggettiva e la variazione della popolazione. I valori di ICC variano tra 0 e 1, dove 1 rappresenta la ripetibilità perfetta. Il modello ICC, scelto per uno studio di ripetibilità con misurazioni ripetute, è il two-



way mixed model. Questo modello assume che i soggetti siano selezionati casualmente, che questi siano misurati con un numero fisso di ripetizioni e che queste ripetizioni siano le uniche di interesse. L'ICC può essere calcolato come segue:

$$ICC = \frac{F_0 - 1}{F_0 + (n - 1)} \quad (31)$$

dove  $F_0$  è il rapporto tra i quadrati medi dei soggetti rispetto al residuo dei quadrati medi all'interno del soggetto e  $n$  è il numero di ripetizioni.

Il gruppo di Nishiyama [65] ha indagato la ripetibilità nelle misure ossee della tibia di due ceppi (BL6, C3H) di topi e un ceppo di ratti con un sistema microtomografico in-vivo analizzando l'impatto della 3D registration sulla stessa ripetibilità.

La ripetibilità di misure in vivo è influenzata da errori come il movimento, il riposizionamento all'interno dello scanner e la selezione della regione di interesse. Sebbene un operatore esperto di  $\mu$ CT possa minimizzare questi errori, possono essere realizzati ulteriori miglioramenti attraverso l'uso completamente automatizzato della registrazione 3D delle immagini per facilitare il riposizionamento e la selezione della ROI, oltre che per pareggiare la ripetibilità degli operatori con diversi livelli di abilità e tra diversi laboratori.

La ripetibilità è stata determinata per ciascun animale sia prima che dopo la registrazione. Per i ratti, i risultati includono un errore di precisione nel BV/TV del 5.46%, nel Ct.Th dell'1.97%, e nel TMD del 2.00%. Per i topi BL6, gli errori di precisione erano del 3.00% (BV/TV), 0.95% (Ct.Th), e 0.94% (TMD), e per i topi C3H 2.68% (BV/TV), 1.52% (Ct.Th) e 1.72% (TMD). Dopo la registrazione dell'immagine c'è stato un significativo miglioramento nella ripetibilità della maggior parte dei parametri per i ratti.

In generale, i parametri metrici come il BV/TV avevano una migliore ripetibilità rispetto ai parametri non metrici di densità di connettività e indice del modello di struttura con errori di precisione più elevati e ICC inferiori rispetto ad altri parametri morfologici e questo è a causa della sensibilità alla risoluzione dell'immagine e al rumore intrinseco del sistema di acquisizione.

A conferma di quanto detto sulla sensibilità alla risoluzione delle misure microtomografiche si cita il lavoro di Kohler et al. [50] con i risultati nella tabella sottostante.

	BV/TV (%)	$R^2$	Tb.Th (mm)	$R^2$	Tb.Sp (mm)	$R^2$	Tb.N ( $\text{mm}^{-1}$ )	$R^2$	Conn.D ( $\text{mm}^{-3}$ )	$R^2$
10 $\mu\text{m}$	21.089		0.071		0.227		4.279		96.779	
20 $\mu\text{m}$	21.099	0.99	0.072	0.91	0.225	0.99	4.410	0.99	82.723	0.98
30 $\mu\text{m}$	21.063	0.99	0.075	0.96	0.229	0.99	4.424	0.98	72.584	0.91
40 $\mu\text{m}$	21.101	0.98	0.079	0.34	0.233	0.95	4.328	0.98	56.225	0.64

$R^2$  values, correlation to 10  $\mu\text{m}$  results (taken as the gold standard)

Tabella 5: Dipendenza dalla risoluzione dei parametri strutturali nell'osso trabecolare.

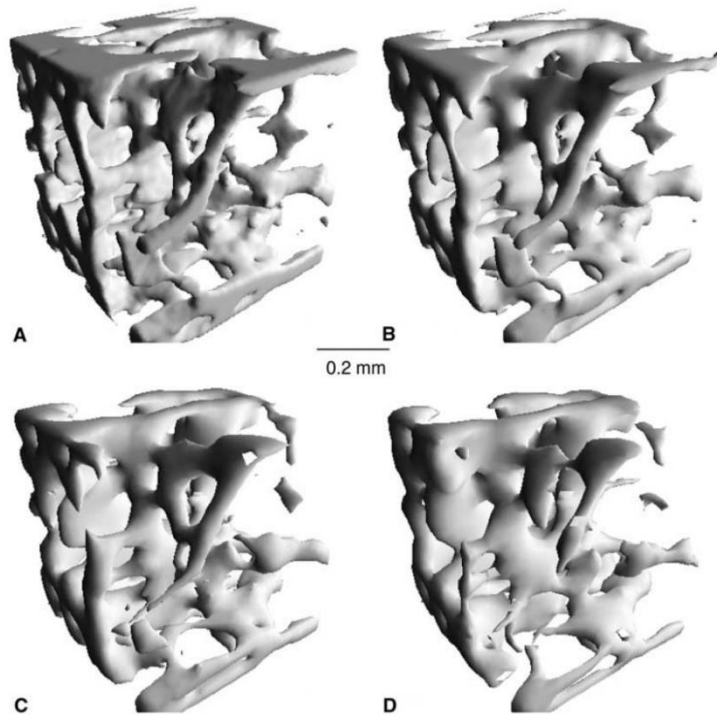


Figura 56: Effetto della dipendenza dalla risoluzione sulla struttura trabecolare dell'osso. A) Immagine originale misurata con una risoluzione voxel di 10  $\mu\text{m}$ . B)-D) Struttura trabecolare con dimensione voxel ridotta digitalmente a 20, 30 e 40  $\mu\text{m}$ , rispettivamente.

Dall'analisi della dipendenza dalla risoluzione, si è evinta una forte influenza sul parametro Conn.D. con una differenza pari al 14.5% nel calcolo dello stesso per risoluzioni a 10 e 20  $\mu\text{m}$ . La forte sensibilità e dipendenza di questo parametro dalla risoluzione e grandezza del VOI si è evinta anche nello studio più recente di Besler e colleghi [3].

I cambiamenti per BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N sono risultati piccoli, variando dallo 0.05% per il BV/TV allo 3.1% per il Tb.N. Tuttavia, tutti i parametri strutturali erano altamente correlati per le immagini a risoluzioni di 10 e 20  $\mu\text{m}$ .

I valori di  $PE_{\%CV}$  nelle analisi ripetute erano molto bassi e variavano dallo 0.06% (% BV in SJL) allo 0.23% (AVD in C3H). I PE in questi due compartimenti erano notevolmente più alti per la configurazione di misura e analisi ripetute.

Questo può essere spiegato dal riposizionamento dei femori nello scanner che causa variazioni angolari del compartimento selezionato e una variazione nei contorni definiti e nella distribuzione della scala di grigi nelle immagini.

Tuttavia, con valori tipici di ripetibilità intorno e sotto il livello del 2%, i parametri strutturali in questi compartimenti erano ancora altamente ripetibili.

Il compartimento trabecolare è definito dal contorno interno e poiché il disegno di questo contorno richiede una interazione maggiore con l'operatore, non è sorprendente che i PE in questo compartimento siano più alti che nelle regioni definite dal contorno esterno.

L'ICC ha mostrato una grande ripetibilità, 0.920-1.000. Indagando sui diversi compartimenti, i valori ICC sono risultati generalmente inferiori nel compartimento trabecolare che nel VOI pieno e corticale, confermando, quindi, i risultati per i PE.

Anche se i due gruppi hanno mostrato una differenza significativa in tutti i parametri analizzati eccetto che per Tb.Th,  $PE_{SD}$  e ICC erano nello stesso range per entrambi i ceppi.

Pertanto, ci si aspetta che la precisione, tra cui il limite superiore di confidenza per i PE e il limite inferiore di confidenza per ICC, possa essere generalizzata per femori di altri ceppi di topi con caratteristiche ossee simili (età, dimensione).

Schmidt et al. [80] hanno investigato la ripetibilità in femori di topo basata su misurazioni pQCT, trovando un  $PE_{\%CV}$  di 2.1% per il Ct.Th che risulta in accordo con i valori di PE 1.3% e 2.2% trovati nello studio precedente usando  $\mu$ CT. Entrambe le tecniche e i metodi di indagine sembrano quindi avere una ripetibilità simile per il Ct.Th nel femore di topo.

Per quanto riguarda la dipendenza dalla risoluzione, si noti che il ricampionamento digitale di un'immagine ad alta risoluzione a risoluzioni più basse rispetto alla scansione a risoluzioni basse sottostima la dipendenza dalla risoluzione dei parametri strutturali [48]. Tuttavia, solo il ricampionamento digitale consente il confronto esatto per lo stesso VOI, mentre la scansione a risoluzioni diverse introduce la questione della ripetibilità dei volumi analizzati perché il VOI deve essere nuovamente selezionato. La riduzione del voxel delle immagini in scala di grigi tende a preservare l'integrità della struttura rendendo i componenti strutturali più spessi.

L'effetto di perdita delle strutture molto sottili con una risoluzione inferiore è visto meglio nella forte diminuzione del Conn.D con la risoluzione.

Uno dei problemi dell'imaging a risoluzione limitata è la sovrastima nelle misurazioni dello spessore reale a livello delle singole trabecole.

Ciò è in parte dovuto al fatto che l'operatore tipicamente sceglierà una soglia per la segmentazione relativamente bassa per preservare al meglio la connettività e in questo modo aumenterà lo spessore e il volume. Tuttavia, come mostrato nello studio riguardante la dipendenza dalla risoluzione, i risultati per le diverse risoluzioni (eccetto 40  $\mu$ m) sono molto correlati tra loro, indicando che le differenze di gruppo possono ancora essere conservate. Inoltre, uno studio del 2005 [11] ha dimostrato che le misurazioni 3D dello spessore sono sempre superiori di circa il 40% rispetto ai risultati 2D provenienti dall'istologia classica.

In uno studio recente [39], si è utilizzato un sistema  $\mu$ CT per valutare la ripetibilità delle misure delle caratteristiche 3D dei canali vascolari ossei e delle lacune in intere ossa murine. Si è usato come metodo di riferimento la microscopia laser confocale (CLSM) in combinazione con colorazione con isotiocianato di fluoresceina (FITC).

La ripetibilità degli indici microstrutturali dell'osso corticale derivati da  $\mu$ CT è stata esaminata in 10 fibule di topi maschi con una risoluzione nominale di 700 nm.

Sono state fatte tre misurazioni ripetute con riposizionamento in giorni diversi ed è stata osservata una correlazione eccellente tra  $\mu$ CT e CLSM per entrambi i volumi medi di lacuna ( $r = 0.98, p = 0.002$ ) e per l'orientamento medio delle lacune ( $r = 0.93, p = 0.02$ ). Considerando che le due tecniche non hanno mostrato nessuna differenza significativa per questi parametri, la lacuna sferica media acquisita da  $\mu$ CT

era significativamente superiore a CLSM ( $p = 0.01$ ). La ripetibilità era alta, con errore di precisione (PE) di  $1.57 \pm 4.69\%$  per i parametri della lacuna e di  $1,01 \pm 9,45\%$  per i parametri del canale vascolare. Il coefficiente di correlazione Intraclass (ICC) ha mostrato un'elevata affidabilità delle misurazioni, si va da  $0.998 \pm 1.000$  per i parametri corticali, a  $0.973 \pm 0.999$  per i parametri del canale vascolare e  $0.755 \pm 0.991$  per i parametri di lacuna.

Nell'articolo di Muller et al. [62] si cerca la correlazione di alcuni parametri strutturali misurati sia con Micro-CT sia tramite sezioni istomorfometriche.

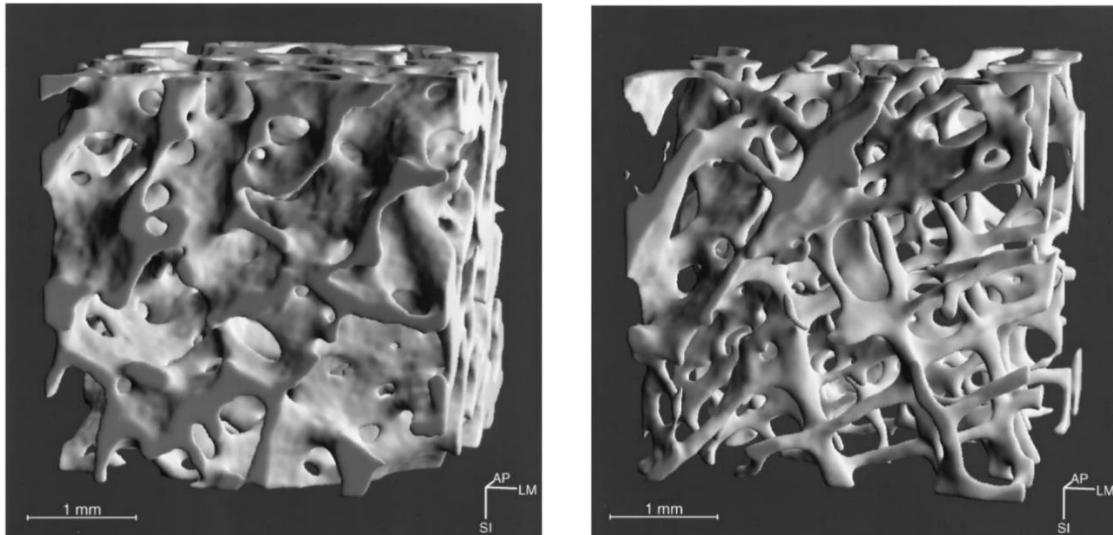


Figura 57: A sinistra architettura ossea trabecolare tridimensionale di un campione osseo prelevato dalla cresta iliaca di un uomo di 37 anni senza disordini ossei; a destra campione osseo proveniente dalla cresta iliaca di una donna osteoporotica di 73 anni con un numero di elementi trabecolari inferiore e più sottili.

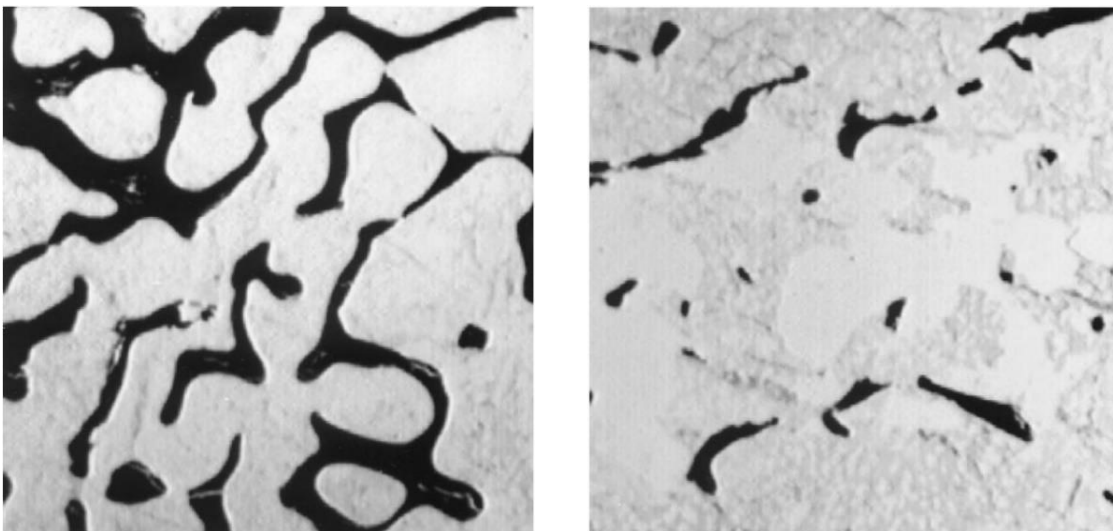


Figura 58: A sinistra struttura ossea trabecolare due-dimensionale di un campione osseo prelevato dalla cresta iliaca di un uomo di 37 anni (stesso campione di sopra); a destra campione osseo proveniente dalla cresta iliaca di una donna osteoporotica di 73 anni. Dal confronto è palese la presenza di una grande differenza nella quantità di osso nella sezione specifica. Dall'altro lato sembra molto difficile fare valutazioni qualitative dei cambiamenti nella struttura ossea e nel tipo di architettura per queste sezioni 2D; una rappresentazione 3D, come quelle di sopra risultano molto più utili.

I campioni inclusi in questo studio hanno mostrato un BV/TV del 14% come valutata dall'istologia e del 14.5% come valutata dalla microtomografia. L'altro parametro primario, BS/TV, è stato rispettivamente 2.68 e 2.48  $mm^2/mm^3$ . Lo spessore medio delle trabecole è risultato 0.10 e 0.11 mm, rispettivamente e la separazione variava tra 0.73 e 0.77 mm per i due metodi. Entrambe le tecniche di indagine hanno mostrato coefficienti di variazione (CV) simili, calcolati come la deviazione standard della media in percentuale, per i quattro parametri, dal 19.3% del Tb.Th per la microtomografia al 44.4% del BV/TV delle sezioni istologiche. In generale, il CV per i parametri basati sulla microtomografia sono risultati più piccoli dei loro corrispondenti istologici, questo però è dovuto alla differente dimensione dei campioni utilizzati nel presente studio.

Indagando sulla relazione tra gli indici morfologici, le correlazioni sono state sempre molto significative ( $p < 0.0001$ ). Differenze significative di 0.3% e 0.01  $mm^2/mm^3$  sono state trovate per i parametri primari normalizzati BV/TV e BS/TV, rispettivamente, mentre per i parametri derivati le differenze sono state calcolate a 7 mm (Tb.Th) e 19 mm (Tb.Sp), che è dell'ordine della risoluzione effettiva del sistema micro-tomografico. Le differenze percentuali per BV/TV variavano dal -13.7% al 17.3%, con una differenza percentuale media del 2.5%. Le differenze per BS/TV variavano dal -18.3% al 12.9%, dove i valori dell'istologia sono stati sottostimati dalla micro-tomografia del 3.1%. Le differenze più grandi ma ancora piuttosto piccole sono state trovate per Tb.Th, che è risultato sovrastimato dalla micro-tomografia del 6.1%. La relazione tra BV/TV determinato dai dati  $\mu$ CT 3D e dalle sezioni 2D nello studio di Thomsen et al. [85] è rilevante ( $r = 0.95$ ). Inoltre, la pendenza della retta di fit non è significativamente diversa da 1 ( $\alpha = 0.946$ ), e l'intercetta dell'asse y non è significativamente diversa da 0 ( $\beta = -0.006\%$ ), ad indicare che i livelli di BV/TV indagati dai due metodi sono simili.

Mentre un'ottima correlazione è stata trovata per il BV/TV, non si può dire lo stesso dei valori Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp. Per tutte le relazioni è stata trovata una pendenza parecchio diversa da 1 e per Tb.N e Tb.Sp anche l'intercetta era parecchio diversa da 0, ad indicare un contrasto tra i due metodi di indagine.

Parecchi studi hanno indicato che la versione 3D del modello parallel-plate sottostima la Trabecular Thickness indagata tramite metodi 3D diretti dal 30 al 40 % [41][18][21]. Tutto ciò è confermato dal presente studio dove si è trovata una sottostima del 21% per Tb.Th tramite metodo basato sul modello se comparato con il metodo diretto.

Direct (x)	Model (y)	$\alpha$	$\beta$	$r$	$P$	Fig.
Tb.Th*	Tb.Th	0.762 <sup>a</sup>	4.51 $\mu\text{m}$	0.95	$1.82 \times 10^{-15}$	a
Tb.N*	Tb.N	1.401 <sup>a</sup>	-0.492 $\text{mm}^{-1}$ <sup>b</sup>	0.87	$5.51 \times 10^{-10}$	b
Tb.Sp*	Tb.Sp	1.425 <sup>a</sup>	-375.5 $\mu\text{m}^b$	0.84	$1.46 \times 10^{-8}$	c

<sup>a</sup>Slope ( $\alpha$ ) significantly ( $P < 0.05$ ) different from 1; <sup>b</sup>y-axis intercept ( $\beta$ ) significantly ( $P < 0.05$ ) different from 0.  $n = 29$ .

Figura 59: Coefficienti di regressione ( $\alpha$  e  $\beta$ ), coefficienti di correlazione ( $r$ ) e livello di significatività ( $P$ ) per le relazioni ( $y=\alpha x+\beta$ ) tra le misure 3D stimate direttamente e quelle basate sul modello.

La corrispondenza tra le misure e la relativa ripetibilità nelle prestazioni tra diversi sistemi  $\mu\text{CT}$ , in particolare per dimensioni voxel vicine al limite della strumentazione, non è nota. Per confrontare questa ripetibilità è stata quindi effettuata un'analisi morfometrica 3D dell'osso spugnoso del topo, proveniente da epifisi femorale distale, da parte del gruppo di Verdelis [87] usando tre diversi sistemi  $\mu\text{CT}$  ex-vivo: GE eXplore Locus SP, Scanco  $\mu\text{CT}35$  e Skyscan 1172.

BV/TV e Tb.Sp erano simili, mentre i valori per la BS/BV, Tb.Th e Tb.N variavano in modo significativo tra i tre sistemi. Le maggiori differenze sono state misurate nello spessore trabecolare (fino al 236%) e nel numero trabecolare (fino al 218%). La dipendenza relativa delle misure dalla dimensione voxel era altamente variabile per il numero trabecolare (da 0% a 20% differenza relativa tra le misurazioni a 12  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ , a seconda del sistema). La ripetibilità intra-sistema di tutte le misurazioni trabecolari era anch'essa molto variabile tra i sistemi e migliorava per BV/TV in tutti i sistemi quando veniva utilizzata una dimensione del voxel più piccola. Inoltre, la ripetibilità migliorava utilizzando una dimensione del voxel più piccola anche per tutti gli altri parametri esaminati nel caso del sistema Scanco, ma non sempre per il GE o il Sistema Skyscan. I risultati di questo studio indicano che le misurazioni della morfometria trabecolare non dovrebbero essere direttamente confrontate tra i sistemi micro-CT. Inoltre, le condizioni, tra cui la dimensione del voxel, per studi sulla morfometria trabecolare nell'osso del mouse dovrebbero essere scelte sulla base del sistema micro-CT specifico e sulle misure di principale interesse.

Engelke et al. [22] hanno investigato i vantaggi e le limitazioni di micro-CT e HR-CT confrontandole con microradiografie e sezioni istologiche. Il vantaggio più grande della CT è la preparazione del campione che è almeno non distruttiva (micro-CT; risoluzione  $<100\mu\text{m}$ ) o addirittura non invasiva (HR-CT; risoluzione 200-500  $\mu\text{m}$ ). Per una valutazione accurata degli indici strutturali come lo spessore trabecolare, sarebbe necessario avere una risoluzione dell'ordine di 20  $\mu\text{m}$ . Tuttavia, per l'applicazione in vivo dell'imaging CT, non sarà mai possibile scendere al di sotto di una risoluzione di 100  $\mu\text{m}$ . L'ostacolo principale a questo proposito è la dose di radiazione, che è inversamente proporzionale alla quarta potenza della risoluzione spaziale. Tenendo conto di queste considerazioni, una risoluzione di 20  $\mu\text{m}$  per valutare gli indici strutturali come lo spessore trabecolare non è fattibile per le misurazioni in vivo.

Per questo motivo, alcuni ricercatori [63] hanno pensato di introdurre un fattore di scala al fine di comparare meglio, ad esempio, un sistema con pixel da 5  $\mu\text{m}$  con uno da 170  $\mu\text{m}$ , dimostrando che i risultati così scalati mostravano piccole variazioni se comparati con l'istologia considerata il *gold standard*. Altri [68] si sono focalizzati sull'effetto del tempo di integrazione sulle proprietà morfometriche, densitometriche e meccaniche, mostrando che il tempo di integrazione ha avuto il maggiore effetto sui parametri morfometrici trabecolari (7-28%), mentre gli effetti più bassi sono stati osservati sui parametri di corticale (1-3%), distribuzione BMC (1-10%) e stime basate su FE di proprietà meccaniche (1-3%).

Klinck et al. [49] hanno analizzato l'effetto di cinque scansioni (846 mGy) sulla tibia in topi femmina di ceppi diversi. Nella maggior parte dei gruppi, è stata trovata una riduzione significativa del BV/TV. Inoltre, un significativo aumento del Tb.Sp o diminuzione del Tb.N sono stati osservati in alcuni dei gruppi di animali analizzati. Sono stati trovati effetti più piccoli su parametri corticali. Willie et al. [92] hanno riportato l'effetto di quattro scansioni (dimensione del voxel di 10,5  $\mu\text{m}$ ) in topi femmina di età diverse. Hanno osservato una significativa riduzione di BV/TV trabecolare e un significativo aumento di Tb.Sp in topi di 10 settimane, mentre nessun effetto è stato osservato in topi di 26 settimane. D'altra parte, Buie et al. [7] non hanno rilevato differenze tra gli animali sottoposti a scansione con bassa radiazione (6 scansioni a 188 mGy) o con radiazioni elevate (12 scansioni a 188 mGy), indipendentemente dall'età. Per ultimo, Laperre et al. [52] hanno trovato in tre scansioni a 776 mGy, una riduzione di BV/TV trabecolare e Tb.N in topi maschi. Protocolli di scansione a bassa radiazione (434 mGy e 166 mGy) non hanno avuto effetti significativi su parametri trabecolari o corticali. In tutti i casi le radiazioni non hanno avuto effetto significativo sul TMD, in entrambi i compartimenti trabecolare e corticale.

In conclusione, si è visto che esistono diversi metodi per la quantificazione dell'osso trabecolare e corticale e diverse sono le tecnologie impiegate a tal fine. Le tecniche a cui si fa riferimento più spesso per indagare il tema dell'accuratezza e ripetibilità delle misure sono la microtomografia a raggi X e le sezioni istologiche; sebbene la prima fornisca una rappresentazione non distruttiva dei dati in 3D, le seconde sono caratterizzate dall'elevata risoluzione (fino a 0.3  $\mu\text{m}$ ). Altre tecnologie utilizzate a confronto sono la microradiografia, la pQCT e la risonanza magnetica; solitamente le prime due sono pratiche specifiche per misurazioni in-vivo e proprio per questo lavorano a bassissime risoluzioni dovendo fare i conti con la dose di radiazione assorbita.

Le principali limitazioni inerenti l'utilizzo di una tecnica piuttosto che un'altra riguardano quindi la massima risoluzione ottenibile, la dimensione del campione che può essere analizzato, la capacità di quantificare il contenuto minerale, l'identificazione delle componenti cellulari, la procedura di preparazione del campione e l'eventuale distruzione del campione.

Si riporta una tabella di confronto prodotta in seguito all'analisi delle prestazioni nel 1993 da Engelke et al. [22]

<b>Prestazioni ottenute nel 1993</b>	<b>Micro-CT</b>	<b>Sezioni istologiche</b>
Dimensione del campione (mm)	25	20
Risoluzione spaziale ( $\mu\text{m}$ )	100	0.3
Quantificazione del contenuto minerale	++	No
Differenziazione del tessuto osseo (corticale o trabecolare)	+	-
Identificazione parte cellulare	No	-
Preparazione del campione	Semplice e veloce	Complicata
Rappresentazione in 3D	++	No
Distruttività	No	Si

*Tabella 6: Confronto tra Micro-CT e Sezioni istologiche in seguito all'analisi delle prestazioni.*

Ovviamente questi sono valori ormai superati e ad oggi riusciamo a raggiungere una risoluzione per la micro-CT di gran lunga migliore, ma il rapporto tra le diverse tecnologie è rimasto fondamentalmente lo stesso.



# CAPITOLO 6

## Controllo qualità

L'importanza di applicare un protocollo di controllo qualità periodico, è legata alla necessità di individuare e risolvere problemi puntuali per tempo, confrontando immagini micro-CT acquisite in momenti temporali diversi e monitorare in questo modo la stabilità in performance di un sistema microtomografico nel corso degli anni, al fine di garantire una misurazione di alta qualità.

Il protocollo proposto in questo studio, elaborato sulla base della ricerca bibliografica illustrata nel capitolo precedente e dell'esperienza del gruppo di lavoro, è stato applicato alla caratterizzazione istomorfometrica del tessuto osseo, ma può essere utilizzato su una vasta gamma di applicazioni micro-CT in vitro.

Il controllo qualità (CQ) è un processo applicato per garantire un certo livello di qualità in un prodotto o servizio. Il livello di qualità di uno strumento di misura è strettamente legato all'accuratezza di misurazione. Perciò, il controllo qualità è un processo impiegato per verificare l'accuratezza delle misure degli strumenti nel corso del tempo in accordo con gli standard di qualità comunemente accettati.

I protocolli CQ riguardano solitamente il controllo delle più importanti caratteristiche di uno scanner CT, come il rumore, l'uniformità, la linearità del numero CT (Unità Hounsfield), la risoluzione spaziale, il contrasto e la valutazione della dose [84].

Di seguito vengono illustrati in maniera dettagliata tutti gli elementi del protocollo messo a punto.

### **Software utilizzati**

Per la fase di acquisizione, ricostruzione, calcolo dei parametri morfometrici di interesse e rendering 3D, sono stati utilizzati i software forniti dalla casa costruttrice del microtomografo Skyscan 1072, oltre ad Image Pro Plus per analisi di rumore ed uniformità.

- ***TomoNT (Skyscan, Belgium)***

Dopo aver impostato i valori di scansione, permette l'acquisizione tomografica dei campioni. Il software mostra in tempo reale, ad ogni passo di rotazione, la proiezione radiografica dell'oggetto a quel dato angolo.

Le immagini vengono salvate in formato TIFF.

- ***NRecon (Skyscan, Belgium)***

Usando tale software, a partire dalle proiezioni bidimensionali, è possibile ricostruire le sezioni trasversali dell'oggetto. Il software, basato su un algoritmo cone-beam, elabora le immagini floating-point salvate durante il processo di acquisizione e le converte in immagini BMP, nel nostro caso, a 8-bit (256 livelli di grigio). Ogni immagine è rappresentata digitalmente da una matrice.

La conversione avviene assegnando ad ogni elemento floating-point della matrice, rappresentante la distribuzione dell'assorbimento della radiazione, un valore BMP o il livello di grigio corrispondente. Nello specifico, al valore floating-point=0.000 corrisponde il valore bmp=255 (bianco) ed indica l'elemento aria; al massimo valore floating-point=1.500 corrisponde il valore bmp=0 (nero) ed indica l'elemento osso. I valori floating-point compresi in questo intervallo vengono bilanciati di conseguenza. La ricostruzione di 100 fette tomografiche richiederà circa 30 minuti e le immagini in output sono immagini DICOM, un formato standard e comune, ora utilizzato nella grande vastità dei prodotti biomedici, specialmente nel campo della radiologia.

- ***DataViewer (Skyscan, Belgium)***

Associato a CT-Analyser, permette di unire due dataset procedendo alla registrazione 2D.

- ***CT-Analyser (Skyscan, Belgium)***

I parametri morfometrici sono stati calcolati tramite tale software sia in 3D che in 2D in seguito all'identificazione della Regione di Interesse (ROI) dell'immagine binarizzata.

- ***Image Pro Plus (The Proven Solution, Media Cybernetics, Inc)***

Software di elaborazione, miglioramento ed analisi delle immagini 2D e 3D con ampie funzioni di misurazione e personalizzazione.

- ***CT-Vox (Skyscan, Belgium)***

Sempre della casa Bruker, utilizzato per il rendering 3D dei campioni, i cambiamenti visivi di rappresentazione sono sviluppati a partire da una modifica nelle curve RGB e luminosità presenti sull'istogramma.

Prima di effettuare ogni scansione si acquisisce il flat field con gli stessi parametri di scansione che saranno poi utilizzati per i campioni in analisi.

Il flat field non è altro che un'immagine di calibrazione usata per mappare le differenze di sensibilità dei pixel del CCD e le disomogeneità del piano focale, quindi per correggere le immagini acquisite di seguito.

Se la scansione ottenuta risulta essere grigia in maniera omogenea, si salverà il flat field e si procederà con la scansione vera e propria dell'oggetto.

## **Allineamento sorgente-telecamera (*frequenza bimestrale*)**

Si acquisisce il flat field con i seguenti parametri:

- Ingrandimento: 16x (pixel size: 19.5  $\mu\text{m}$ )
- 50 kV, 200  $\mu\text{A}$
- Rotazione totale: 180°
- Step di rotazione: 0.90°
- Tempo di esposizione: 5.9 s
- Frame averaging: 2
- Random movement: 10

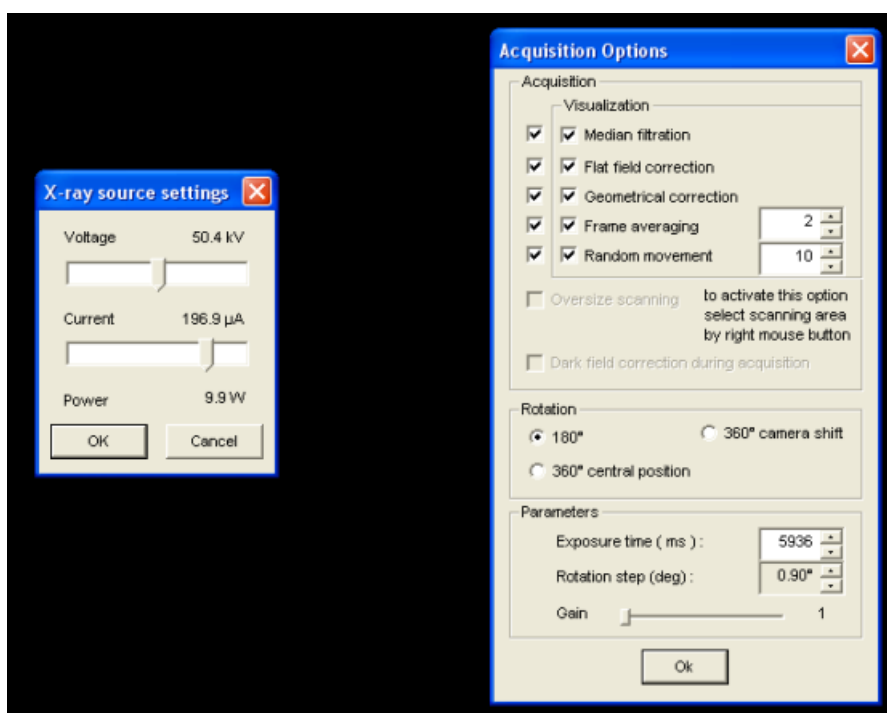


Figura 60: Finestre presenti in TomoNT per il settaggio dei parametri di scansione.

Per accertare che sorgente e telecamera siano allineate correttamente, si utilizza l'ago di una siringa senza nessun porta campioni e lo si posiziona all'interno dello scanner.

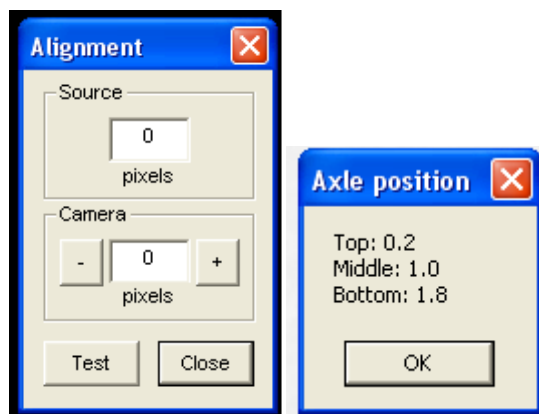


Figura 61: Ago usato per l'allineamento sorgente-fotocamera.

I parametri di scansione sono gli stessi del flat field, con l'aggiunta di uno spostamento  $y = 7 \text{ mm}$ .

L'intera procedura si svolge tramite il software TomoNT seguendo la lista di comandi sottostante:

Setup → Alignment → Test → Allineamento Camera



Il valore “middle” ottenuto deve rientrare nell'intervallo di  $\pm 1$ ; se così non fosse, l'opposto del valore trovato va sostituito in Camera e il test va rifatto.

A questo punto si rimuove l'ago e si rifà il flat field con un nuovo setup:

- Ingrandimento: 60x (pixel size:  $5.2 \mu\text{m}$ )
- 50 kV, 200  $\mu\text{A}$
- Rotazione totale:  $180^\circ$
- Step di rotazione:  $0.90^\circ$
- Tempo di esposizione: 5.9 s
- Frame averaging: 2
- $y=3 \text{ mm}$

Si riposiziona l'ago e con le nuove impostazioni si procede al Test.

La lista di comandi in questo caso sarà:

Setup→Alignment→Test→Allineamento Sorgente

Il valore “middle” ottenuto deve rientrare nell'intervallo di  $\pm 1$ ; se così non fosse, va sostituito al valore della Sorgente. Ultimata quest'operazione si ripete l'allineamento della camera per verificare che il valore di “middle” sia rimasto nell'intervallo di  $\pm 1$ . Per ripetere l'allineamento va rifatto il flat field con ingrandimento pari a 16.

### **BHC: Beam Hardening Correction (*frequenza semestrale*)**

Le misurazioni della densità minerale ossea (BMD) sono critiche in molti studi, per cui la tomografia microcomputerizzata ( $\mu$ CT) è diventata uno strumento fondamentale nella ricerca preclinica. Tuttavia, la capacità di misurare la BMD, direttamente dalle immagini  $\mu$ CT può essere distorta da artefatti presenti nell'immagine, come ad esempio l'artefatto da *beam hardening*.

Le correzioni per l'indurimento del fascio possono essere applicate durante il processo di acquisizione delle immagini, durante la ricostruzione dell'immagine o come correzioni empiriche.

La capacità di diversi materiali filtranti di ridurre l'indurimento del fascio è stata valutata da Meganck et al. [58] usando un fantoccio a torre composto da 11 livelli circolari separati combinati in un unico oggetto. La scelta di una geometria circolare permette di evidenziare al meglio gli artefatti causati dal *cupping effect*.

Nel nostro caso si sono scelti due fantocci di idrossiapatite (HA) equivalente di densità  $0.25 \text{ g/cm}^3$  e  $0.75 \text{ g/cm}^3$ , entrambi costituiti da tre cilindri con diametro di 2, 4 e 8 mm per una altezza complessiva di 14 mm forniti dalla casa costruttrice del microtomografo (Bruker Micro-CT, Konthich, Belgium).

Per la calibrazione dei campioni trabecolare e corticale, entrambi i fantocci sono stati posizionati su un supporto in plexiglass e l'acquisizione è avvenuta in aria con una diversa configurazione di acquisizione e ricostruzione per ognuna delle due densità:

Per la scansione di  $0.25 \text{ g/cm}^3$ :

- Ingrandimento: 16x (pixel size:  $19.5 \mu\text{m}$ )
- 50 kV, 200  $\mu\text{A}$
- Rotazione totale:  $180^\circ$
- Step di rotazione:  $0.90^\circ$
- Tempo di esposizione: 5.9 s

Per la ricostruzione:

- BH: 24%
- Dynamic image range: 0-0.068200

Il software di ricostruzione utilizzato (NRecon v. 1.10.1 software, Skyscan, Kontich, Belgium) fornisce la possibilità di impostare l'intensità della correzione BH (%) rispetto alla densità dell'oggetto (0% - 100%).

La correzione deve essere scelta tenendo conto delle dimensioni e della densità del campione acquisito; gli oggetti più grandi e più densi saranno affetti maggiormente dall'effetto del beam hardening.

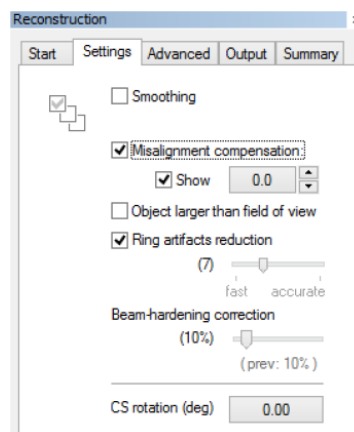


Figura 62: Finestra in NRecon per impostare la riduzione di Ring artifact e la correzione del Beam-hardening.

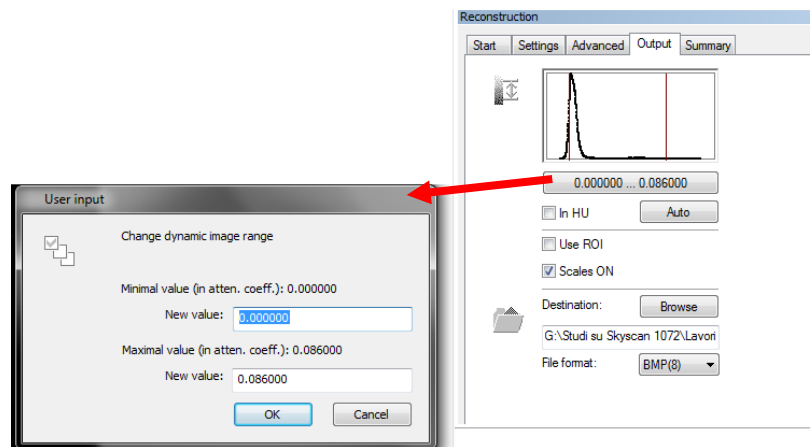


Figura 63: Finestre in NRecon per impostare il Dynamic image range.

Nella tabella sottostante sono riportati gli intervalli di fette da ricostruire per il BHC nel caso di osso trabecolare e la dimensione della ROI da analizzare per ognuno dei rispettivi cilindri del fantoccio a torretta.

<b>Trabecolare</b>	D = 2 mm	D = 4 mm	D = 8 mm
ØROI	90 px (1.8 mm)	191 px (3.7 mm)	387 px (7.6 mm)
#Fette	960-830	600-730	170-300

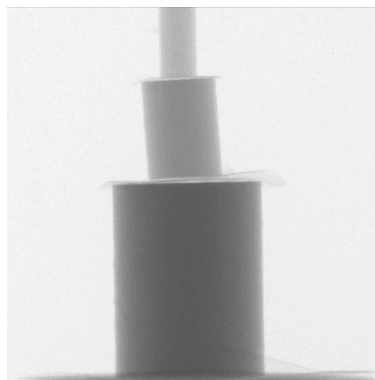


Figura 64: Scansione del fantoccio utilizzato con ingrandimento 16X.

Per la scansione di  $0.75 \text{ g/cm}^3$ :

- Ingrandimento: 39x (pixel size:  $8 \mu\text{m}$ )
- 80 kV,  $124 \mu\text{A}$
- Rotazione totale:  $180^\circ$
- Step di rotazione:  $0.90^\circ$
- Tempo di esposizione: 5.9 s
- $y = -1.5 \text{ mm}$

Per la ricostruzione:

- BH: 45%
- Dynamic image range: 0-0.045

Nella tabella sottostante sono riportati gli intervalli di fette da ricostruire per il BHC nel caso di osso corticale e la dimensione della ROI da analizzare per ognuno dei rispettivi cilindri del fantoccio a torretta.

<b>Corticale</b>	D = 2 mm	D = 4 mm	D = 8 mm
ØROI	236 px (4.6 mm)	465 px (9.1 mm)	945 px (18.5 mm)
#Fette	900-980	500-580	50-130

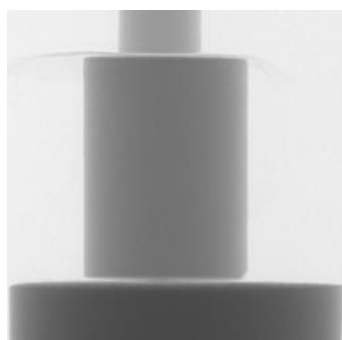


Figura 65: Scansione del fantoccio utilizzato con ingrandimento 39X.

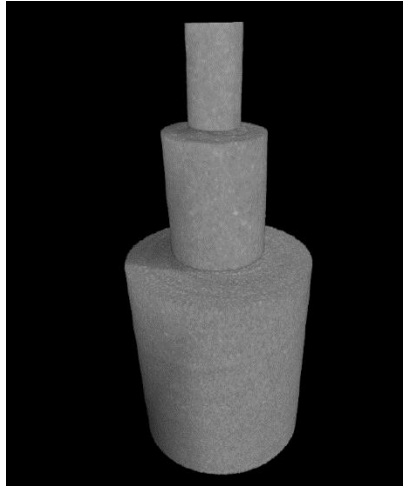


Figura 66: Ricostruzione 3D del fantoccio a torre utilizzato per la valutazione della correzione del BH.

Per ognuno dei tre diametri, i profili dei livelli di grigio sono stati ottenuti selezionando le ROI nella parte centrale della fetta centrale a diversi valori di correzione BH. Il fantoccio a torretta è stato ricostruito applicando diversi valori di correzione percentuale compresi tra il 5%, dato di default dal software di ricostruzione, e il 50%. L'errore quadratico medio (RMSE) è stato scelto come parametro comparativo al fine di trovare il valore ottimale per la correzione che riesca a compensare l'effetto del BH sui profili dei livelli di grigio.

La correzione ottimale del BH è risultata dal valore minimo della RMSE, ottenuto mediante CT-Analyzer e calcolato tramite la formula seguente:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{d=2,4,8} \left( \overline{GL_{d(mm)}} - \frac{\sum_{d=2,4,8} (\overline{GL_{d(mm)}} * N_{d(mm)}^{voxels})}{\sum_{d=2,4,8} N_{d(mm)}^{voxels}} \right)}{3}} \quad (32)^1$$

- $\overline{GL_{d(mm)}}$  = valore medio dei livelli di grigio calcolato per i diametri da 2 mm, 4 mm e 8 mm;
- $N_{d(mm)}^{voxels}$  = numero di voxel del volume ricostruito per i diametri da 2 mm, 4 mm e 8 mm;
- $\frac{\sum_{d=2,4,8} (\overline{GL_{d(mm)}} * N_{d(mm)}^{voxels})}{\sum_{d=2,4,8} N_{d(mm)}^{voxels}} = M$  (media pesata).

<sup>1</sup> L'RMSE è la radice quadrata dell'errore quadratico medio (MSE), la quale indica la discrepanza quadratica media tra i valori dei dati osservati e i valori dei dati stimati. L'RMSE corrisponde quindi alla varianza interna, data dal rapporto tra la devianza interna (entro i gruppi) e la numerosità totale.



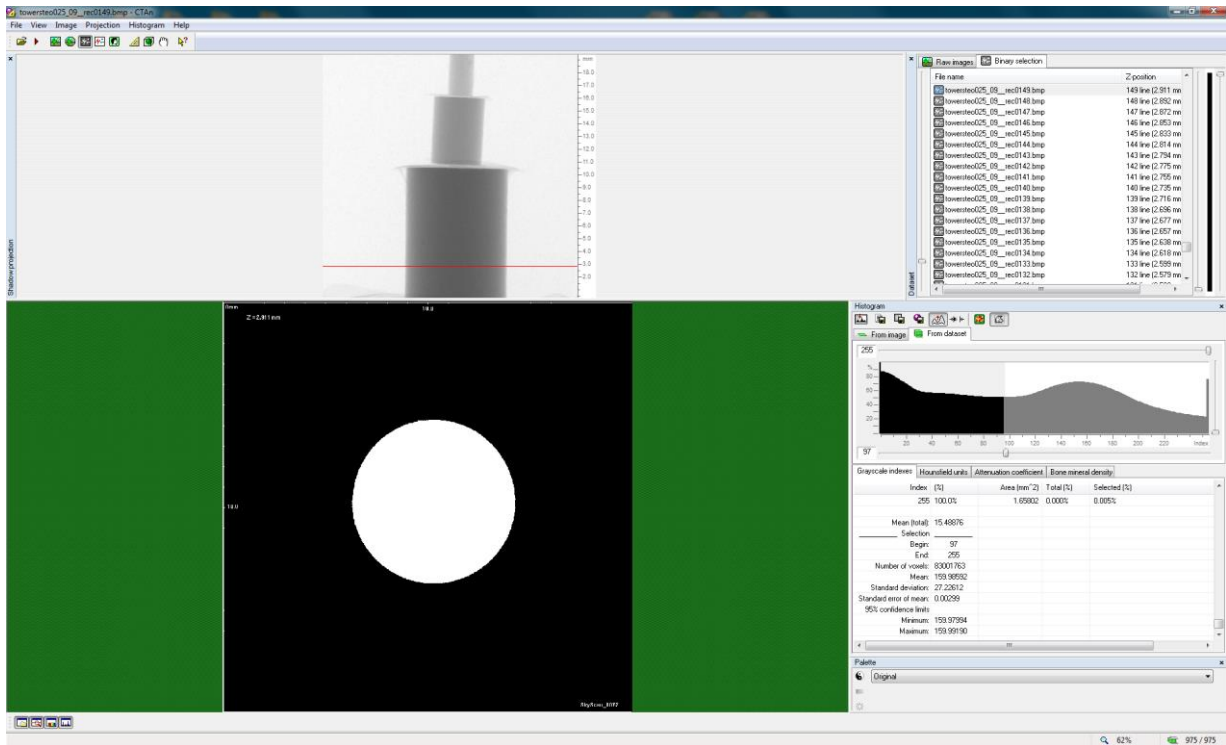


Figura 67: Schermata di CT-Analyser all'apertura del dataset.

BH 22	2mm	4mm	8mm		Media
GL	70,99	69,09	67,65		68,08
					RMSE
					1,80
BH 24	2mm	4mm	8mm		Media
GL	69,83	68,38	67,53		67,80
					RMSE
					1,23
BH 26	2mm	4mm	8mm		Media
GL	68,66	67,65	67,42		67,52
					RMSE
					0,66
BH 28	2mm	4mm	8mm		Media
GL	67,53	66,95	67,31		67,25
					RMSE
					0,24

**Valore BH ottenuto per il fantoccio da  $0.25 \text{ g/cm}^3$  pari a 28**

BH45	2mm	4mm	8mm		Media
GL	138,74	138,12	134,73		135,55
					RMSE
					2,41

BH47	2mm	4mm	8mm		Media
GL	136,81	137,24	134,94		135,46
					RMSE
					1,33

BH49	2mm	4mm	8mm		Media
GL	134,88	136,34	135,07		135,30
					RMSE
					0,66

BH50	2mm	4mm	8mm		Media
GL	133,83	136,05	135,20		135,30
					RMSE
					0,95

*Valore BH ottenuto per il fantoccio da  $0.75 \text{ g/cm}^3$  pari a 49*

## Calibrazione dei livelli di grigio in $\text{g/cm}^3$ di HA equivalente (Bone Mineral Density) (*frequenza bimestrale*)

Si sono scelti due fantocci di idrossiapatite (HA) equivalente di densità  $0.25 \text{ g/cm}^3$  e  $0.75 \text{ g/cm}^3$  con un diametro di 4 mm e sono stati scansionati sia in soluzione fisiologica, all'interno di un portacampioni di 10 mm di diametro, sia in aria, posizionati su un supporto in plexiglass.

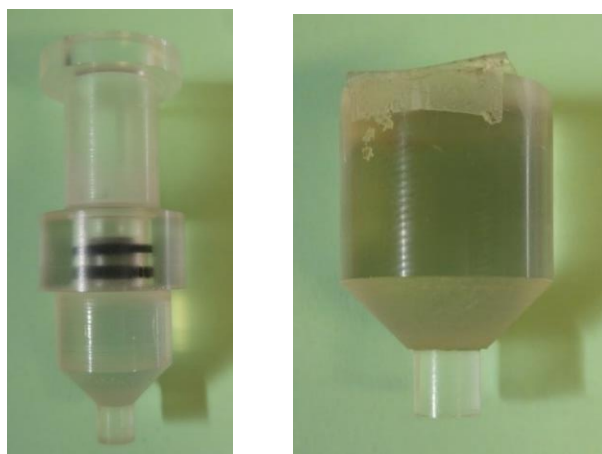


Figura 68: A sinistra il portacampioni per scansione in acqua; a destra il supporto per scansione in aria.

Per la calibrazione trabecolare, tramite CT-Analyser, si è calcolato il coefficiente di attenuazione medio, dopo aver selezionato l'intervallo di fette per le due densità e la dimensione della ROI, come mostrato nella tabella sottostante:

Densità (g/cm <sup>3</sup> )	0.25	0.75	ØROI
Fette da selezionare	350-470	670-790	360 px

Per la scansione in acqua:

- Ingrandimento: 16x (pixel size: 19.5 µm)
- 50 kV, 200 µA

E per la ricostruzione:

- BH: 23%
- Dynamic image range: 0-0.072
- Ring Artifact: 7

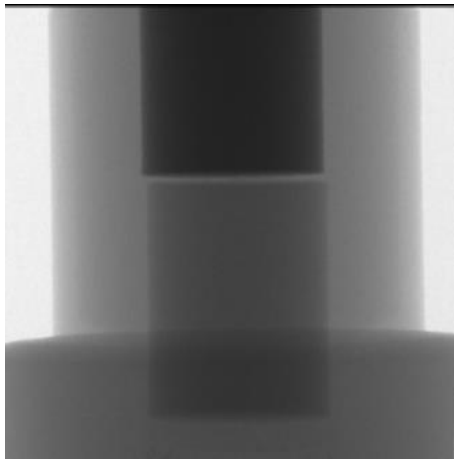
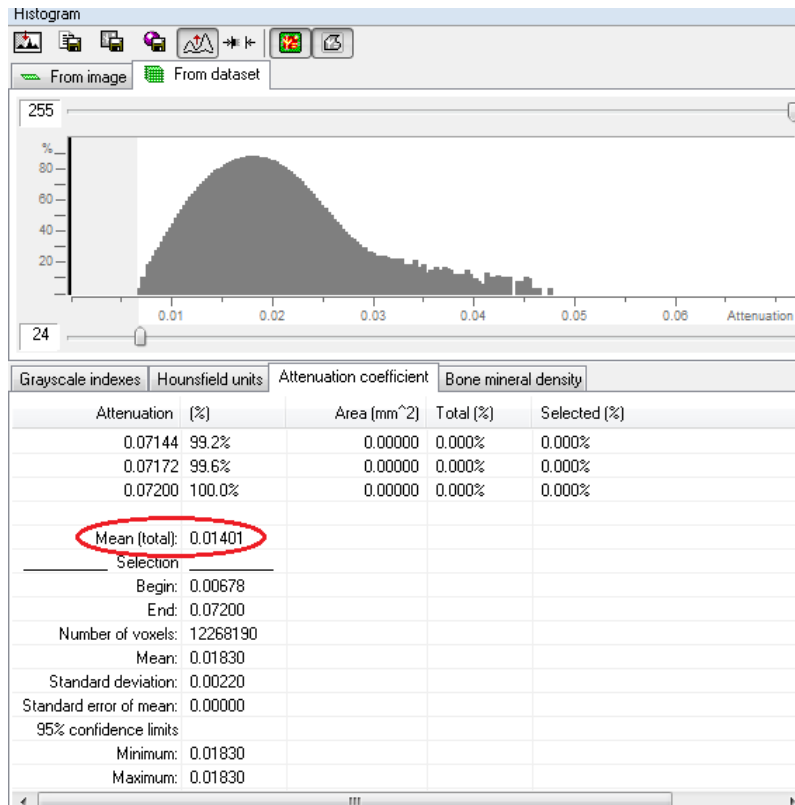
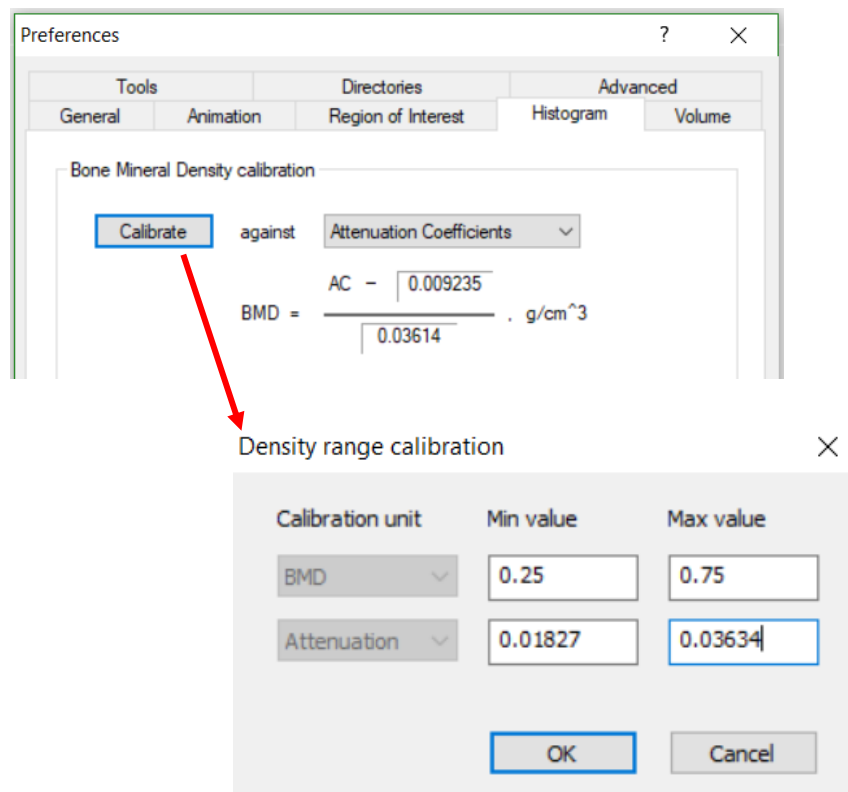


Figura 69: Esempio di scansione per il fantoccio a due densità, in basso è presente quello a 0.25 g/cm<sup>3</sup> e in alto 0.75 g/cm<sup>3</sup>.

Tramite CT-Analyser, per entrambe le densità, andremo a ricercare il valore medio del coefficiente di attenuazione.



I valori ottenuti, per entrambe le densità, sono stati sostituiti nella finestra di calibrazione, seguendo la lista di controlli:  
 File → Preferences → Histogram → Calibrate



Nella tabella sottostante sono riportati nelle prime due celle i coefficienti di attenuazione (AC) medi per le due densità, 0.25 g/cm<sup>3</sup> e 0.75 g/cm<sup>3</sup>, usati per la calibrazione e, nelle celle restanti, il Coefficiente numerico, il Coefficiente densitometrico, l'AC e il BMD ottenuti in seguito alla calibrazione.

AC medio per 0.25 g/cm <sup>3</sup>	AC medio per 0.75 g/cm <sup>3</sup>	Coeff num	Coeff den	AC	BMD (g/cm <sup>3</sup> )
0.01827	0.03634	0.00924	0.03614	0.03280	0.65191

Si è poi ripetuta la procedura con diverse impostazioni per la calibrazione corticale:

Densità (g/cm <sup>3</sup> )	0.25	0.75	ØROI
Fette da selezionare	150-280	500-630	360 px

Per la scansione in aria:

- Ingrandimento: 16x (pixel size: 19.5 µm)
- 50 kV, 200 µA

E per la ricostruzione:

- BH: 23%
- Dynamic image range: 0-0.05238

I risultati sono mostrati nella tabella sottostante:

AC medio per 0.25 g/cm <sup>3</sup>	AC medio per 0.75 g/cm <sup>3</sup>	Coeff num	Coeff den	AC	BMD (g/cm <sup>3</sup> )
0.01831	0.03760	0.00867	0.03580	0	-0.24220

Per la scansione in acqua:

- Ingrandimento: 16x (pixel size: 19.5 µm)
- 80KV, 124 µA

E per la ricostruzione:

- BH: 40%
- Dynamic image range: 0-0.045

I risultati sono mostrati nella tabella sottostante:

AC medio per 0.25 g/cm <sup>3</sup>	AC medio per 0.75 g/cm <sup>3</sup>	Coeff num	Coeff den	AC	BMD (g/cm <sup>3</sup> )
0.01283	0.02350	0.00750	0.02134	0.03253	1.17300

E ancora:

Fette da selezionare	0.25 g/cm <sup>3</sup>	0.75 g/cm <sup>3</sup>	ØROI
Y=0	150-280	500-630	600 px
Y=2	250-380	600-730	

Per la scansione in aria:

- Ingrandimento: 50x (pixel size: 6.25 µm)
- 80 kV, 124 µA

E per la ricostruzione:

- BH: 40%
- Dynamic image range: 0-0.0628

	AC medio per 0.25 g/cm <sup>3</sup>	AC medio per 0.75 g/cm <sup>3</sup>	Coeff num	Coeff den	AC	BMD (g/cm <sup>3</sup> )
Y=0	0.01155	0.02350	0.00560	0.02388	0	-0.23450
Y=2	0.01007	0.02560	0.00230	0.03116	0	-0.07320

## Monitoraggio parametri morfometrici e TDM (*frequenza bimestrale*)

I campioni d'osso incluso esaminati con la tecnica microtomografica sono solitamente in forma di cilindro o di parallelepipedo, con diametro o lunghezza del lato dell'ordine di 5-10 mm. In questo lavoro si è utilizzato un provino di forma cilindrica con diametro di circa 3 mm ed altezza di 20 mm posizionato sul supporto in plexiglass, lo stesso della calibrazione dei livelli di grigio.



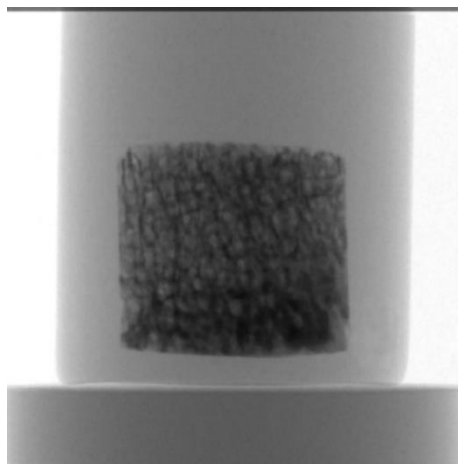
Figura 70: Campione d'osso spugnoso incluso in PMMA.

Per l'acquisizione si sono impostati i seguenti parametri:

- Ingrandimento: 16x (pixel size: 19.5  $\mu\text{m}$ )
- 50 kV, 200  $\mu\text{A}$
- Tempo di esposizione: 5.9 s
- Step di rotazione: 0.90°
- Y=6 mm

E per la ricostruzione:

- BH:23%
- Dynamic image range: 0-0.072



*Figura 71: Proiezione frontale ottenuta tramite micro-CT di una biopsia di osso spugnoso proveniente da un collo del femore umano, incluso in PMMA*

Per l'analisi sono state selezionate 330 fette (300-630) ed è stata utilizzata una ROI circolare di 460x460 px (9 mm).

Il calcolo dei parametri istomorfometrici, bidimensionali e tridimensionali, è stato effettuato con CT-Analyser, in seguito a segmentazione globale tramite istogramma, con valori compresi tra 117 e 255.

Sullo stesso campione viene inoltre effettuato il calcolo del TDM mantenendo gli stessi valori di soglia ed andando a registrare il valore medio del BMD e la sua STD.

Prima di effettuare questi calcoli occorre sempre controllare che la calibrazione dei livelli di grigio nell'istogramma sia impostata ai valori dell'osso trabecolare.

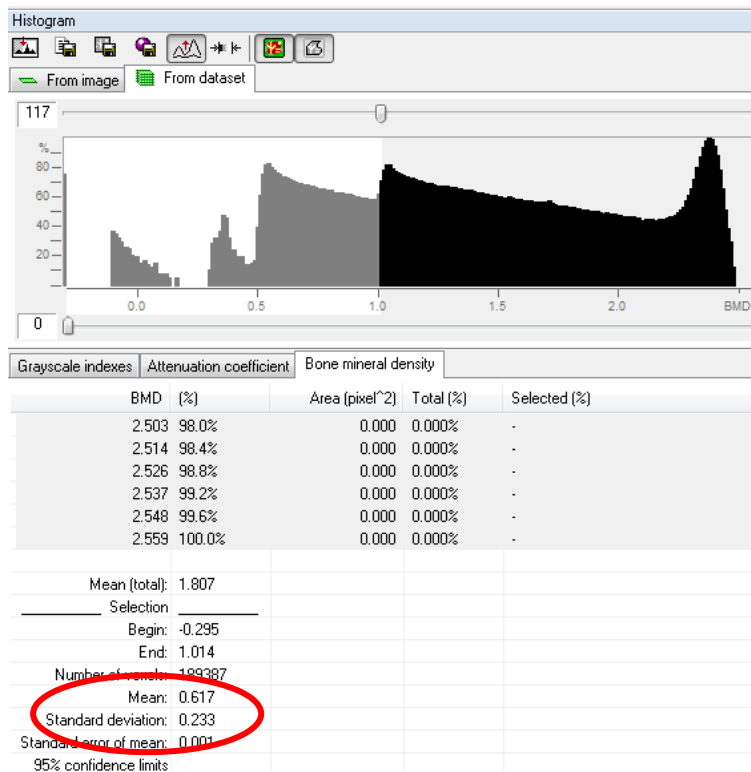


Figura 72: Esempio di panoramica in CT-Analyser che mostra il BMD medio e la sua deviazione standard.

<b>BV/TV 3D (%)</b>	25,89
<b>Tb.Th (mm)</b>	0,22009
<b>Tb.Sp (mm)</b>	0,63016
<b>TMD (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,98261
<b>STD (TMD)</b>	0,19434

Tabella 7: Valori ottenuti per il monitoraggio dei parametri morfometrici e TMD.

## Rumore ed uniformità (*frequenza semestrale*)

Il test per il rumore è stato eseguito su un recipiente in plastica cilindrico riempito di acqua distillata, con diametro di 10 mm.

I parametri di scansione sono stati i seguenti:

- Ingrandimento: 16x (pixel size: 19.5  $\mu\text{m}$ )
- 50 kV, 200  $\mu\text{A}$  (standard per l'osso trabecolare)
- Step di rotazione: 0.45°
- Tempo di esposizione: 5900 ms
- Y=0 mm





Figura 73: Esempio di scansione del campione cilindrico riempito d'acqua.

E per la ricostruzione:

- BH: 24%
- Dynamic image range: 0-0.072

Un set di 5 sezioni trasversali contigue spazialmente è stato ricostruito tramite il software NRecon selezionando le slice a partire da quella centrale del nostro recipiente (490-494) e selezionando “Inverse Grey”.

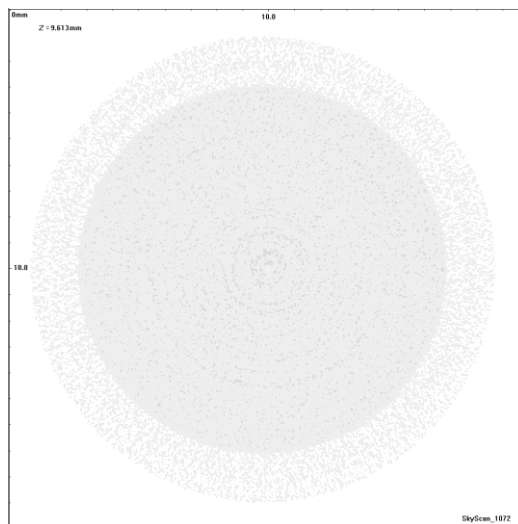


Figura 74: Sezione trasversale del campione ricostruito.

L'analisi è stata eseguita tramite Image ProPlus v.4.5.1.22 (The Proven Solution, Media Cybernetics, Inc.)

Per quantificare il rumore si è calcolata la deviazione standard media dei livelli di grigio in una ROI circolare posizionata al centro di ognuna delle 5 sezioni ricostruite in precedenza.

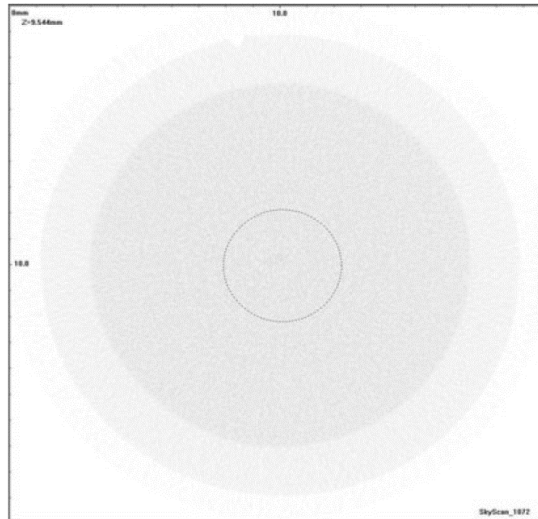


Figura 75: ROI circolare, posizionamento per il noise test.

Prova	slice	mean	max	min	st.dev.
PET_Water	490	227,96	250	210	4,38
PET_Water	491	227,89	249	206	4,36
PET_Water	492	227,93	247	207	4,39
PET_Water	493	227,91	247	204	4,41
PET_Water	494	227,91	248	207	4,41
		±0,03			
<b>Media</b>		<b>227,92</b>			<b>4,39</b>
<b>RUMORE =</b>	<b>4,39</b>				

Per il test dell'uniformità sono stati utilizzati lo stesso fantoccio e le stesse sezioni, in questo caso però una ROI circolare, la stessa usata per il noise test, è stata posizionata nel centro ed altre quattro delle stesse dimensioni sono state posizionate in posizioni periferiche, si veda la figura.

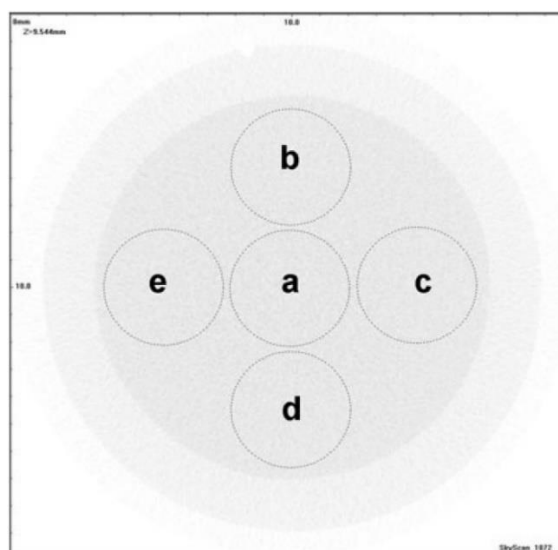


Figura 76: Uniformity test: stessa ROI utilizzata per il noise test posizionata nella zona centrale (a) e in quattro regioni periferiche (b, c, d, e).

Prova	slice	ROIa	ROIb	ROIc	ROI d	ROIe
PET_Water	490	227,96	227,74	227,80	228,01	227,88
PET_Water	491	227,90	227,74	227,82	228,02	227,87
PET_Water	492	227,93	227,75	227,84	228,01	227,85
PET_Water	493	227,91	227,74	227,84	227,99	227,86
PET_Water	494	227,91	227,73	227,84	227,98	227,88
		±0,03	±0,01	±0,02	±0,02	±0,01
Media		227,35	227,15	227,20	227,47	227,33
			Media Periferiche =		227,288	
UNIFORMITÀ =		0,07				

Il parametro QC del test dell'uniformità è stato calcolato come la differenza nei livelli di grigio ( $GL$ ) tra la densità media ( $\overline{GL}$ ) della ROI circolare centrale ( $ROI_a$ ) e la media tra le densità medie di tutte le quattro ROI circolari periferiche ( $ROI_b, ROI_c, ROI_d, ROI_e$ ). Questa differenza è stata mediata sulle 5 sezioni trasversali contigue spazialmente.

$$Difference (GL) = \overline{GL}_{ROI_a} - \left( \frac{\sum_{i=b}^e \overline{GL}_{ROI_i}}{4} \right) \quad (35)$$

Dove  $i$  è l'indice di riferimento della ROI circolare.

# CAPITOLO 7

## Micro-CT applicata ad un modello murino della progeria

In questo capitolo viene descritta la procedura di scansione, ricostruzione e analisi microtomografica applicata ad un modello murino della progeria. In particolare, vengono descritti i vari step previsti dal protocollo di analisi, a partire dalla preparazione del campione fino alla selezione dei volumi di osso trabecolare e corticale su cui effettuare i calcoli dei parametri istomorfometrici.

### Campioni ossei

I campioni utilizzati sono stati complessivamente 26 femori e 18 crani:

- 13 femori provenienti da topi eterozigoti;
- 13 femori provenienti da topi wild type;
- 10 crani provenienti da topi omozigoti;
- 7 crani provenienti da topi eterozigoti;
- 1 cranio proveniente da topo wild type.



*Figura 77: Esempio di femore murino utilizzato.*

## Preparazione del campione e configurazione della strumentazione

Prima di iniziare la scansione bisogna riscaldare la macchina accendendo il tubo; questa fase dura dai 20 ai 30 minuti, durante i quali si procede alla preparazione del campione.

Il provino femore viene posizionato con la testa verso l'alto ed immerso in soluzione salina all'interno del portacampioni.

Il provino cranio viene posto all'interno di una provetta cilindrica, posizionata sul supporto in plexiglass.



Figura 78: A sinistra il portacampione utilizzato nella scansione del femore e a destra la provetta e il supporto utilizzati per il cranio.

Il campione viene bloccato con schiuma di polistirolo morbido, imbevuta di soluzione salina, facendo attenzione alla formazione di bolle d'aria.

Il portacampione viene poi chiuso utilizzando del parafilm per evitare che l'acqua evapori.

Il campione, così preparato, verrà posto all'interno dello scanner micro-CT sul portacampione rotante in maniera stabile al fine di evitare movimenti che in sede di ricostruzione comporterebbero artefatti tomografici.

Prima di chiudere il portellone si verifica che il filtro di Alluminio da 1 mm sia posizionato correttamente; si prosegue quindi alla regolazione dei parametri di acquisizione.



Figura 79: Filtro di Alluminio posizionato correttamente all'interno dello scanner.

## Acquisizione dati

I parametri di acquisizione per il femore sono stati i seguenti:

Corrente	200 $\mu$ A
Voltaggio	50 kVp
Tempo di esposizione	5936 ms
Ingrandimento	29X (10.78) $\mu$ m
Rotazione tomografica	180°
Step di rotazione	0.90°
Random movement	10
Flat field correction	ON

I parametri di acquisizione per il cranio sono stati i seguenti:

Corrente	200 $\mu$ A
Voltaggio	50 kVp
Tempo di esposizione	5936 ms
Ingrandimento	16X (19.5) $\mu$ m
Rotazione tomografica	180°
Step di rotazione	0.90°
Random movement	10
Flat field correction	ON

Prima di scansionare il campione si andrà ad acquisire e salvare il flat field con gli stessi parametri.

Per verificare che il flat field sia stato acquisito correttamente, si “scatterà una foto” al campo vuoto e si appurerà che la foto risulti essere omogeneamente grigia.

A questo punto si posiziona il campione all’interno della macchina, si chiude il portellone e si acquisisce una foto per verificare che il provino entri correttamente nel campo di vista.

Il femore, essendo di grandi dimensioni, verrà scansionato in due volte, una per la parte superiore (up) e una per quella inferiore (down), e poi unite.

Il tempo di scansione stimato è pari a circa due ore.

## Ricostruzione delle sezioni

Si aprono le immagini.tif acquisite, tramite il programma NRecon e si procede alla Preview.

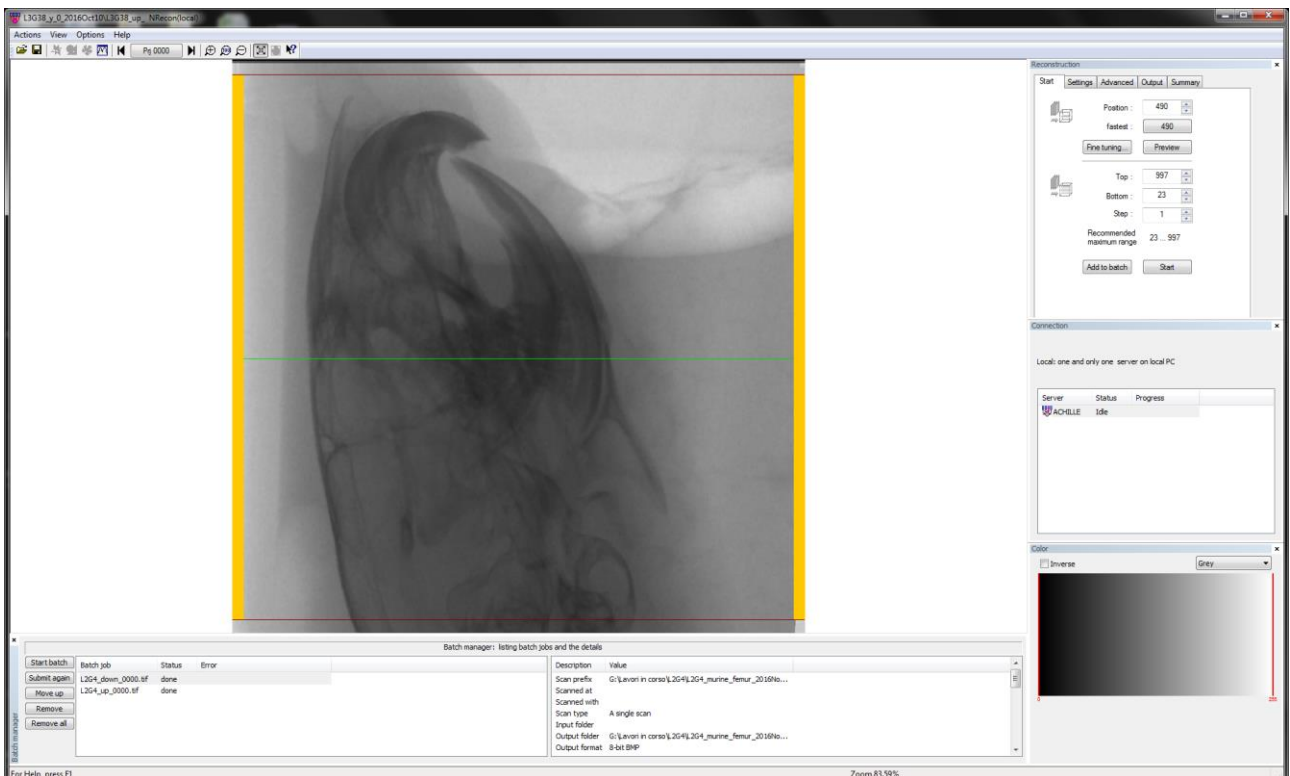
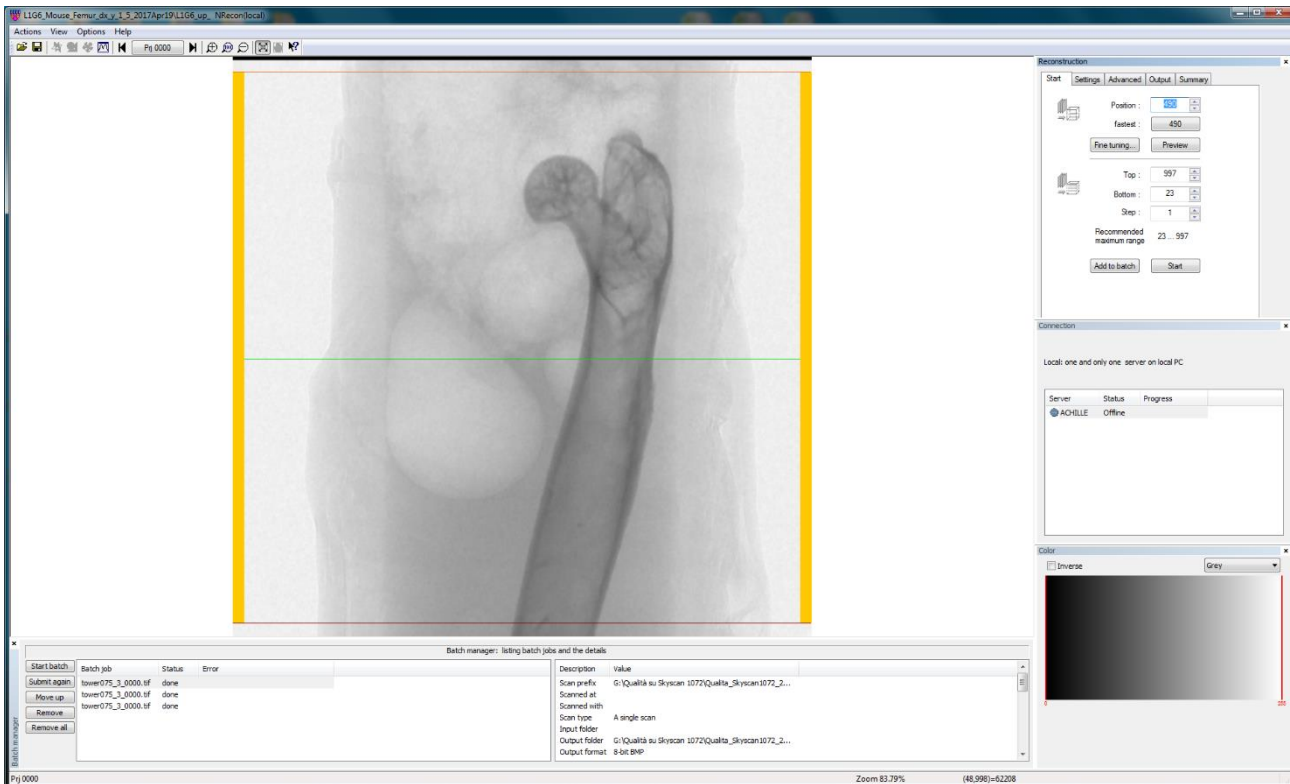


Figura 80: Panoramiche all'apertura di NRecon per il femore e per il cranio murino.

A questo punto, dopo aver impostato i parametri, potremo avviare la ricostruzione.

Per il femore avremo:

Dynamic image range	0-0.086
Ring artifacts reduction	7
Beam-Hardening correction	30

Per il cranio avremo:

Dynamic image range	0-0.100676
Ring artifacts reduction	7
Beam-Hardening correction	23

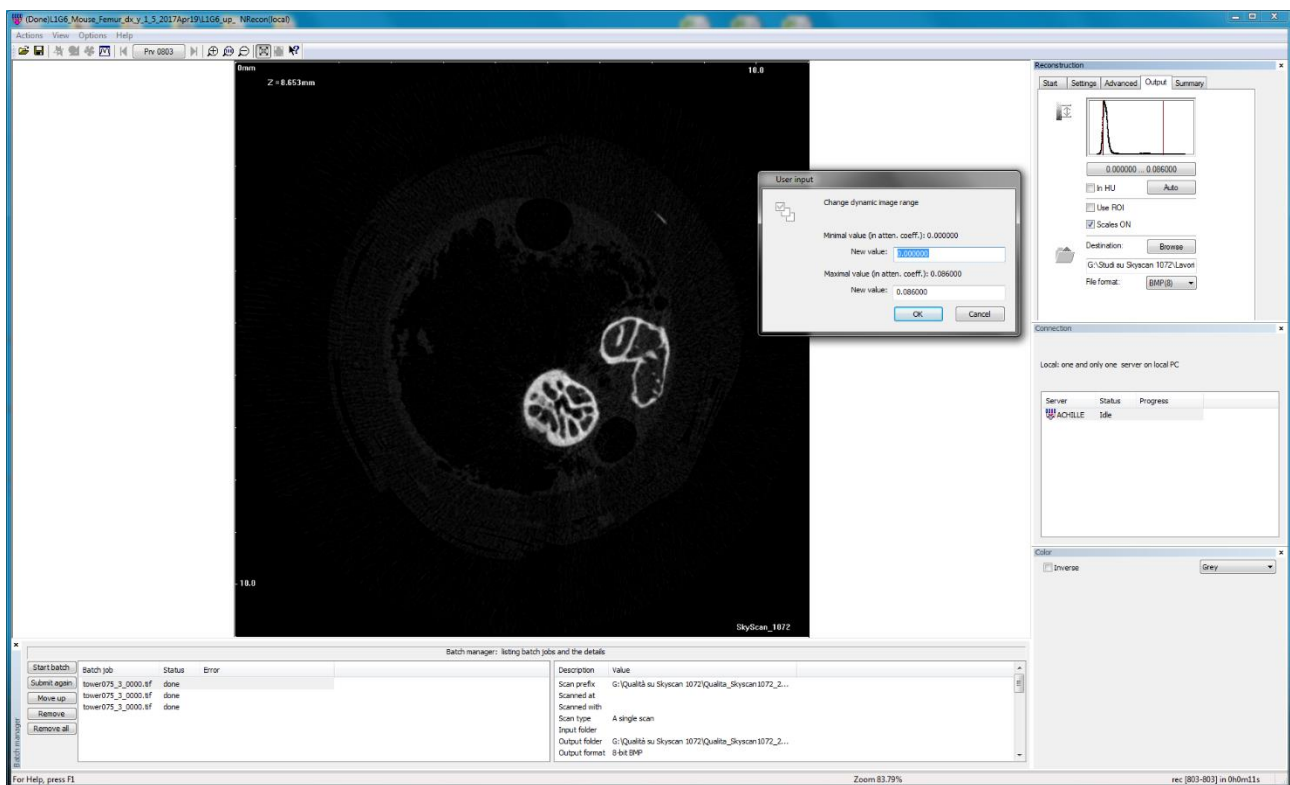


Figura 81: Settaggio del Dynamic image range in NRecon.



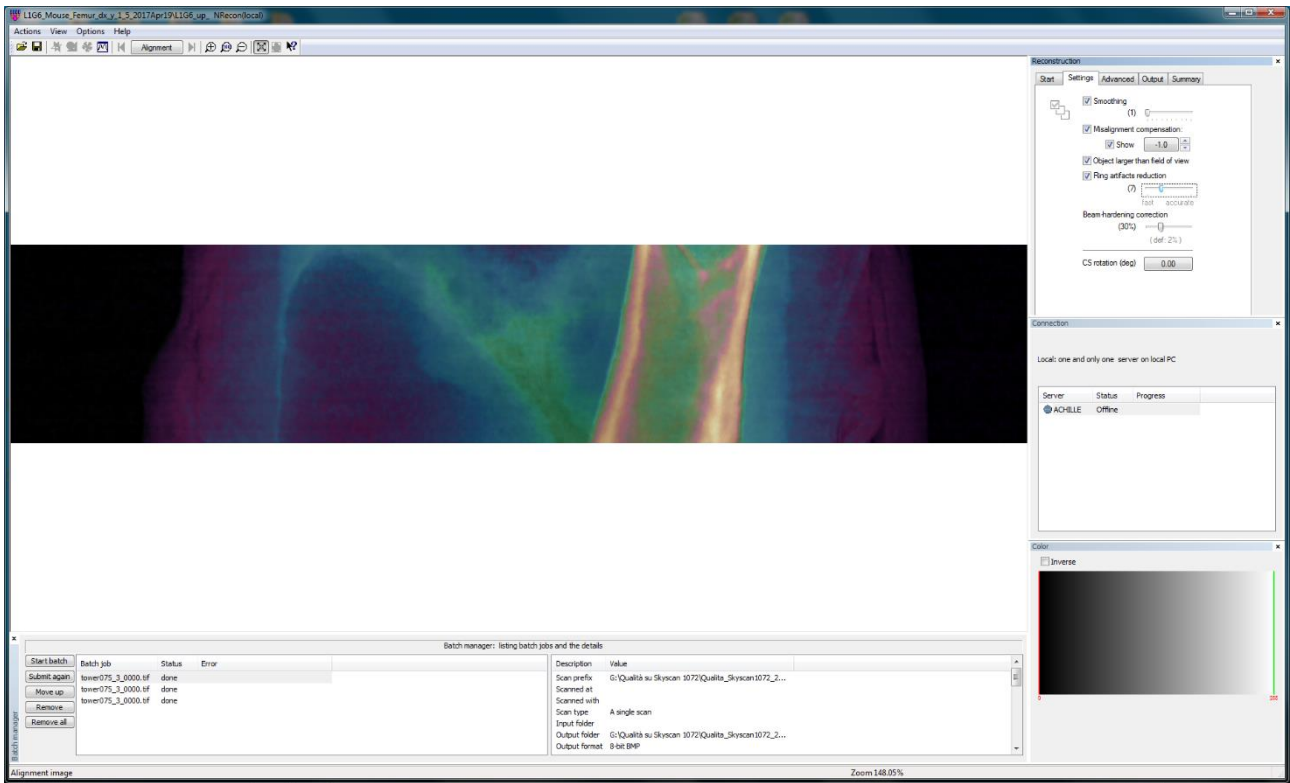


Figura 82: Settaggio dei parametri: Ring Artifact e BHC.

La cartella di destinazione conterrà tutto il dataset ricostruito in formato BMP.

## Unione di due dataset

Tramite DataViewer, si aprono in due finestre differenti i dataset up e down e si ricerca la fetta comune ai due a partire da un artefatto di riferimento presente nelle immagini. Avendo tenuto traccia di quale sia la fetta comune nei due dataset, si procede alla registrazione che fornirà i dati x e y di riferimento per effettuare la trasformazione geometrica su CT-Analyser.

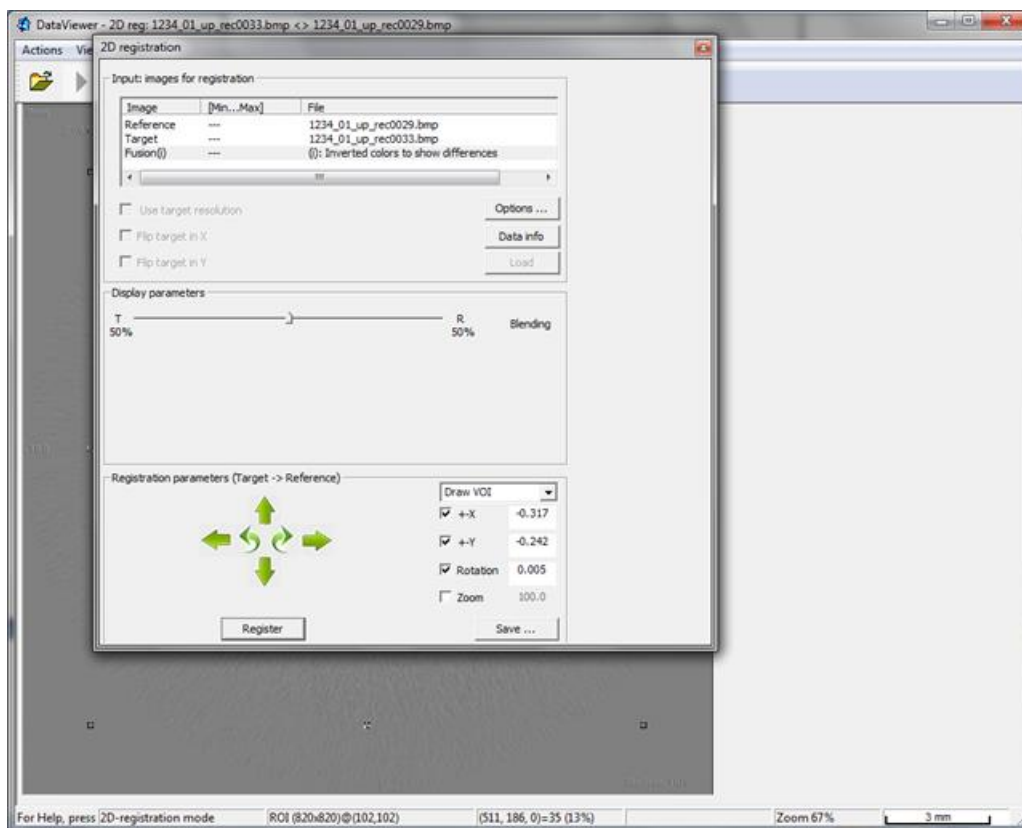


Figura 83: Finestra per la 2D registration con i valori X e Y da utilizzare nella traslazione geometrica.

Da questa operazione viene creata una cartella contenente i file .bmp traslati utili all'unione.

Si creerà una nuova cartella che conterrà le fette down, dalla prima alla successiva quella in comune, e le fette up, dalla precedente quella in comune all'ultima. Se i file sono stati scelti correttamente, all'interno della cartella di unione saranno presenti circa 1520 file.

Bisognerà ora procedere alla rinomina delle immagini in modo che vengano riconosciuti come parte di un unico dataset; per far questo si utilizzeranno i comandi batch in Excel.

## Segmentazione e calcolo dei parametri morfometrici

Prima di procedere al calcolo dei parametri morfometrici, bisogna segmentare le immagini, ovvero separare ciò che è osso da ciò che non lo è.

Questa separazione, chiamata anche “segmentazione”, “sogliatura” o “binarizzazione”, ha come risultato un’immagine composta unicamente da pixel bianchi o neri. Nel nostro caso si è scelto un metodo di sogliatura globale con valori che vanno da 117 a 255; li imposteremo prima di far partire i calcoli.

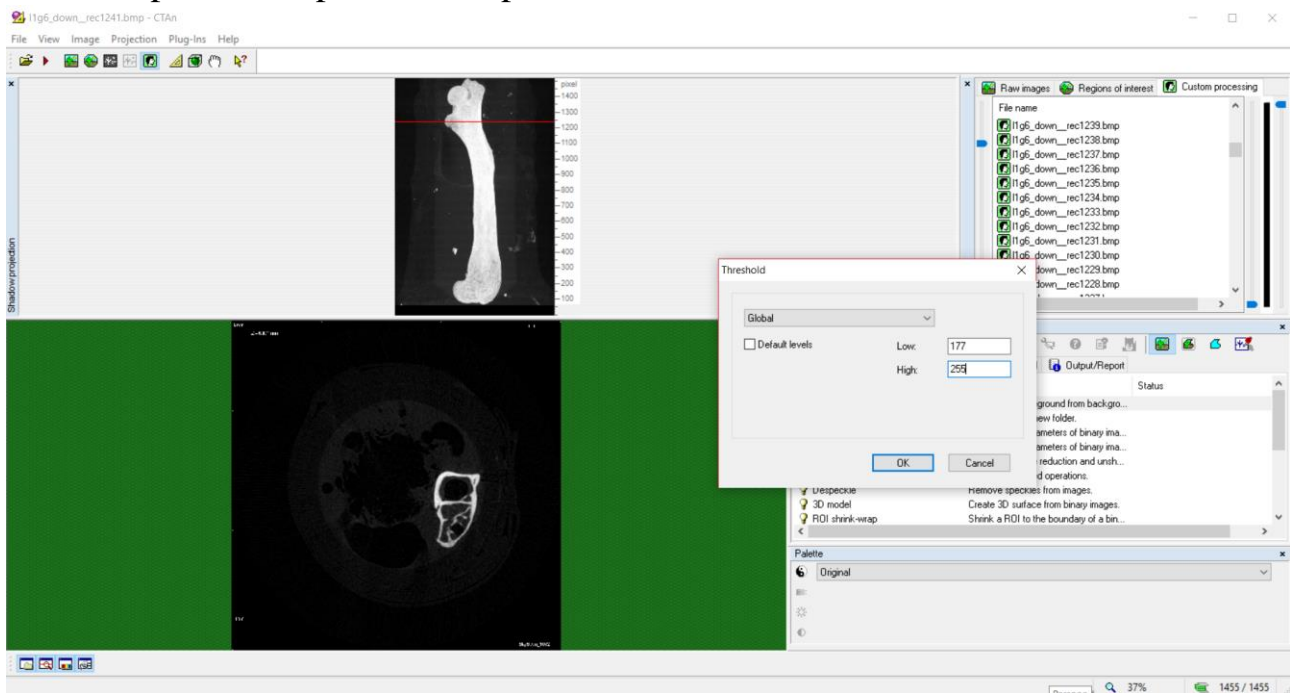
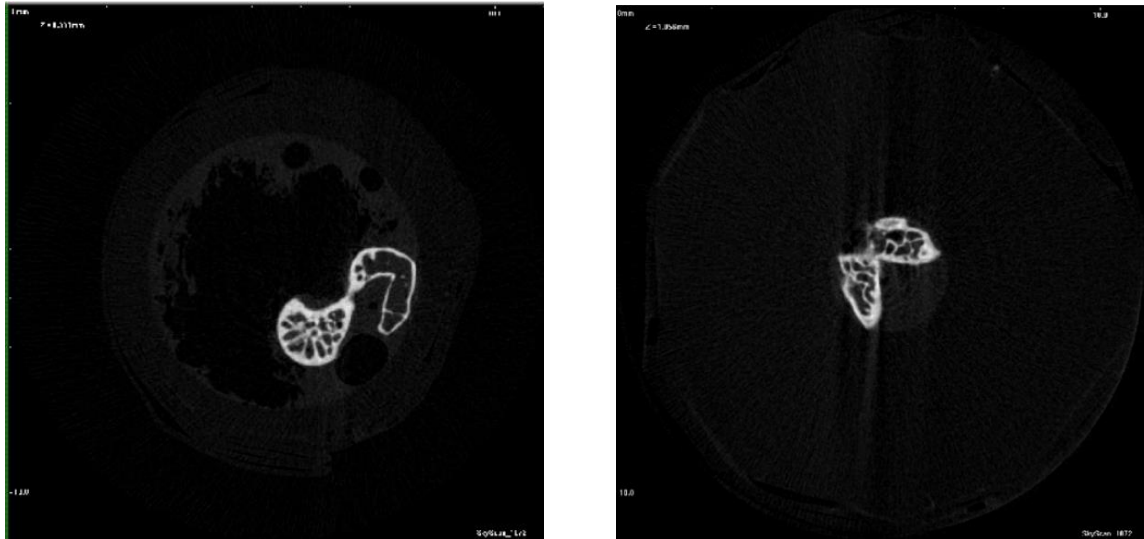


Figura 84: Impostazione dei valori min e max di sogliatura globale in CT-Analys.



Figura 85: Come appare l'immagine dopo aver effettuato l'operazione di sogliatura.

Per l'analisi dell'osso corticale si apre il dataset con CT-Analyser e per prima cosa si misura la lunghezza biomeccanica del femore considerando la prima fetta in cui si inizia a vedere tutto il collo e l'ultima fetta in cui si vedono entrambi i condili compresi di sella; per chiarezza si riportano delle immagini esempio di riferimento.



*Figura 86: A sinistra prima fetta da considerare per la misura della lunghezza biomeccanica, è presente tutto il collo. A destra ultima fetta da considerare in cui sono presenti i condili compresi di sella.*

Il volume utilizzato per l'analisi verrà definito impostando le fette top e bottom spostandoci 2.5 mm sopra e sotto a partire dalla fetta centrale (metà lunghezza biomeccanica).



*Figura 87: Come appare il femore in seguito a ricostruzione ed unione dei dataset.*

A questo punto possiamo selezionare manualmente la ROI andando ad evidenziare la sola zona corticale nelle fette top, bottom e middle.

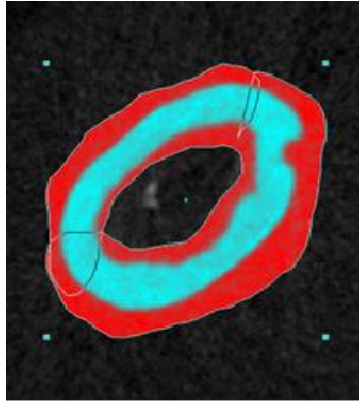


Figura 88: Selezione manuale della ROI per l'analisi corticale.

Per il nuovo dataset, salvato a partire dalle ROI, si effettueranno i calcoli. Per l'analisi dell'osso trabecolare si selezioneranno come fette top e bottom quelle corrispondenti alla prima fetta in cui scompare la cartilagine di accrescimento e all'ultima fetta in cui è presente del trabecolare.

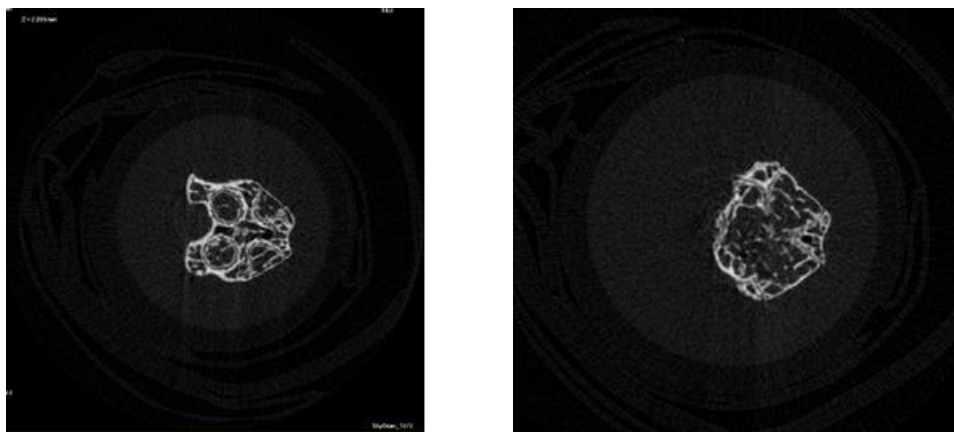


Figura 89: A sinistra fetta da NON considerare per l'analisi. A destra invece un esempio di fetta da ricercare, in cui scompare la cartilagine di accrescimento.

Si selezionano manualmente le ROI in cui sono presenti le trabecole nelle fette top, bottom, middle e a partire da questo nuovo dataset di ROI si effettueranno i calcoli di base e addizionali per l'osso trabecolare.

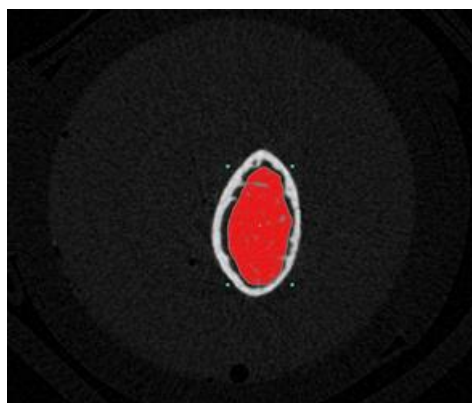


Figura 90: Selezione manuale della ROI per l'analisi trabecolare.

# CAPITOLO 8

## Rendering 3D

Il rendering è un processo tramite il quale viene prodotta una rappresentazione tridimensionale di un oggetto o di un'architettura. Grazie al rendering diventa possibile realizzare delle presentazioni, efficaci all'indagine, dei campioni da investigare riducendo la necessità di prototipi.

Le immagini generate possono essere usate per più scopi, da persone diverse, senza danneggiare i campioni.

Finora ci siamo serviti del plug-in di CT-Analyser per l'analisi 3D al fine di indagare lo spessore delle strutture o la distribuzione di separazione delle trabecole, ma questo non fornisce alcuna rappresentazione visiva di come queste strutture siano distribuite all'interno del campione. Una soluzione a questo consiste nel creare un modello volumetrico color-coded in 3D utilizzando CT-Vox.

L'operazione è svolta in 2 step:

- A partire dalle scansioni, creazione di immagini color-coded in CT-Analyser tramite analisi 3D;
- Creazione del modello 3D in CT-Vox.

### **Creazione immagini color-coded in CT-Analyser**

L'analisi inizia decidendo una appropriata regione di interesse se richiesto, seguito da sogliatura, specifica per il dataset da processare.

Nel nostro caso si è scelta una sogliatura globale nell'intervallo 117-255.

A questo punto si può procedere con la creazione delle immagini in codice colore per lo spessore o separazione delle strutture; questa funzione è disponibile per il plug-in dell'analisi 3D nel *custom processing tab* di CT-Analyser.

Come mostrato nella figura sottostante, andremo a selezionare non solo i valori addizionali per l'analisi 3D, quali Trabecular thickness e/o Trabecular separation, ma chiederemo al programma di salvare le immagini in codice colore, nelle quali, a seconda dello spessore verrà usata una tonalità di colore diversa.

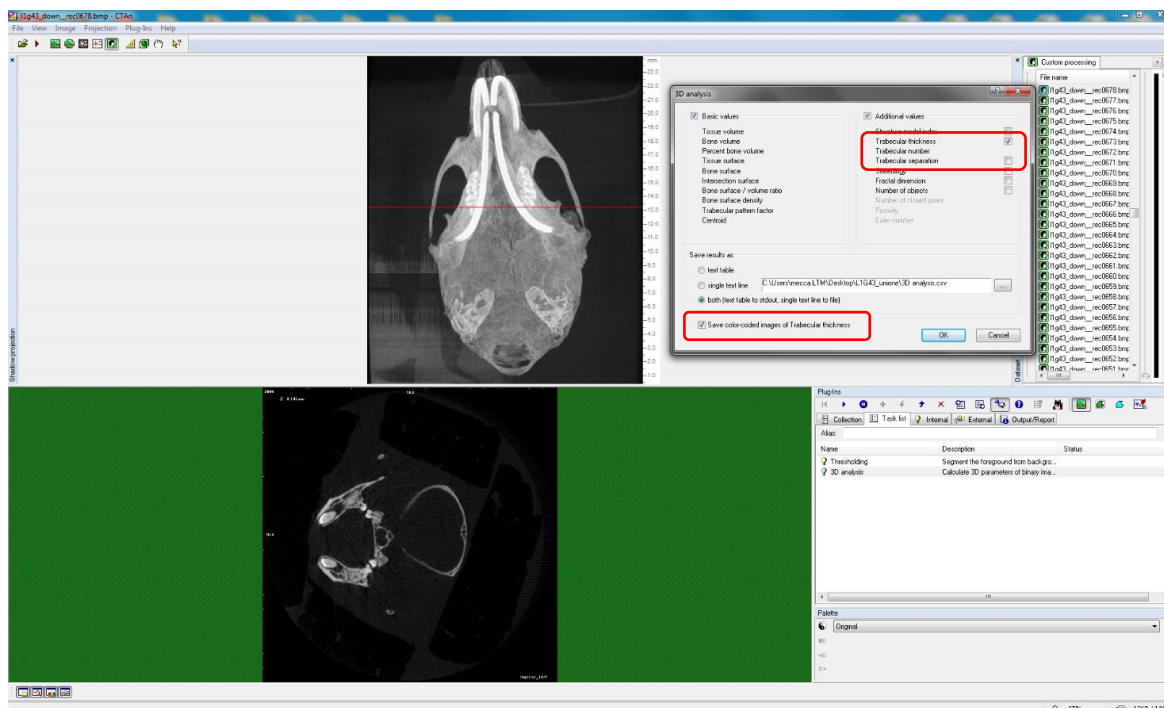


Figura 91: Panoramica in CT-Analyser per le impostazioni delle analisi 2D e 3D con l'opzione di salvataggio in color-coded.

Il risultato di questa operazione è un nuovo dataset, che può nuovamente essere aperto in CT-Analyser. Le immagini in scala di grigio appariranno come immagini nere, uniformi. Tuttavia, cambiando la *Palette* in scala a colori e settando, nel menù delle preferenze (*tools tab*), i cursori in *color density range*, si otterranno delle immagini in codice colore, più facilmente interpretabili.

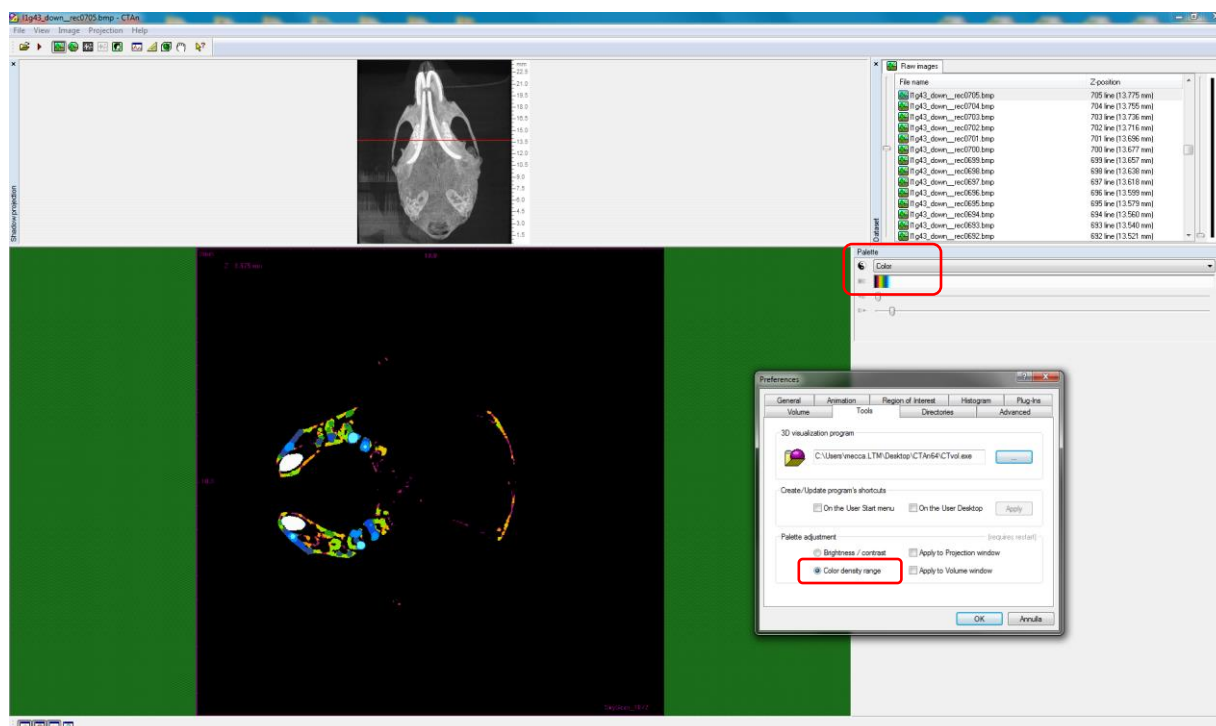


Figura 92: Panoramica in CT-Analyser con settaggio della palette.

Ovviamente il range può essere cambiato, comprimendolo, per ottenere un'immagine nella quale differenti colori codificano per un differente spessore di struttura. A questo punto le immagini sono pronte per lo step successivo.

## Creazione del modello 3D in CT-Vox

Si apre il dataset prodotto in precedenza con CT-Vox; come si noterà, ora l'istogramma non corrisponde assolutamente all'istogramma in scala di grigi del dataset, ma a quello degli spessori. Ogni classe numerica dell'istogramma di distribuzione degli spessori è così rappresentata da un valore di "grigio".

L'impostazione di una funzione di trasferimento ( $TF$ ) si riduce quindi all'assegnazione di un gradiente di colore in base allo spessore della struttura.

Per definire al meglio la funzione di trasferimento per gli spessori, è stato necessario allungare l'asse orizzontale del grafico della  $TF$ , fornendo un'immagine più dettagliata anche per gli spessori a più basse densità.

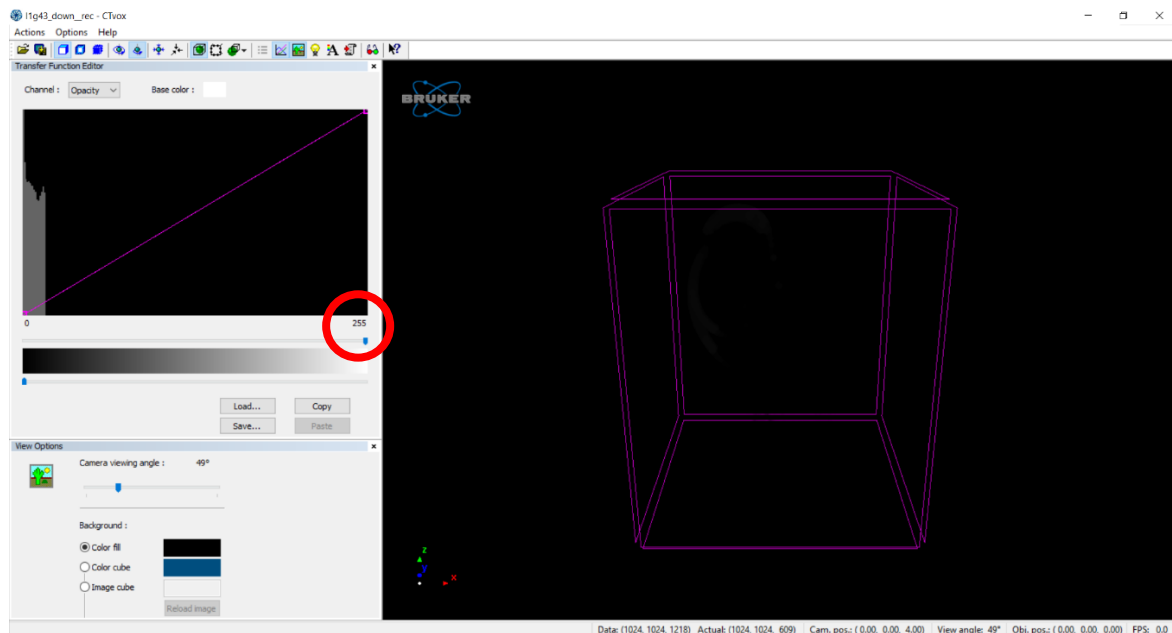


Figura 93: Panoramica iniziale di CT-Vox.

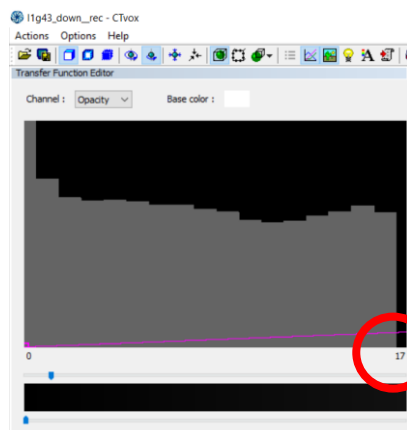
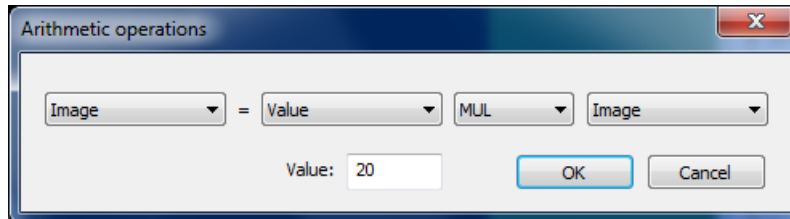


Figura 94: Estensione dell'istogramma per un maggior dettaglio degli spessori a basse densità.

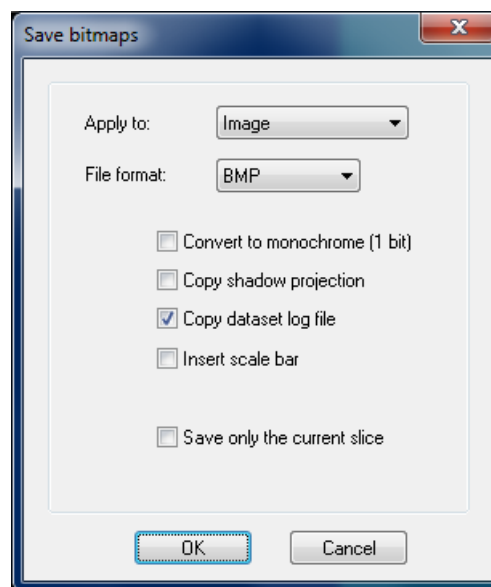


Una soluzione alternativa per concentrare i gradienti della funzione di trasferimento su valori molto bassi della scala di grigi, è quella di espandere questo istogramma e semplificare l'impostazione della TF. Questo può essere fatto in CT-Analyser all'interno della *custom processing tab*, usando le funzioni aritmetiche.

L'immagine sottostante mostra una schermata di esempio in cui la funzione aritmetica "MUL" (moltiplicato) è stata applicata per moltiplicare i valori dell'istogramma con un fattore 20.



In seguito, si ricordi di salvare il nuovo dataset eseguendo il plugin *save bitmaps*.



Il nuovo dataset può essere nuovamente aperto con CT-Vox per creare il modello 3D in codice colore per gli spessori.

Dopo aver stabilito la giusta visualizzazione dell'istogramma, andremo a modificare manualmente le curve della TF.

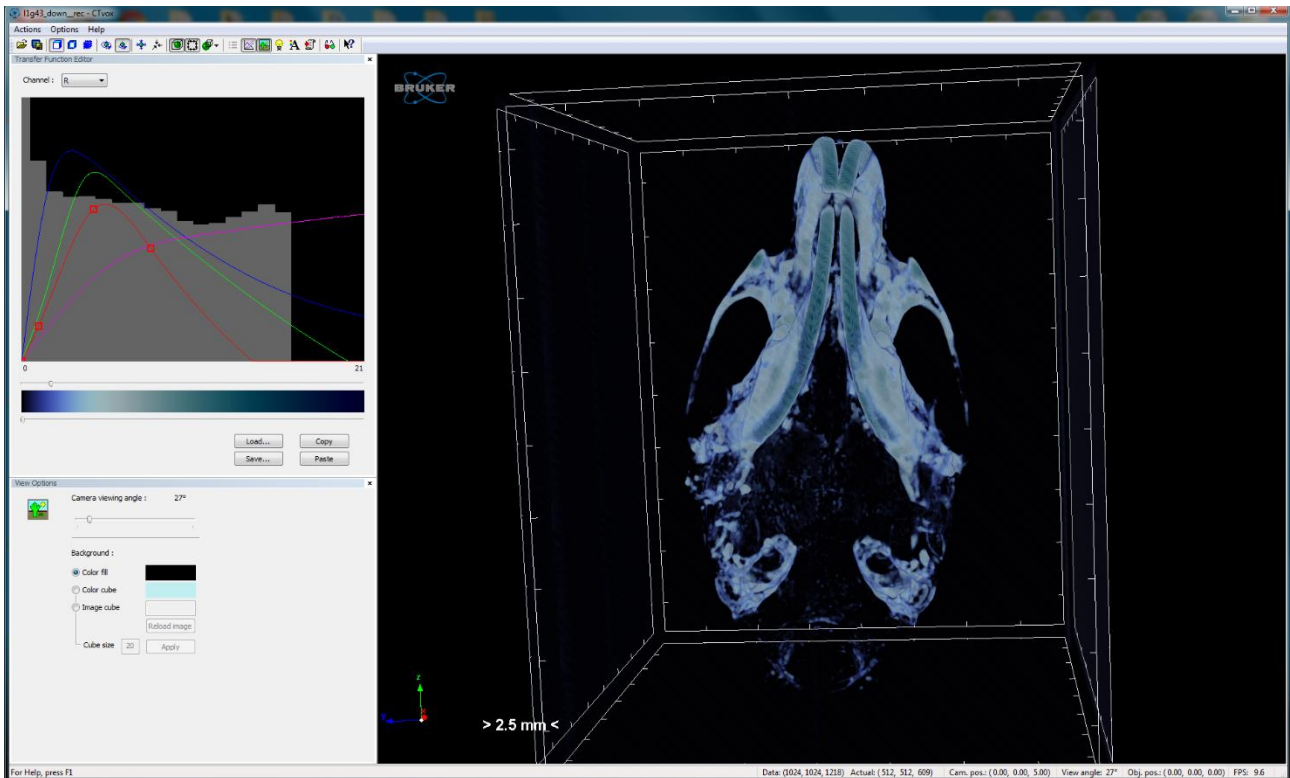


Figura 95: Come appare il campione in seguito a modifica delle curve della Transfer Function.

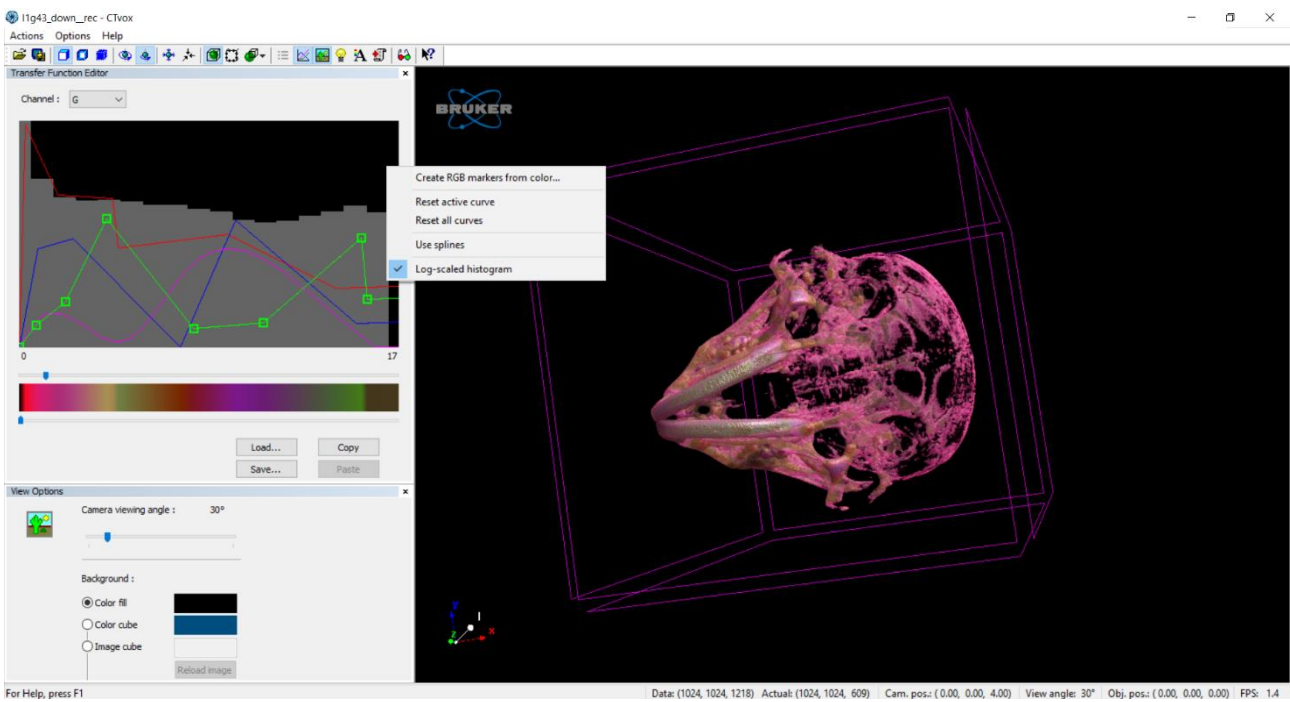


Figura 96: Tipologia di curve per personalizzare la TF e menù a tendina per le impostazioni nell'editor.

Per ogni componente RGB ed Opacity, si può scegliere se usare una curva morbida (*Use splines*) o segmentata, a discrezione dell'utente, e decidere la colorazione voluta tramite creazione manuale del marker o selezionandolo dalla palette di colori (*Create RGB marker from color...*).

In presenza di più campioni dello stesso tipo e volendo fare un'analisi di confronto tra gli stessi, è possibile salvare la *TF* in modo da riproporla ad ogni campione e apprezzare le differenze morfometriche con più facilità.

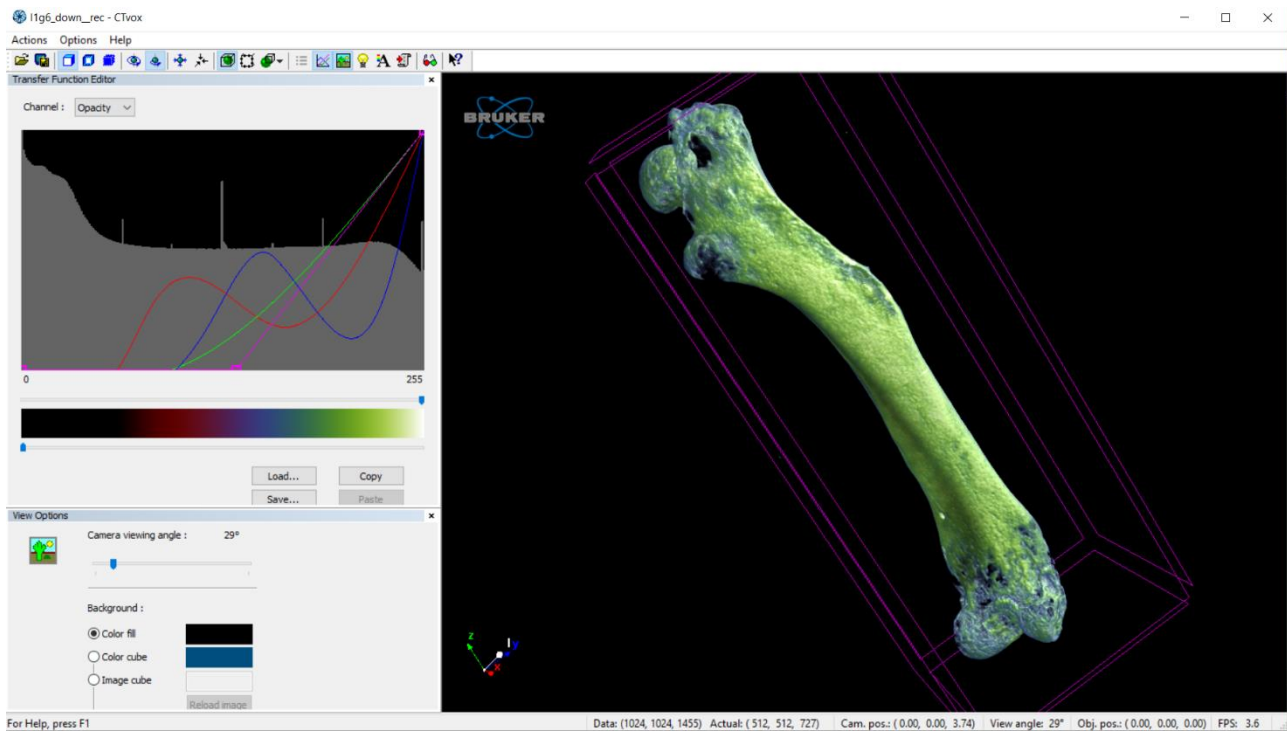


Figura 97: Rappresentazione 3D del femore.

Nel rendering classico, a ogni voxel viene assegnato un colore di emissione (il colore che il voxel manifesta, determinato dai componenti rosso (R), verde (G) e blu (B)) e un'opacità (l'opacità è l'opposto della trasparenza). Entrambi, ovviamente, dipendono dai dati del volume originale e la mappatura è governata dalla cosiddetta funzione di trasferimento. L'asse orizzontale nel grafico rappresenta i dati scalari originali (l'attenuazione dei raggi X), l'asse verticale rappresenta uno dei componenti della funzione di trasferimento (R, G, B, L, Opacità). La modifica dell'opacità controlla la visibilità dei voxel corrispondenti e quanto essi oscurano i voxel più distanti. Impostando l'opacità per un dato intervallo di intensità a zero (piena trasparenza), i voxel corrispondenti vengono effettivamente resi invisibili. I canali di colore possono essere collegati (ottenendo il canale L [per luminanza]), nel qual caso solo i valori di grigio appariranno nell'immagine, o controllati indipendentemente (canali R, G e B), consentendo di introdurre il colore nell'immagine.

Solitamente le basse intensità dominano la distribuzione (a causa del rumore e di altri contributi) e l'istogramma viene visualizzato meglio utilizzando una scala logaritmica: cliccando col tasto destro del mouse nella finestra della funzione di trasferimento.

Questi contributi a bassa intensità, che dominano la periferia delle immagini ricostruite, tendono ad oscurare il nucleo dei dati del volume; pertanto, di solito è utile sopprimere in una certa misura, queste basse intensità nel rendering, rendendole trasparenti. Un esempio è mostrato nelle immagini sottostanti.

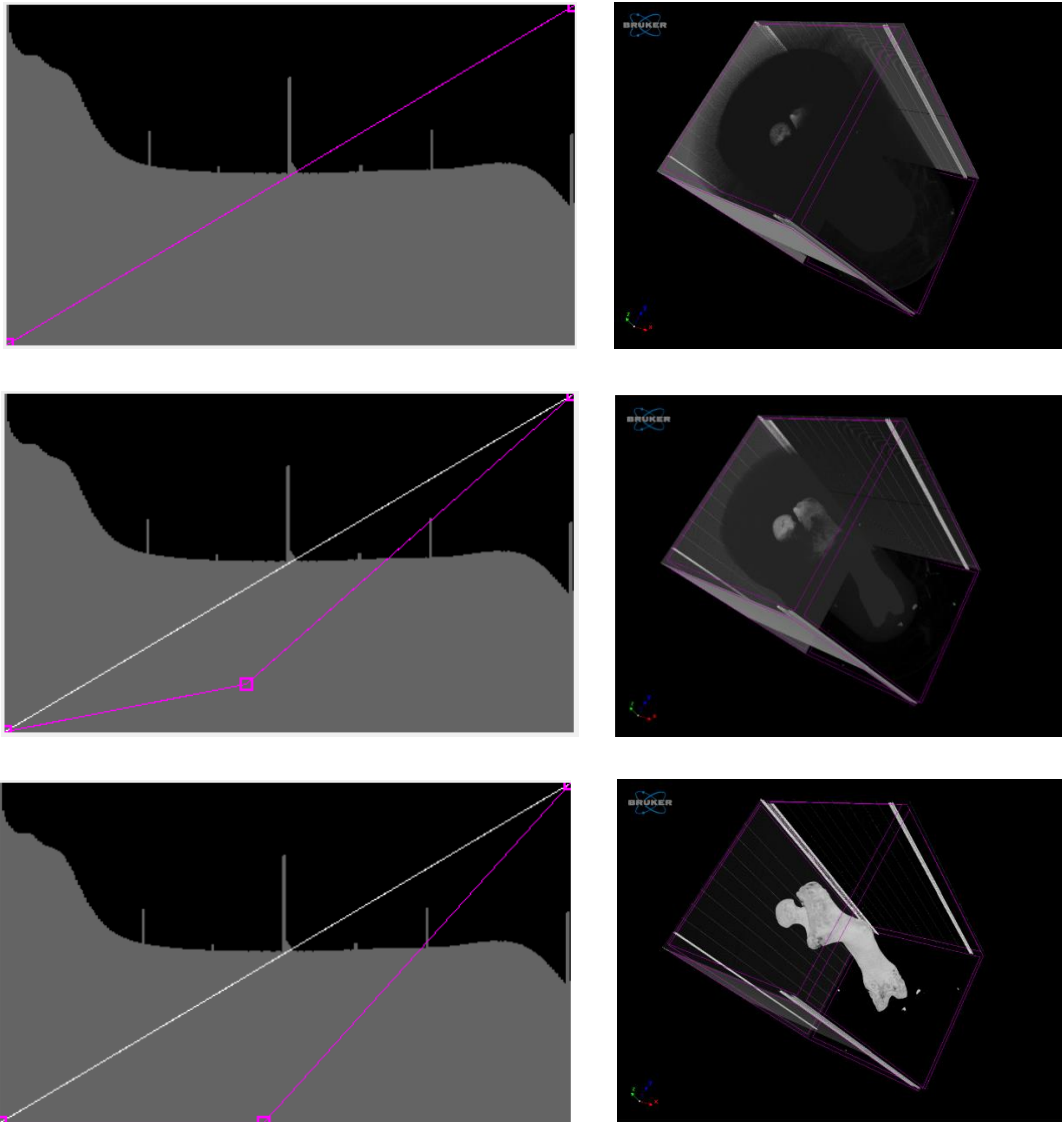


Figura 98: Sul lato sinistro vengono riportati gli istogrammi con le curve di Luminosità (bianca) e Opacità (viola). Sulla destra si mostra come modificando la curva di opacità il campione emerge nella visualizzazione.

Possono anche essere aggiunti alla scena effetti di luce: tali effetti aumentano il realismo dell'immagine risultante fornendo ulteriori spunti di profondità, migliorando le strutture su piccola scala.

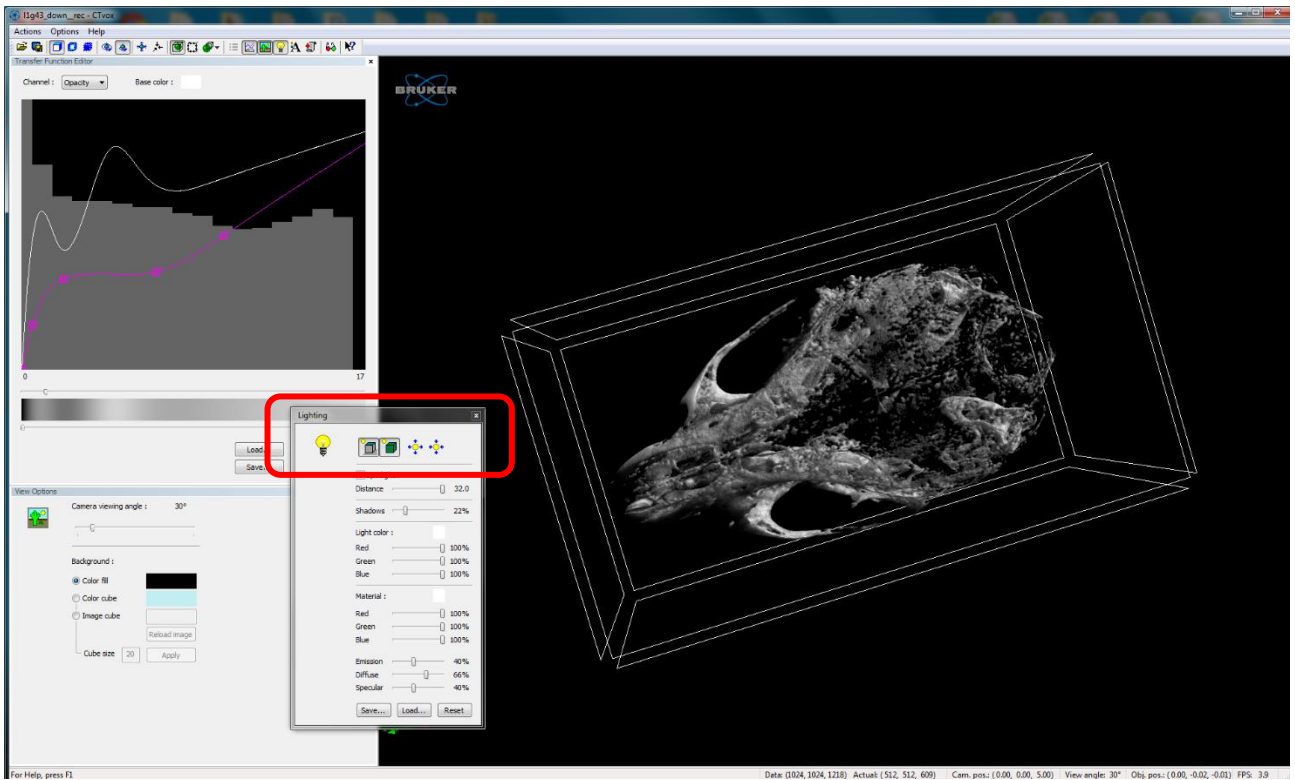


Figura 99: Finestra per la modifica del Lighting con conseguente risultato su cranio murino.

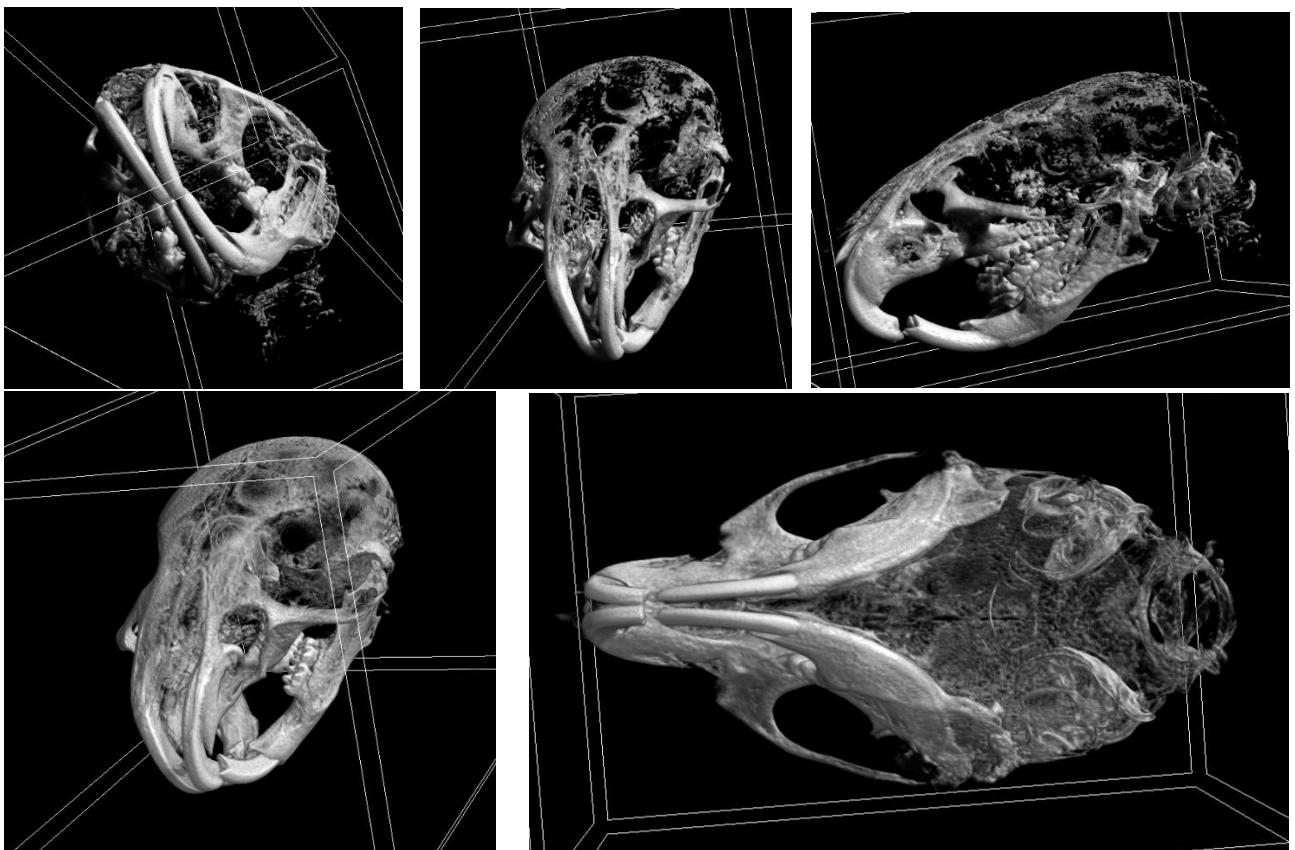


Figura 100: Esempi di rappresentazione per il cranio a diverse angolazioni.

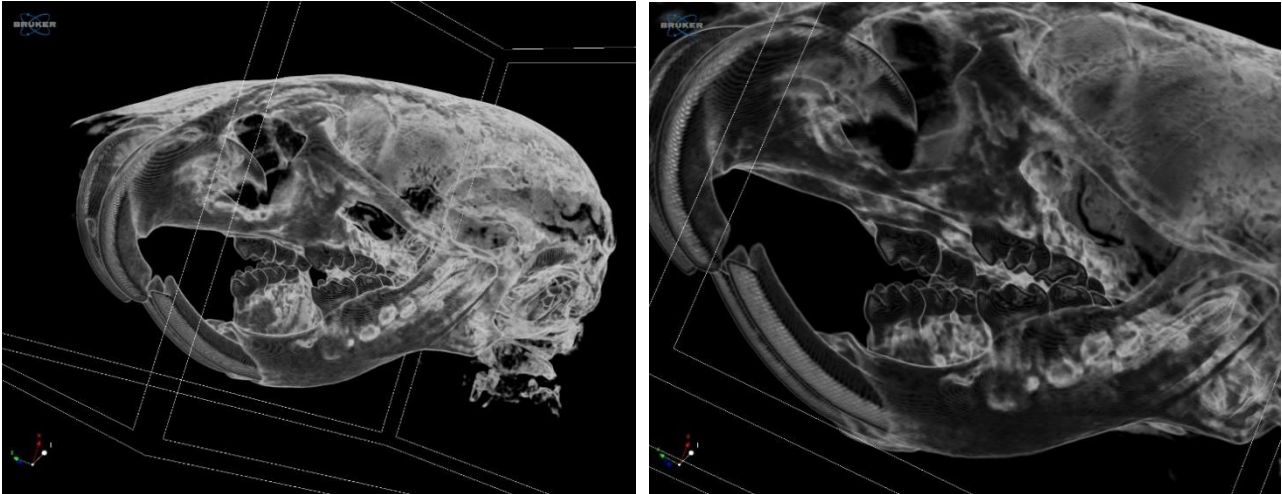


Figura 101: Effetto della modifica nella luminosità sul cranio, con zoom sulla dentatura.

CT-Vox supporta il rendering multivolume: ogni volume mantiene la propria funzione di trasferimento e i contributi dei vari volumi sono ponderati per produrre un colore di emissione combinato e un'opacità combinata.  
 Il comando è: Actions->Load Volume->Add  
 Dalla finestra risultante si può decidere quanto e quale volume visualizzare maggiormente (%).

Volume Manager					
	<input checked="" type="checkbox"/>	Volume	%	Color	Cut/clip
1	<input checked="" type="checkbox"/>	11g9_up__rec	50		None
2	<input checked="" type="checkbox"/>	11g43_down__rec	50	Red	None

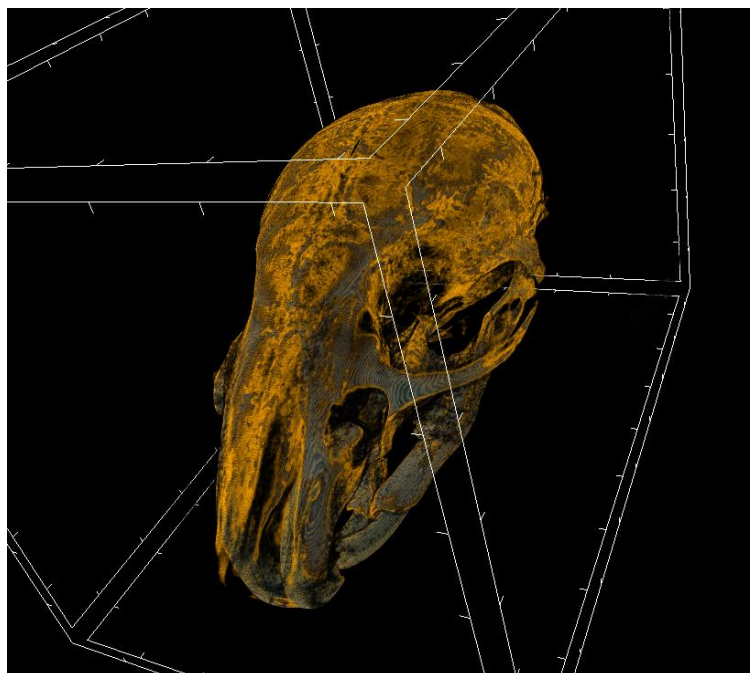


Figura 102: Cranio murino nella combinazione di due volumi, di cui uno è il dataset in color-coded.

Per approfondire le indagini è inoltre possibile effettuare dei tagli virtuali del campione sui sei lati del parallelepipedo che lo racchiude e indagare ad esempio, come è avvenuto per il femore, la struttura ossea trabecolare.

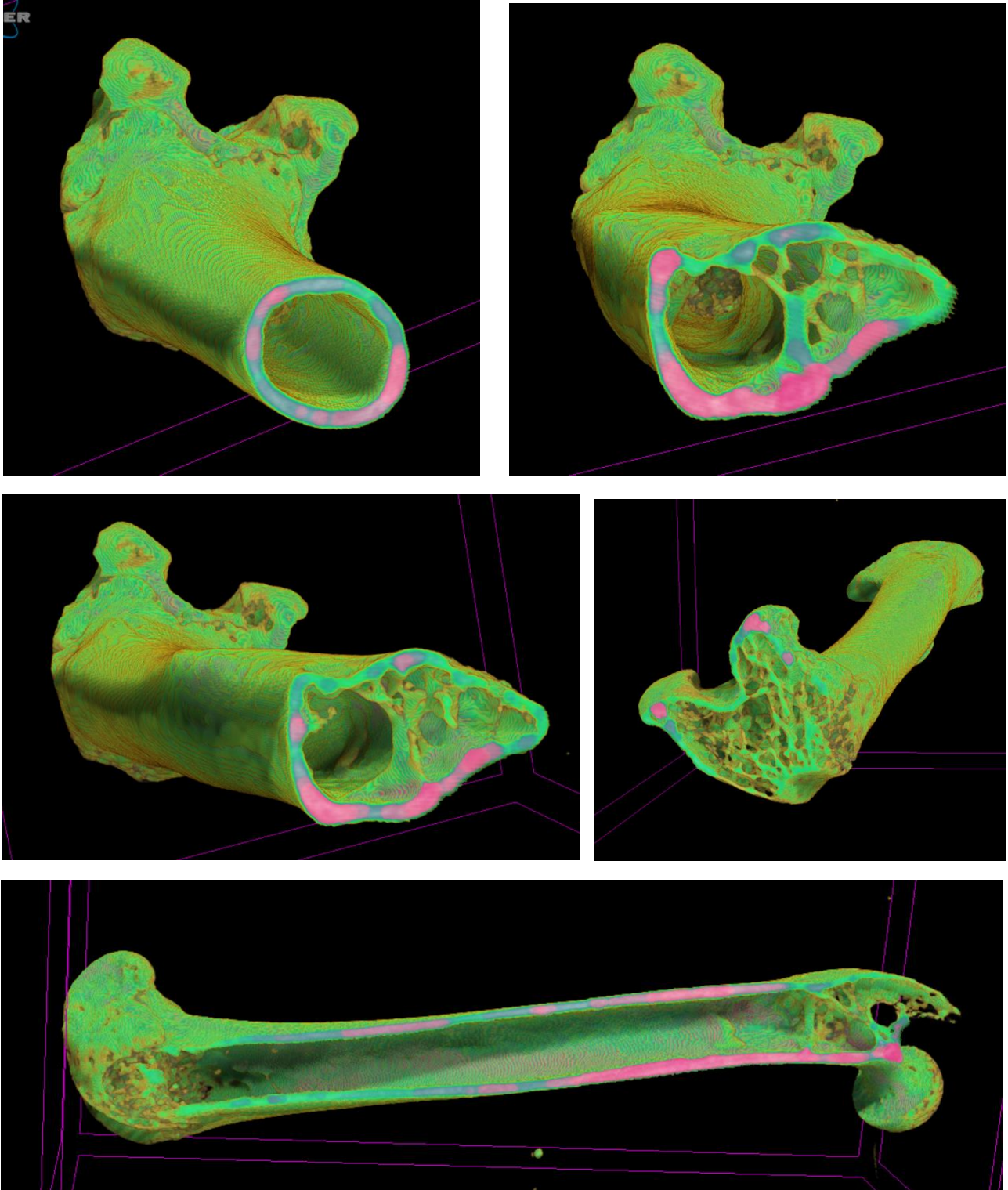


Figura 103: Esempi di rappresentazione del femore con tagli virtuali per ulteriori indagini delle strutture ossee.

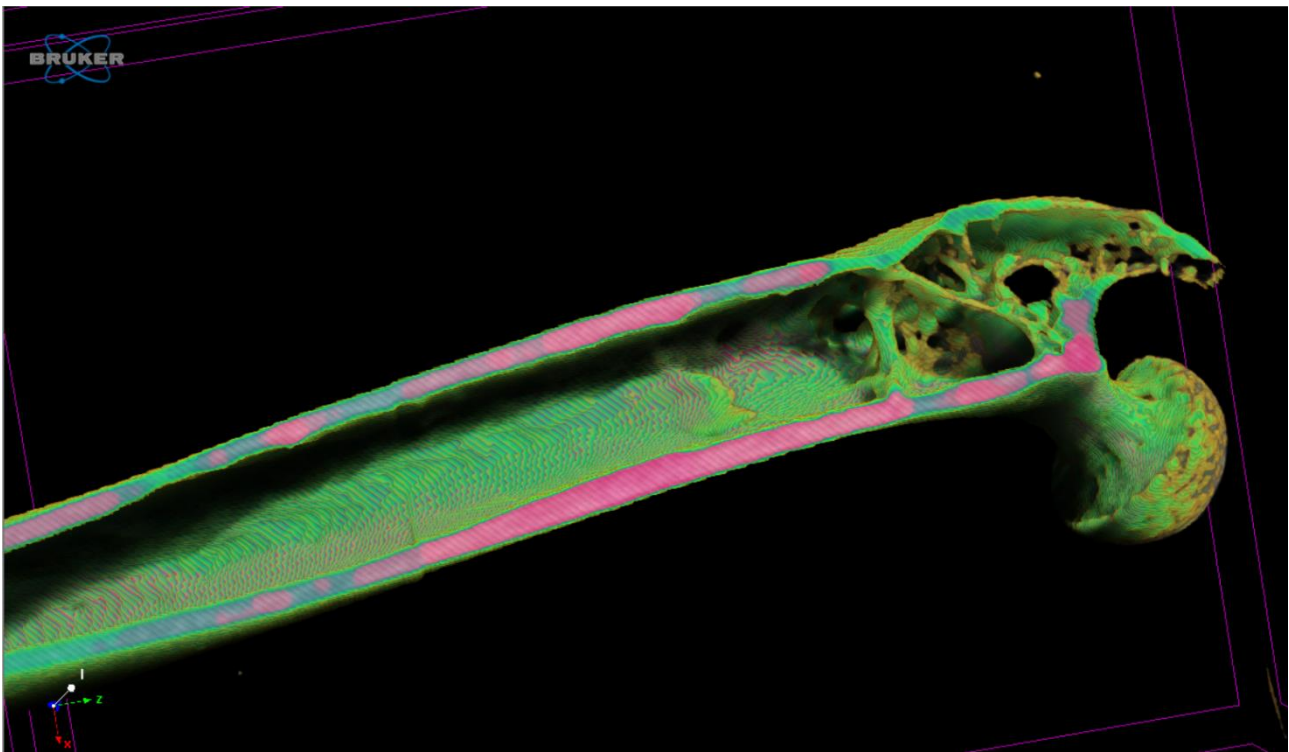


Figura 104: Particolare del femore tagliato con dettaglio trabecolare.

Sebbene sia un software molto versatile, resta nella capacità del singolo utente la possibilità di apprezzare un dettaglio piuttosto che un altro, dovendo agire manualmente sulle curve *RGB*, *L* e *Opacity* della Transfer Function.



# Conclusioni

Il primo obiettivo di questo lavoro, svolto presso il Laboratorio di Tecnologia Medica (LTM) dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR, Bologna), è stato quello di definire e applicare una procedura di controllo della qualità per misure effettuate su scansioni micro-CT di segmenti ossei di un modello murino per la progeria.

Questo lavoro è poi proseguito analizzando la procedura di imaging utilizzata per le misurazioni morfometriche e densitometriche su segmenti ossei murini di particolare interesse per la progeria, quali il femore e il cranio.

Il modello animale che replica questa rara patologia genetica, presenta particolari difficoltà legate alle pesanti modificazioni dello scheletro e l'uso della micro-CT ci permette di caratterizzare la struttura ossea trabecolare e corticale in maniera accurata. La valorizzazione delle scansioni microtomografiche per il femore e il cranio del modello animale analizzati, è stata attuata presentando e applicando una procedura di rappresentazione 3D con opportune tecniche di rendering, usando i software messi a disposizione dalla casa produttrice Bruker del microtomografo Skyscan 1072 utilizzato nell'intero studio.

Sono stati investigati i rendering più rappresentativi per il femore e il cranio. La morfologia più complessa e articolata del cranio murino, rispetto a quella semplice e lineare del femore, si presta molto all'indagine tramite rappresentazione tridimensionale.

La riproduzione 3D del cranio permette all'operatore di apprezzare visivamente particolari, altrimenti trascurabili, andando a modificare le curve presenti nell'istogramma e combinando volumi, come è stato fatto per le immagini in color-coded degli spessori trabecolari.

Sebbene il software utilizzato sia molto versatile, resta nella capacità del singolo utente la possibilità di apprezzare un dettaglio piuttosto che un altro, dovendo agire manualmente sui parametri di visualizzazione investigati.

In conclusione, si conferma che la micro-CT risulta un valido strumento per investigare con grande dettaglio la struttura tridimensionale dei campioni ossei, fornendo una caratterizzazione quantitativa della microarchitettura in alta risoluzione e in maniera assolutamente non distruttiva.

# Bibliografia

- [1] Bergo M. O., Gavino B., Ross J., Schmidt W. K., Hong C., Kendall L. V., Mohr A., Meta M., Genant H., Jiang Y., Wisner E. R., van Bruggen N., Carano R. A. D., Michaelis S., Griffey S. M., Young S. G. (2002) *Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect*. PNAS, Vol. 99, no. 20: 13049–13054.
- [2] Bertrand L., Cotte M., Stambanoni M., Thoury M., Marone F., Schöder S. (2012) *Development and trends in synchrotron studies of ancient and historical materials*. Physics Reports 519: 51–96.
- [3] Besler B. A., Sondergaard R. E., Müller R., Stok K. S. (2015) *Reproducibility of compartmental subchondral bone morphometry in the mouse tibiofemoral joint*. Bone 81: 649–653.
- [4] Bouxsein M. L., Boyd S. K., Christiansen B. A., Guldberg R. E., Jepsen K. J., Muller R. (2010) *Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography*. Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 25, No. 7: 1468–1486.
- [5] Brooks R. A., Di Chiro G. (1976) *Beam hardening in x-ray reconstructive tomography*. Phys. Med. Biol. 21: 390-398.
- [6] Buckwalter J. A., Glimcher M. J., Cooper R. R., Recker R. (1996) *Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. Instructional Course Lectures 45: 371–86.
- [7] Buie H.R., Moore C.P., Boyd S.K. (2008) *Postpubertal architectural developmental patterns differ between the L3 vertebra and proximal tibia in three inbred strains of mice*. J. Bone Miner. Res. 23: 2048–2059.
- [8] Burghardt A.J., Kazakia G.J., Laib A., Majumdar S. (2008) *Quantitative assessment of bone tissue mineralization with polychromatic micro-computed tomography*. Calcif. Tissue Int, Vol 83: 129-138.
- [9] Burr D. B., Martin R. B., Schaffler M. B., Radin E. L. (1985) *Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage*. J. Biomech. 18: 189-200.
- [10] Cetin Celenk and Peruze Celenk (2012). *Bone Density Measurement Using Computed Tomography*. Computed Tomography - Clinical Applications, Dr. Luca Saba (Ed.)
- [11] Chappard D., Retailleau-Gaborit N., Legrand E., Basle M. F., Audran M. (2005) *Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT*. J Bone Miner Res. 20:1177–1184
- [12] Christiansen B. A., Bouxsein M. L. (2008) *Assessment of bone mass and microarchitecture in rodents*. In Rosen CJ, ed. Primer on Metabolic Bone

- Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 7th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research: 38–44.
- [13] Cooper D., Turinsky A., Sensen C., Hallgrímsson B. (2007) *Effect of Voxel Size on 3D Micro-CT Analysis of Cortical Bone Porosity*. *Calcif Tissue Int* 80: 211–219.
- [14] Cowin S. (2001) *Bone Mechanics Handbook*. Second edition, CRC Press, Boca Raton, USA.
- [15] Cowin S., Telega J. (2003). *Bone Mechanics Handbook*. 2nd Edition. Applied Mechanics Reviews, Vol. 56, p. B61.
- [16] Currey J. D. (1984) *What should bones be designed to do?* *Calcif. Tissue Int.* 36 Suppl 1, S7-10.
- [17] Currey J. D. (2003) *The many adaptations of bone*. *J Biomech* 36: 1487-1495.
- [18] Day J.S., Ding M., Odgaard A., Sumner D.R., Hvid I., Weinans H. (2000) *Parallel plate model for trabecular bone exhibits volume fraction dependent bias*. *Bone* 27: 715–720.
- [19] de Carlos F., Varela I., Germanà A., Montalbano G., Freije J. M. P., Vega J. A., López-Otin C., Cobo J. M. (2008) *Microcephalia with mandibular and dental dysplasia in adult Zmpste24-deficient mice*. *J. Anat.* 213: 509–519.
- [20] Dempster D. W. (2000) *The contribution of trabecular architecture to cancellous bone quality*. *J. Bone Miner. Res.* 15: 20-23.
- [21] Ding M., Hvid I. (2000) *Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone*. *Bone*, 26: 291–295.
- [22] Engelke K., Graeff W., Meiss L., Hahn M., Delling G. (1993) *High spatial resolution imaging of bone using computed microtomography: Comparison with microradiography and undecalcified histologic sections*. *J Invest Rad* 28: 341-349.
- [23] Fajardo R.J., Cory E., Patel N.D., Nazarian A., Laib A., Manoharan R.K., Schmitz J.E., DeSilva J.M., MacLatchy L.M., Snyder B.D., Bouxsein M.L. (2009) *Specimen size and porosity can introduce error into  $\mu$ CT-based tissue mineral density measurements*. *Bone* 44(1): 176–184.
- [24] Florencio-Silva R., Rodrigues da Silva Sasso G., Sasso-Cerri E., Simões M. J., Cerri P. S. (2015) *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *BioMed Research International* Volume, Article ID 421746.
- [25] Fong L.G., Ng J. K., Lammerding J., Vickers T. A., Meta M., Coté N., Gavino B., Qiao X., Chang S. Y., Young S.R., Yang S. H., Stewart C. L., Lee R. T., Bennett C. F., Bergo M. O., Young S. G. (2006) *Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina*, *J. Clin. Invest.* 116: 743–752.

- [26] Franz-Odenaal T. A., Hall B. K., Witten P. E. (2006). *Buried alive: How osteoblasts become osteocytes*. Developmental Dynamics.
- [27] Frost H. M. (1984) *Intermediary organization of skeleton*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- [28] Frost H. M. (1987) *Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal*. Anat Rec 219: 1-9.
- [29] Frost H. M. (1995) *Introduction to a new skeletal physiology*. Pajaro Group, Pueblo Vol. I and II.
- [30] Frost H. M., Jee W. S. (1994) *Perspectives: a vital biomechanical model of the endochondral ossification mechanism*. Anat Rec 240: 435-346.
- [31] Genant H. K., Cooper C., Poor G., Reid I., Ehrlich G., Kanis J., Nordin B. E., Barrett-Connor E., Black D., Bonjour J. P., Dawson-Hughes B., Delmas P. D., Dequeker J., Ragi Eis S., Gennari C., Johnell O. & et al. (1999) *Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis*. Osteoporos Int 10: 259-264.
- [32] Genant H. K., Engelke K., Prevrhal S. (2008) *Advanced CT bone imaging in osteoporosis*. Rheumatology 47: iv9–iv16.
- [33] Goulet R. W., Goldstein S. A., Ciarelli M. J., Kuhn J. L., Brown M. B., Feldkamp L. A. (1994) *The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone*. Journal of Biomechanics, 27(4): 375-377, 379-389.
- [34] Guglielmi G., Urbano F. (2004) *Diagnostica radiologica e densitometrica*. Riv. It. Ost. Gin., Vol 5: 259-265.
- [35] Hammersberg P., Mangard M. (1998) *Correction for beam hardening artefacts in computerized tomography*. Journal of X-ray Science and Technology, Vol 8: 75-93.
- [36] Hancox N. M. (1972) *The biology of bone*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [37] Hans D., Njeh C. F., Genant H. K., Meunier P. J. (1998) *Quantitative Ultrasound in Bone Status Assessment*. Rev Rhum 65: 7-9.
- [38] Harkema L., Youssef S. A., de Bruin A. (2016) *Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging*. Veterinary Pathology Vol. 53(2): 366-389.
- [39] Hemmatian H., Laurent M.R., Ghazanfari S., Vanderschueren D., Bakker A.D., Klein-Nulend J., van Lenthe G.H. (2017) *Accuracy and reproducibility of mouse cortical bone microporosity as quantified by desktop microcomputed tomography*. PLoS ONE 12(8): e0182996.
- [40] Herman G. T. (1979) *Correction for beam hardening in computed tomography*. Phys Med Biol 24, 81-106.

- [41]Hildebrand T., Laib A., Müller R., Dequeker J., Rüegegger P. (1999) *Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus*. J. Bone Miner. Res. 14: 1167–1174.
- [42]Hildebrand T., Rüegegger P. (1997) *A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images*. Journal of Microscopy, 185(1): 67–75.
- [43]Huang S., Chen L., Libina N., Janes J., Martin G. M., Campisi J., Oshima J. (2005) *Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference*. Hum Genet 118: 444–50.
- [44]Hubbel J. H., Seltzer S. M. (1995) *Tables of X-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients*. Gaithersburgh, MD, USA, NIST, US Department of Commerce. NISTIR 5632.
- [45]Jilka R. L. (2013) *The relevance of mouse models for investigating age-related bone loss in humans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 68(10): 1209–1217.
- [46]Kak A. C., Slaney M. (1999) *Principles of computerized tomographic imaging*. New York, USA.
- [47]Khandpur RS. Biomedical Instrumentation Technology and Applications, Mc GrawHill; Joseph D. Bronzino. The Biomedical Engineering Handbook, Medical Devices and System.
- [48]Kim D.G., Christopherson G.T., Dong X.N., Fyhrie D.P., Yeni Y.N. (2004) *The effect of microcomputed tomography scanning and reconstruction voxel size on the accuracy of stereological measurements in human cancellous bone*. Bone 35: 1375–1382.
- [49]Klinck R.J., Campbell G.M., Boyd S.K. (2008) *Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning*. Med. Eng. Phys. 30: 888–895.
- [50]Kohler T., Beyeler M., Webster D., Muller R. (2005) *Compartmental Bone Morphometry in the Mouse Femur: Reproducibility and Resolution Dependence of Microtomographic Measurements*. Calcif Tissue Int 77: 281–290.
- [51]Krane S. (1988) *Introductory nuclear physics*, John Wiley & Sons, USA.
- [52]Laperre K., Depypere M., van Gastel N., Torrekens S., Moermans K., Bogaerts R., Maes F., Carmeliet G. (2011) *Development of micro-CT protocols for in vivo follow-up of mouse bone architecture without major radiation side effects*. Bone 49: 613–622.
- [53]Liu Y., Saha P. K., Xu Z. (2012) *Quantitative characterization of trabecular bone micro-architecture using tensor scale and multi-detector CT imaging*. Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention: MICCAI ... International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, 15(Pt 1): 124–131.

- [54] Malluche H. H., Faugere M. C. (1986) *Atlas of mineralized bone histology*. Karger AG, Basel, Switzerland.
- [55] Maret D., Telmon N., Peters O. A., Lepage B., Treil J., Inglese J.M., Peyre A., Kahn J. L., Sixou M. (2012) *Effect of voxel size on the accuracy of 3D reconstructions with cone beam CT*. *Dentomaxillofacial Radiology* 41: 649–655.
- [56] Marshall D., Johnell O., Wedel H. (1996) *Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures*. *Bmj*. 312: 1254-1259.
- [57] McCreddie B. R., Goldstein S. A. (2000) *Biomechanics of fracture: is bone mineral density sufficient to assess risk?* *J. Bone Miner. Res.* 15: 2305-2308.
- [58] Meganck J. A., Kozloff K. M., Thornton M. M., Broski S. M., Goldstein S. A. (2009) *Beam Hardening artifacts in micro-computed tomography scanning can be reduced by x-ray beam filtration and the resulting images can be used to accurately measure BMD*. *Bone* 45(6): 1104-1116.
- [59] Müller R., Hahn M., Vogel M., Delling G., Rügsegger P. (1996) *Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections*. *Bone* 18: 215-220.
- [60] Müller R., Hildebrand T., Rügsegger P. (1994) *Non-invasive bone biopsy: a new method to analyse and display the three-dimensional structure of trabecular bone*. *Phys. Med. Biol.* 39: 145-164.
- [61] Müller R., Koller B., Hildebrand T., Laib A., Gianolini S., Rügsegger P. (1996) *Resolution dependency of microstructural properties of cancellous bone based on three-dimensional  $\mu$ -tomography*. *Technol. Health Care* 4: 113-119.
- [62] Muller R., Van Campenhout H., Van Damme B., Van Der Perre G., Dequeker J., Hildebrand T., Rügsegger P. (1998) *Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography*. *Bone* 23: 59–66.
- [63] Muller R., Hahn M., Voge M., Delling G., Rügsegger P. (1996) *Morphometric Analysis of Noninvasively Assessed Bone Biopsies: Comparison of High-Resolution Computed Tomography and Histologic Sections*. *Bone* Vol. 18, No. 3: 215-220.
- [64] Nagele E., Kuhn V., Vogt H., Link T. M., Muller R., Lochmuller E. M., Eckstein F. (2004) *Technical Considerations for Microstructural Analysis of Human Trabecular Bone from Specimens Excised from Various Skeletal Sites*. *Calcif Tissue Int* 75: 15–22.
- [65] Nishiyama K. K., Campbell G. M., Klinck R. J., Boyd S. K. (2010) *Reproducibility of bone micro-architecture measurements in rodents by in vivo micro-computed tomography is maximized with three-dimensional image registration*. *Bone* 46: 155–161.

- [66]Nuzzo S., Lafage-Proust M. H., Martin-Badosa E., Boivin G., Thomas T., Alexandre C., Peyrin F. (2002) *Synchrotron radiation microtomography allows the analysis of three-dimensional microarchitecture and degree of mineralization of human iliac crest biopsy specimens: effects of etidronate treatment*. J. Bone Miner. Res. 17: 1372-1382.
- [67]Odgaard A. (1997) *Three-Dimensional Methods for Quantification of Cancellous Bone Architecture*. Bone Vol. 20, No. 4: 315-328.
- [68]Oliviero S., Lu Y., Viceconti M., Dall'Ara E. (2017) *Effect of integration time on the morphometric, densitometric and mechanical properties of the mouse tibia*. Journal of Biomechanics 65: 203–211.
- [69]Palacio - Mancheno P. E., Larriera A. I., Doty S. B., Cardoso L., Fritton S. P. (2014) *3D Assessment of Cortical Bone Porosity and Tissue Mineral Density Using High-Resolution  $\mu$ CT: Effects of Resolution and Threshold Method*. J Bone Miner Res, Vol. 29, No. 1: 142-150.
- [70]Parfitt A. M., Drezner M. K., Glorieux F. H., Kanis J. A., Malluche H., Meunier P. J., Ott S. M., Recker R. R. (1987) *Bone Histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units*. Journal of Bone and Mineral Research Vol 2, No 6.
- [71]Parfitt A. M., Mathews C. H., Villanueva A. R., Kleerekoper M., Frame B., Rao D. S. (1983) *Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss*. J. Clin. Invest. 72: 1396-1409.
- [72]Particelli F., Mecozzi L., Beraudi A., Montesi M., Baruffaldi F., Viceconti M. (2012) *A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone: effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters*. Journal of Microscopy, Vol. 245, Pt 3: 302–310.
- [73]Perilli E., Baruffaldi F., Bisi M. C., Cristofolini L., Cappello A. (2006) *A physical phantom for the calibration of three-dimensional X-ray microtomography examination*. Journal of Microscopy, Vol. 222, Pt 2: 124–134
- [74]Perilli E., Baruffaldi F., Visentin M., Bordini B., Traina F., Cappello A., Viceconti M. (2007) *MicroCT examination of human bone specimens: effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters*. Journal of Microscopy, Vol. 225, Pt 2: 192–200
- [75]Peyrin R., Salome M., Cloettens P., Laval-Jeantet A., Ritman E., R uegsegger P. (1998) *Micro-CT examination of trabecular bone samples at different resolutions: 14, 7, and 2 micron level*. Technol. Health Care 6: 391-401.

- [76] Rathnayaka K., Sahama T., Schuetz M. A., Schmutz B. (2011) *Effects of CT image segmentation methods on the accuracy of long bone 3D reconstructions*. *Medical Engineering & Physics* 33: 226–233.
- [77] Roentgen W. K. (1895) *Über eine neue Art von Strahlen*. *Sitzungsberichte der Würzburger Physikal-med. Gesellschaft (Atti della società di fisica e medicina di Würzburg)*.
- [78] Rossi M., Casali F., Romani D., Carabini M. L. (2002) *3D micro-CT analysis of cancellous bone architecture*. *Developments in X-Ray tomography III* (ed. by U. Bonse) Proc. SPIE 4503: 349-358.
- [79] Scaffidi P., Misteli T. (2005) *Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome*. *Nat Med*, 11: 440–5.
- [80] Schmidt C., Priemel M., Kohler T., Weusten A., Müller R., Amling M., Eckstein F. (2003) *Precision and Accuracy of Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) in the Mouse Skeleton Compared With Histology and Microcomputed Tomography ( $\mu$ CT)*. Vol 18, No 8.
- [81] Sinha, Jitendra Kumar, Shampa Ghosh, Manchala Raghunath (2014) *Progeria: A Rare Genetic Premature Ageing Disorder*. *The Indian Journal of Medical Research* 139.5: 667–674
- [82] Skyscan. (2009). *Structural parameters measured by the Skyscan™ CT-analyser software*. In Skyscan Ed.
- [83] Stauber M., Müller R. (2008) *Micro-computed tomography: a method for the non-destructive evaluation of the three-dimensional structure of biological specimens*. *Methods Mol Biol*. 455: 273-292.
- [84] Stoico R., Tassani S., Perilli E., Baruffaldi F., Viceconti M. (2009) *Quality control protocol for in vitro micro-computed tomography*. *Journal of Microscopy*, Vol. 238, Pt. 2: 162-172.
- [85] Thomsen J. S., Laib A., Koller B., Prohaska S., Mosekilde LI., Gowin W. (2005) *Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies*. *Journal of Microscopy*, Vol. 218, Pt 2: 171–179.
- [86] Van de Castele E., Van Dyck D., Sijbers J., Raman E. (2004) *The effect of beam hardening on resolution in X-ray Microtomography*. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*.
- [87] Verdelis K., Lukashova L., Atti E., Mayer-Kuckuk P., Peterson M.G.E., Tetradis S., Boskey A.L., van der Meulen M.C.H. (2011) *MicroCT Morphometry Analysis of Mouse Cancellous Bone: Intra- and Inter-system Reproducibility*. *Bone* 49(3): 580–587.



- [88] Wasnich R. (1999) *Epidemiology of osteoporosis, in Primer on the metabolic disease and disorders of mineral metabolism.* ed. M. Favus, Lippincott/Williams & Wilkins, chap. 49.
- [89] Weiss L. (1990) *Cell and tissue biology.* Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- [90] WHO (1994) World Health Organisation. Technical Report Series, Nr. 843, WHO, Geneva.
- [91] Williams P. L. (1995) *Gray's anatomy.* 38th edition, Churchill Livingstone, London, UK.
- [92] Willie B.M., Birkhold A.I., Razi H., Thiele T., Aido M., Kruck B., Schill A., Checa S., Main R.P., Duda G.N. (2013) *Diminished response to in vivo mechanical loading in trabecular and not cortical bone in adulthood of female C57Bl/6 mice coincides with a reduction in deformation to load.* Bone 55: 335–346.
- [93] Yan Chu, Zi-Gang Xu, Zhe Xu, Lin Ma (2015) *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Caused by a LMNA Mutation: A Case Report.* Pediatric Dermatology Vol. 32 No. 2: 271-275.